

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**İKİ FOTON UYARTIM TEMELLİ
MİKROSKOPİK HÜCRE GÖRÜNTÜLERİNDEN
ÜÇ BOYUTLU YAPININ MODELLENMESİ**

Ufuk BAL

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Mehmet ENGİN

Elektrik-Elektronik Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 609.01.00

Sunuş Tarihi : 01.02.2012

Bornova-İZMİR

2012

Ufuk BAL tarafından **DOKTORA** tezi olarak sunulan “İki Foton Uyarım Temelli Mikroskopik Hücre Görüntülerinden Üç Boyutlu Yapının Modellenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 01.02.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ÖZET**İKİ FOTON UYARTIM TEMELLİ MİKROSKOPİK
HÜCRE GÖRÜNTÜLERİNDEN ÜÇ BOYUTLU YAPININ
MODELLENMESİ**

BAL, Ufuk

Doktora Tezi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Mehmet ENGİN

Şubat 2012, 76 sayfa

Bu tez kapsamında; konfokal floresans ve iki foton floresans mikroskopi yöntemleri kullanılarak floresans proteinler ile işaretlenmiş kanser hücreleri incelenmiştir. Bağ dokusu taklitleri de konfokal yansıma ve ikinci harmonik üretimi mikroskopi yöntemleri ile incelenmiştir. Yöntemler, bağ dokusu taklitlerinin optik nüfuz derinliği ve kontrastı, floresans proteinlerinin fotobeyazlatma dayanıklılığı ve nüfuz derinliği açısından karşılaştırılmıştır.

Son olarakta hücre görüntüleri, görüntü işleme yöntemleri ile iyileştirilmiş ve üç boyutlu şekilde geriçatılmıştır. Dalgacık Dönüşümü tabanlı bir ters evrişim yöntemi ve referans görüntünün bilinmediği durumlar için görüntü kalitesi ölçütü önerilmiştir. Sonuçlarımız, önerdiğimiz yöntemlerin floresans mikroskopi görüntülerine uygulanabileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Konfokal Mikroskopisi; İki Foton Mikroskopisi; Bağ Dokusu Taklitleri; Kör Ters Evrişim; Görüntü Kalitesi Ölçütü; Dalgacık Dönüşümü.

ABSTRACT

3D MODELLING OF TWO PHOTON EXCITATION BASED MICROSCOPIC CELL IMAGES

BAL, Ufuk

PHD in Electrical and Electronics Eng.

Supervisor: Associate Prof. Dr. Mehmet ENGİN

February, 76 pages

Within the scope of this dissertation; fluorescent proteins labeled cancer cells were investigated using Confocal Fluorescence and Two Photon Fluorescence microscopy methods. Also Extracellular Matrix mimics were investigated using Confocal Reflection and Second Harmonic Generation microscopy methods. Methods were compared with regard to penetration depth and contrast of ECM mimics, photobleaching and penetration depth of fluorescent proteins.

Finally, cell images were enhanced using image processing techniques and reconstructed three dimensionally. A Wavelet Transform based deconvolution method and a non-reference image quality metric were proposed. Our results show that our methods are applicable to fluorescence microscopy images.

Keywords: Confocal Microscopy; Two Photon Microscopy; ECM Mimics; Blind Deconvolution; Image Quality Metrics; Wavelet Transform.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması sürecinde YÖK Bursu ile ABD’de bir yıl birlikte çalışma olanağı bulduğum Arizona Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Urs UTZINGER’e şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın ikinci evresinde danışmanlığımı üstlenme özverisinde bulunan, tezimin sonlandırılması ve yazılması dahil her aşamasında yardım ve desteklerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Mehmet ENGİN’e en derin duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Değerli düşünceleri ve yol göstericilikleriyle tezimin gerçekleşmesinde katkıları olan Tez İzleme Jürisi Üyesi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr.Bilge KARAÇALI’ya bu emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bütün bu çalışmalarımın başından sonuna kadar akademik çalışma disiplini ve bilimsel etik kuralları içinde beni izleyen, eğiten ve yönlendiren Sevgili Dayım Sayın Prof. Dr. Osman GÖKÇE’ye özellikle çok teşekkür ederim.

Ve nihayet çalışma sürecinde, böyle bir çalışmanın kaçınılmaz sıkıntılarına katlanan ve hep yanımda olan Sevgili Eşim Dr. Oya BAL ve diğer aile bireylerine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ	1
2.MALZEME VE YÖNTEM	8
2.1 Malzeme	8
2.1.1 Mikroskopi.....	8
2.1.2 Bağ dokusu taklitleri.....	16
2.1.3 Çift renkli işaretlenmiş hücreler	18
2.2 Yöntem	19
2.2.1 Bağ dokusu taklitlerinin görüntülenmesi.....	19
2.2.2 Floresans proteinlerin görüntülenmesi	20
2.2.3 Hücre görüntülerinin üç boyutlu modellenmesinde görüntü iyileştirme	23
3. SONUÇLAR.....	43

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1 Bağ Dokusu Taklitlerinin Görüntülenmesindeki Sonuçlar	43
3.2 Çift Renkli İşaretlenmiş Hücrelerin Konfokal ve İki Foton ile Birleşik Görüntülenmesi Sonuçları	44
3.3 Derindeki Örneklerin Konfokal ve İki Foton ile Görüntülenmesi Sonuçları	45
3.4 Düzlem İçi Fotobeyazlatma.....	46
3.5 Odak Dışı Fotobeyazlatma	49
3.6 Hücre Görüntülerinin Üç Boyutlu Modellenmesindeki Görüntü İyileştirme Sonuçları	50
3.6.1 Kullanılan gürültü atma yöntemi ile ilgili sonuçlar.....	50
3.6.2 Önerilen ters evrişim yöntemi ile ilgili sonuçlar	54
3.6.3 Önerilen kalite ölçütü ile ilgili sonuçlar	60
3.6.4 Üç boyutlu geriçatma.....	65
4. TARTIŞMA.....	66
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Konfokal mikroskop çalışma prensibi	10
2.2 İki foton soğurma ve yayılım.....	11
2.3 SHG enerji seviyesi gösterimi	12
2.4 Işık darbesinin homojen olmayan dağılımı.....	13
2.5a İki foton biriminin yapısı	14
2.5b Konfokal biriminin yapısı.....	15
2.6 DsRed2 dalgaboyu taraması	20
2.7 Görüntü iyileştirme işlem akış şeması.....	24
2.8 Evrişim İşlemi.....	25
2.9a Ayrık Dalgacık Dönüşümü, bir boyutlu sinyal analiz filtre bankası	32
2.9b Ayrık Dalgacık Dönüşümü, eşdeğer gösterim.....	32
2.10 Dalgacık Paket Dönüşümü.....	33
2.11a Hızlı Dalgacık Dönüşümü analiz filtre bankası.....	35
2.11b Görüntünün altbantlara ayrılması	35
2.11c Sentez filtre bankası.....	35
2.12 Dalgacık dönüşümü ile gürültü atma	36
2.13 Entropi hesaplanmasında kullanılan 3x3'lük pencere	41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

3.1	ECM taklitlerinin görüntülenmesinin özeti	43
3.2	Çift renkte işaretlenmiş hücrelerin görüntülenmesi	44
3.3a	Nüfuz derinliği, eGFP	46
3.3b	Nüfuz derinliği, DsRed2.....	46
3.4a	eGFP için fotobeyazlatma	47
3.4b	DsRed2 için fotobeyazlatma.....	48
3.4c	720nm’de ışık demeti çapının etkisi.....	48
3.5	Düzlem dışı fotobeyazlatma	49
3.6	Çalışmada kullanılan test görüntüleri.....	51
3.7	Önerilen ve diğer ters evrişim yöntemlerinin karşılaştırılması (poisson)	56
3.8	Mikroskop görüntüsü için yöntemlerin karşılaştırılması (poisson).....	57
3.9	Önerilen yöntem ve diğer yöntemlerin karşılaştırılması (gauss).....	58
3.10	Mikroskop görüntüsü için yöntemlerin karşılaştırılması (gauss)	59
3.11	Önerilen yöntem ve RL tabanlı kör ters evrişim yönteminin karşılaştırılması.....	60
3.12	Üç boyutlu oluşturulmuş görüntüden alınan kesitler.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan gürültü atma algoritmasının farklı dalgacık tipleri için karşılaştırılması.....	52
3.2 Dalgacık paket için elde edilen hata değerleri.....	53
3.3 Gürültü atma yöntemlerinin karşılaştırılması	54
3.4 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün sınanması	61
3.4 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün sınanması (devamı).....	62
3.5 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün gürültü varken sınanması	63
3.5 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün gürültü varken sınanması (devamı)	64
3.6 Hücre görüntüleri için görüntü iyileştirme sonuçları	64

1. GİRİŞ

Biyofotonik, biyolojik maddelerin görüntülenmesi, algılanması ve denetimi için ışığın üretilmesi ve kullanılması bilimidir. Optik yöntemlerle biyogörüntüleme, biyofotonğin en temel dayanağıdır. Optik biyogörüntüleme, hücrelerin ve dokuların görüntülenmesi için biyomedikal araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Biyomedikal görüntülemeye, optik görüntüleme yöntemleri, görüntülenen hücre veya dokuya az zarar vermesi ve daha derin görüntülemeye izin vermesi gibi getirileri nedeniyle tercih edilmektedir (Prasad, 2003).

Canlı hücrelerin optik yöntemlerle görüntülenebilmesi için hücrelerin içinde hücresel aktiviteleri gerçekleştirebileceği doğal bir ortama ihtiyaç vardır. Bağ dokusu (ECM, extracellular matrix) taklitleri (Kollajen I, Agarose, Fibrin gibi), hücre ve hücre kümelerinin yayılması ve göçünü incelememizi sağlayan üç boyutlu doğal bir ortam sunar. Örneğin içine fibrosarcoma (fibroblastlardan türeyen habis tümör) ve akciğer kanser hücresi ekilen Kollajen I hidrojelleri (en yaygın kullanılan bağ dokusu taklitlerinden birisi), kanser hücreleri göçü süresince, proteoliz (protein sindirim işlemi) ve adhezyon (birleşme) ile ilişkili hücre yapılarını incelemek için kullanılmaktadır (Wolf & Friedl, 2009). Yağ dokusundan elde edilen mikrodamarların filizlenmesi süreci, mikrodamarların Kollajen I içerisine ekilip, birkaç gün boyunca inkübe edilmesi yoluyla incelenmiştir (Hoying, et al., 1996). Beyin tümörü hücrelerinin göçü, hücrelerin Fibrin içerisine ekilmesi ile incelenmiştir (Hayen, et al., 1999). Başka bir çalışmada da sinir hücrelerinin büyümesi, hücrelerin Agarose içerisine ekilmesi ile incelenmiştir (Cao, et al., 2009).

Bütün bu çalışmalar, zaman serisi görüntülemesi ve uzun dönemli kültüre imkan veren örselemesiz görüntüleme yöntemlerini gerektirir. Hücre göçü sırasında meydana gelen hücre çıkıntısı oluşumu, hücre yapışması gibi aşamaları algılayabilmek için mikron veya daha küçük düzeyde çözünürlüğe ihtiyaç vardır. Lazer tarama mikroskopi yöntemi, incelenen örneğin ışık altında kalma süresini optimize etmesi sayesinde minimum derecede fotokimyasal bozulma ve hücre tahribatı için ideal bir yaklaşımdır. Lazer tarama mikroskobu, numuneyi seri biçimde, nokta nokta aydınlatacak şekilde tasarlanmıştır. Odaklanmış lazer ışığı, tüm numuneyi X-Y eksenini boyunca tarar. Bu sayede, görüntüleme boyunca tüm numunenin yüksek uyartım ışığına maruz kalması engellenmiş olur. Bu da floresans proteinlerin, floroforların optik görüntüleme süresince ışıma yapma

özelliğini yitirmesi anlamına gelen fotobeyazlamaya (photobleaching) uğrama derecesinin azalmasına neden olur (Prasad, 2003). Konfokal yansıma (Confocal Reflection, CR) mikroskopi yöntemi, ortamdaki kırılma indisi farkından kaynaklanan saçılma sayesinde mikron ve daha küçük boyuttaki yapıları ayırtedebilir ve fibriler yapılarda iyi bir kontrast sağlar (Friedl, 2004). Benzer şekilde fibriler kollajenin tekrarlayan yapısı ikinci harmonik üretimi (second harmonic generation, SHG) olarak bilinen frekans çiftlemeli salınımına neden olur. Bu olay çok düşük uzunlukta ve yeterli güçte lazer darbeleri ile sağlanabilir. Üç boyutlu kültürlerde yaşayan hücreleri belirlemek için endojenik floresans kontrastı histokimyasal işaretlemeye (boyama) tercih edilmektedir. Hem NADH(Nikotinamid Adenin Dinükleotid+Hidrojen) ve flavinler gibi enzimatik kofaktörlerin (enzimlerin aktiveleştirici kısmı) hücresel otofloresansı (içsel floresans) hem de genetik olarak düzenlenmiş floresans proteinlerin yayını, hücre göçü ve çoğalması çalışmalarında çok yaygın biçimde gözlenmektedir (Bjorkoy, et al., 2005; Condeelis & Segall, 2003; Hadjantonakis & Papaioannou, 2004; Heikal, et al., 2000; Kim, et al., 2009; Wu, et al., 2005).

Optik yöntemlerle görüntülemeye, hücresel aktivitelerin algılanması, çoğu kez floresans yapan proteinlerin hedef moleküle tutunması yani işaretleme sayesinde mümkün olabilmektedir. Hücre hatlarını ve çekirdeğini ayrı ayrı işaretlemek için çift renkli işaretleme gereklidir. GFP (Green Fluorescent Protein, Yeşil Floresans Protein) ile membran tipi matriks parçalayıcı enzimlerin (Metalloproteinazlar: MT1-MMP) açığa çıkmasının artması gibi hücresel aktiviteler algılanırken (Cao, 2005), hücre hatları da başka bir floresans yapan proteinle algılanabilir. Yaptığımız çalışmada da incelendiği üzere, çift renkli işaretleme için seçimlerden birisi DsRed2 (Discosoma sp. Red Fluorescent Protein variant 2, Kırmızı Floresans Protein türü) ve eGFP çifti olabilmektedir.

Optik görüntüleme yöntemlerinden klasik geniş alan mikroskopide, kalın dokuların görüntülenmesinde görüntü, odak içi bölgelerden gelen net görüntü ayrıntıları ile odak dışı düzlemden gelen bulanık görüntülerin toplamı şeklinde oluşur. Bu da elde edilen görüntünün zıtlığını düşürür. Konfokal mikroskop, görüntüyü oluşturan ışığın düzleminde konfokal bir açıklık (pinhole gibi) kullanarak odak dışı etkiyi engellemek suretiyle bu olumsuzluğu aşar. İki foton mikroskopi yönteminde ise oldukça iyi odaklanmış uyartım ışığı kullanıldığından, odak dışı bölgenin uyartım ihtimali oldukça düşüktür. İki foton uyartımının bu özelliği sayesinde konfokal açıklığa ihtiyaç olmadan da odak dışı floresans önemli ölçüde engellenir (Prasad, 2003).

Konfokal ve iki foton floresans mikroskopisi ile floresans yapan proteinlerle işaretlenmiş hücreler görüntülenebilir. İki foton mikroskopisi kullanılarak, yeşil floresans yapan proteinin uyartımı iyi belirlenmiştir. GFP'nin en geniş iki foton kesit alanı, farklı türleri içinde benzer olmak üzere, 920nm civarındadır (Blab, et al., 2001). Önceki çalışmalar, GFP'nin, hem konfokal hem de iki foton uyartım için fotobeyazlamaya göreceli olarak dayanıklı olduğunu göstermiştir (Patterson, et al., 2001; Tsien, 1998). DsRed2 için en etkin iki foton uyartımı 1120nm civarında olur (Andresen, et al., 2009; Drobizhev, et al., 2009). Ancak 800nm'nin altında da mümkün olabildiği incelememizde bulunmuştur. Ayrıca 1120nm'de uyartım, TiSaph lazerle tek başına mümkün olmadığı için, optik parametrik osilatör (Optical Parametric Oscillator, OPO) ile birlikte kullanımı gerektirir. Hem GFP hem de RFP, Argon İon lazer (488nm) ve Argon Krypton lazer (568nm) kullanılarak, konfokal mikroskopi yöntemi ile etkin bir biçimde uyartılabilir. Konfokal lazer tarama mikroskopu, floresans proteinleri görüntülemek için, genellikle iki foton sisteminden daha az maliyetlidir.

Bağ dokusu taklitleri içine ekili, floresans yapan proteinlerle işaretlenmiş hücreleri görüntülerken, uygun görüntüleme yönteminin seçimini belirleyen çeşitli etmenler vardır. Bağ dokusu taklitlerinin görüntülenmesinde, küçük çaplı fiberlerin gözlenebilmesine ihtiyaç vardır. İdeal olarak seçilmiş bağ dokusunda, güçlü bir saçılma ve soğurma olamayacağından birkaç yüz mikrometre görüntüleme derinliğine ulaşılabilir. Bağ dokusunun bazı bileşenleri (kollajen ve elastin gibi) otofloresans yaparlar. Konfokal yansıma mikroskopisi, yüksek çözünürlük ve iyi bir kontrast sağlaması nedeniyle, fibrilli yapıların görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Friedl, 2004; Hartmann, et al., 2006). SHG, fibriller kollajeni görüntülerken çok iyi bir kontrast ve yüksek çözünürlüğün yanısıra derine nüfuza da imkan sağlar (Friedl, 2004; Mohler, et al., 2003).

Konfokal ve iki foton floresans mikroskopi yöntemleri, canlı hücrelerin üç boyutlu analizini mümkün kılmaktadır. Sayısal görüntü işleme yöntemleri sayesinde elde edilen üç boyutlu görüntülerden niceliksel bilgi elde edilebilir. Ancak konfokal ve iki foton mikroskopi ya da daha genel ifadeyle floresans görüntülerde kaliteyi sınırlandıran iki etken vardır. Bunlardan birincisi mikroskop optiğinden (PSF, point spread function, nokta dağılım fonksiyonu ile modellenen), ikincisi gürültüden (foton vuru gürültüsü, okuma gürültüsü, ısı gürültüsü) kaynaklanmaktadır. Fotodedektörde (PMT, photo multiplier tube, foto-çoklayıcı tüp), foton yayınının rasgele doğasından kaynaklanan foton vuru gürültüsü

(photon shot noise) temel gürültü kaynağıdır ve Poisson Süreci olarak modellenenebilir (Wu, et al., 2008). Ek olarak ısı gürültü, okuma gürültüsü gibi sinyalden bağımsız gürültü etkileri de vardır (Delpretti, et al., 2008). Sinyalden bağımsız gürültünün toplam etkisi normal dağılımlı farzedilebilir. Ancak görüntüleme donanımındaki son gelişmeler, gürültünün sadece foton vuru gürültüsü olarak alınıp diğer etkilerin ihmal edilmesine olanak sağlamaktadır (Wu, et al., 2008).

Floresans görüntülerde kaliteyi sınırlandıran etkenlerin üstesinden gelebilmek için, DsRed2 ve eGFP ile işaretlenmiş hücrelerin kaydedilen görüntülerinde, gürültü atma (denoising) ve ters evrişim (deconvolution) yapılmıştır. Araştırmacılar bulanıklığı gidermek için çeşitli ters evrişim algoritmaları önermişlerdir. Literatürde doğrusal, doğrusal olmayan, kör (PSF bilinmeyen durum), kör olmayan, yinelemeli ve yinelemeli olmayan algoritmalar vardır.

Doğrusal yöntemlere; Ters filtre, Wiener filtre örnek olarak verilebilir. Doğrusal yöntemler, en basit yöntemlerdir ve yinelemeli olmadıklarından oldukça hızlıdır. Ortalama gürültü için kullanışlıdır. Doğrusal yöntemlerin bir üstünlüğü de Fourier Dönüşümü ile etkili bir biçimde uygulanabilmeleridir. Ancak PSF'deki hatalara karşı çok duyarlıdır (Sarder & Nehorai, 2006). Bunun yanı sıra özellikle kenarlara yakın yerlerde ve kullanılan sınır koşulları nedeni ile görüntü sınır bölgelerinde, gölge benzeri hatalara neden olurlar (Elhayek, 2010). Doğrusal yöntemlerin bu eksikliklerinden dolayı, daha fazla görüntü iyileştirmesi için doğrusal olmayan yöntemlere ihtiyaç vardır.

Doğrusal olmayan yöntemlere yinelemeli sınırlanmış Tikhonov yöntemi (ICTM) örnek olarak verilebilir. Doğrusal yöntemlerin eksikliklerini gidermek için çeşitli sınırlamalar (negatif olmama gibi) getirir. Ancak yinelemeli olduklarından işlem hacimleri daha fazladır. Doğrusal olmayan yöntemlerin bir götürüsü de, istatistiksel yöntemler gibi bir gürültü azaltma önlemi olmamasıdır.

İstatistiksel yöntemler, ters evrişim sorununu, gürültü barındıran kaydedilen görüntüden bilinmeyen net görüntünün tahmini olarak ele alırlar. Bu bakış açısı Kestirim Teorisinden (Estimation Theory) iyi bilinen pek çok yöntemi kullanma imkanı verir. Bunlardan en yaygın olanları, En Büyük Olabilirlik Kestirimi (Maximum Likelihood Estimation) ve Bayes Kestirimi'dir (Shah, 2006). Bu yöntemler gürültünün fazla olduğu durumlarda diğer yöntemlere göre daha etkin

özüm sunarlar. Ancak doğrusal ve doğrusal olmayan yöntemlere göre işlem yükü oldukça fazladır.

Yukarıda bahsi geçen yöntemlerin hepsi PSF'in tam olarak bilindiği (ya da modellendiği) durumlar için geliştirilmiştir. Ancak gerçek görüntülemelerde PSF'i tam olarak bilmek zordur. Deneysel PSF ölçümleri her zaman gürültü barındırır. Teorik PSF modellemeleri de mikroskop optiğinin tüm parametrelerini belirleyemez. Kör ters evrişim yöntemleri hem mikroskobun PSF'i hem de görüntü için aynı anda tahminde bulunur. Richardson-Lucy (RL) tabanlı yinelemeli kör ters evrişim yöntemi örnek olarak verilebilir (Sarder & Nehorai, 2006). RL algoritması gürültüye çok duyarlıdır. Ayrıca yinelemeli bir yöntem olduğundan fazla işlem süresi gerektirir.

Çalışmamız kapsamında ele alınan; optik yöntemlerle görüntülemelerde kullanılan mikroskopi yöntemi, bağ dokusu taklitlerinin özellikleri, görüntü çözünürlüğü ve floresans proteinlerin özellikleri sağlıklı bir görüntüleme için önemli parametrelerdir. Araştırmada, seçilen konfokal ve iki foton mikroskopi yöntemi ile hücrelerin görüntülenmesinde aşağıdaki hususlar önem arz etmektedir.

- a. Konfokal ve iki foton mikroskopi yöntemlerinin birbirlerine göre getiri ve götürülerinin bilinmesi.
- b. Bağ dokusu taklitlerinin nüfuz derinliği, görüntü zıtlığı(contrast) ve otofloresans özelliklerinin bilinmesi.
- c. Floresans yapan proteinlerin, fotobeyazlama dayanıklılığının bilinmesi.
- d. Mikroskop optiğinden kaynaklanan, hücre görüntüleri üzerindeki bozucu etkilerin modellenmesi. Görüntü işleme yöntemleri ile görüntü zıtlığının artırılması, çözünürlüğünün artırılması ve daha yüksek işaret gürültü oranlarının elde edilmesi.
- e. Uygulanan görüntü işleme yöntemlerinin değerlendirilmesinde, referans görüntülerin bilinmediği durumlar için görüntü kalitesi ölçütlerinin geliştirilmesi.

Yaptığımız çalışma ile yukarıdaki maddelere cevap aranmıştır. Hücrelerin üç boyutlu kültürde en uygun şekilde görüntülenebilmesi için onlara üç boyutlu

ortamı sağlayan bağ dokusu taklitlerinin seçimi önemlidir. Bu nedenle Agarose, kollajen-1 , fibrin, gelatin, puramatrix ve matrigel gibi bağ dokusu taklitleri incelenmiştir. Çalışılan floresans proteinlerden DsRed2 ile ilgili literatürde çalışmalar az olup özellikle belli dalgaboylarında çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca TiSaph ve OPO ile kızıl ötesi (infra red) dalgaboylarında uyartım pahalı bir işlemdir. Özellikle kızıl ötesi dalgaboylarında incelenen floresans proteinleri açısından konfokal ve iki foton mikroskopisinin birbirlerine göre üstün olan ve olmayan yönlerini bilmek önemlidir. Bu nedenle kızıl ötesi dalgaboylarında konfokal mikroskobun iki foton mikroskopa alternatif olup-olamayacağını değerlendirmek için iki yöntem birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bu durum sistem maliyeti açısından oldukça önemlidir. Diğer önemli nokta da kullandığımız konfokal mikroskobun diğer konfokal mikroskoplardan farklı olarak aynı anda yansıma ve floresans ölçümü yapabilmesidir. Tezin yazıldığı tarihe kadar bu tezin kapsamındaki çalışmalar ülkemizde iki foton mikroskopu bulunmadığından bu alandaki ilk deneysel araştırmalardır.

Ayrıca çalışmamızda, Fourier Dönüşümü tabanlı, kör, yinelemeli olmayan bir ters evrişim yöntemi olan SeDDaRa (Self Deconvolving Data Reconstruction) Öz-Ters Evrişimli Veri Geriçatması yönteminin (Caron, et al., 2002) Dalgacık Dönüşümü tabanlı olarak değiştirilmesi önerilmiştir. Ayrık Dalgacık Dönüşümü ve Dalgacık Paket Dönüşümü, farklı ana dalgacık tipleri için değiştirilmiş SeDDaRa algoritmasında kullanılmıştır. Kullandığımız yöntemler hücre görüntülerinden önce, bilinen temiz görüntüler üzerinde test edilmiştir. Referans görüntünün bilinmediği durumlarda görüntü kalitesini (zıtlık arttırımı) değerlendirebilmek için dalgacık entropisi tabanlı bir parametre (De & Sil, 2010; Gabarda, et al., 2007) önerilmiştir. Bu amaçla, entropi görüntüsünün standart sapması kullanılmıştır. Görüntü kalitesi, RMSE (Root Mean Square Error, Ortalama Karese Hatanın Karekökü), AQI(Anisotropic Quality Index, yöne bağımlı kalite indisi) (Gabarda & Cristobal, 2007) ve dalgacık entropisi tabanlı önerdiğimiz bir parametre ile değerlendirilmiştir. Son olarak temizlenmiş ve bulanıklığı giderilmiş görüntülerden 3 boyutlu model elde edilmiştir.

Özetle çalışma kapsamında; konfokal floresans (Confocal Fluorescence, CF) ve iki foton floresans mikroskopi yöntemleri kullanılarak floresans proteinler ile işaretlenmiş kanser hücreleri incelenmiştir. Bağ dokusu taklitlerinde ise kontrastın kaynağı olarak, konfokal geri saçılma (backscattering), SHG ve otofloresans incelenmiştir. Yaygın şekilde kullanılan ve ticari olarak bulunabilen bağ dokusu taklitleri seçilmiştir. İnceleme için konfokal yansıma, SHG ve iki foton floresans

mikroskopi yöntemleri kullanılmıştır. Yöntemler, bağ dokusu taklitlerinin nüfuz derinliği ve kontrastı, floresans proteinlerinin fotobeyazlama dayanıklılığı, kollajen içerisindeki hücrelerin ne kadar derine görüntülenebildiği gibi parametreler açısından karşılaştırılmıştır.

Son olarak hücre görüntüleri, görüntü işleme yöntemleri ile iyileştirilmiş ve üç boyutlu şekilde geriçatılmıştır. Görüntü kalitesi ölçütü ve ters evrişim için yöntemler önerilmiştir. Dalgacık Dönüşümü tabanlı olarak değiştirdiğimiz SeDDara yöntemi floresans mikroskop görüntülerine uygulanmıştır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

Malzeme başlığı; kullanılan mikroskopları, incelediğimiz bağ dokusu taklitlerini, hücreleri ve bunların hazırlanmalarını kapsamaktadır. Yöntem başlığı ise; görüntüleme, görüntü işleme ve bunların değerlendirilmesi ile ilgili kullanılan yöntemleri kapsamaktadır.

2.1 Malzeme

2.1.1 Mikroskopi

Optik Görüntüleme

Biyomedikal görüntülemelerde optik görüntüleme yöntemleri, görüntülenen hücre veya dokuya az zarar vermesi, daha derin görüntülemeye izin vermesi gibi getirileri nedeniyle tercih edilmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan optik görüntüleme yöntemleri ve ilgili kavramlara aşağıda değinilmiştir (Prasad, 2003).

Floresans Mikroskopi Yöntemi

Floresans mikroskopi yöntemi, biyomedikal görüntülemelerde önemli yöntemlerden birisidir. Floresans yayını, uyartım ışığının dalgaboyuna bağlıdır. Tek foton soğurma için uyartım enerjisi, yayınım enerjisinden fazladır (uyartım ışığının dalgaboyu, yayınım ışığının dalgaboyundan daha düşüktür). Floresansın önemli bir getirisi, düşük konsantrasyonlu durumlarda bile uzaysal dağılımı ayırt etmemize imkan verecek yüksek bir işaret-gürültü oranı sağlamasıdır. Floresanstan faydalanmak için, öz floresans (otofloresans) kullanılabilir ya da hücre uygun bir floresans yapan proteinle işaretlenebilir. Floresans mikroskobu, hücre ve dokulardaki floresans yapan proteinleri en iyi şekilde algılamak için uygun bir mikroskoptur (Prasad, 2003).

Tarama Mikroskopi Yöntemi

Floresans görüntülerde temel problemlerden birisi numunenin odak dışı bölgelerinin parlama olarak görülmesidir. Bu durum, işaret-gürültü oranını oldukça azaltmaktadır. Bununla beraber, görüntüleme boyunca tüm numuneyi aydınlatan uyartım ışığı şiddeti yüksektir, bu da floresans proteinlerin

fotobeyazlamaya uğramasına neden olur. Her iki problemin çözümünde tarama mikroskobunun kullanılması mümkündür.

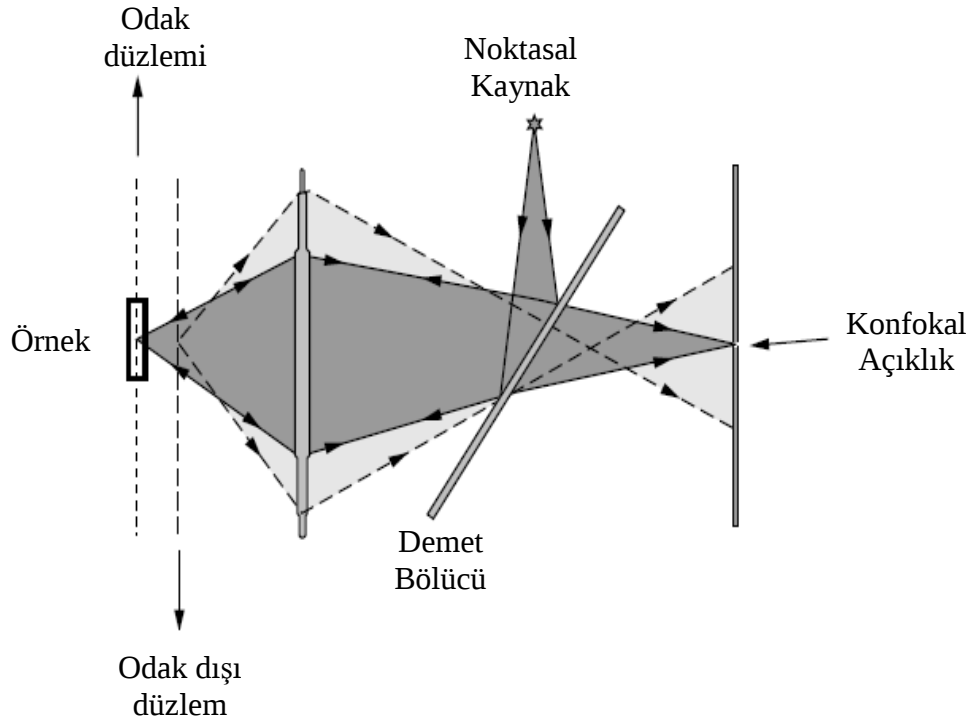
Optik tarama mikroskopu, numuneyi seri biçimde nokta nokta aydınlatacak şekilde tasarlanmıştır. Odaklanmış lazer ışığı, tüm numuneyi X-Y eksenini boyunca talar. Görüntü, ışığın fotoçoklayıcı tüplerde algılanması sayesinde oluşturulur. Görüntü çözünürlüğü lazer ışığının benek büyüklüğü ile sınırlıdır (Prasad, 2003).

Konfokal (Eş Odaklı) Mikroskopi Yöntemi

Klasik geniş alan mikroskoplarda, kalın dokuların görüntülenmesinde görüntü, odak içi bölgelerden gelen net görüntü ayrıntıları ile odak dışı düzlemde gelen bulanık görüntülerin toplamı şeklinde oluşur. Bu da elde edilen görüntünün zıtlığını düşürür. Konfokal mikroskop, görüntüyü oluşturan ışığın düzleminde konfokal bir açıklık (pinhole gibi) kullanarak odak dışı etkiyi engellemek suretiyle bu problemi aşar.

Konfokal mikroskopta, noktasal ışık kaynağı objektif aracılığıyla örnek üzerinde odaklanır. Görüntü beneği de aynı lens üzerinden konfokal açıklık (pinhole) ve dedektör üzerine odaklanır. Pinhole, görüntünün odak içi kısmından gelen ışığın yakınsadığı noktanın bulunduğu düzleme yerleştirilir. Konfokal mikroskobun çalışma prensibi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Şekilde, örnekten yansıyan odak dışı ışığın, konfokal açıklık (pinhole) kullanımı ile engellenmesi görülmektedir.

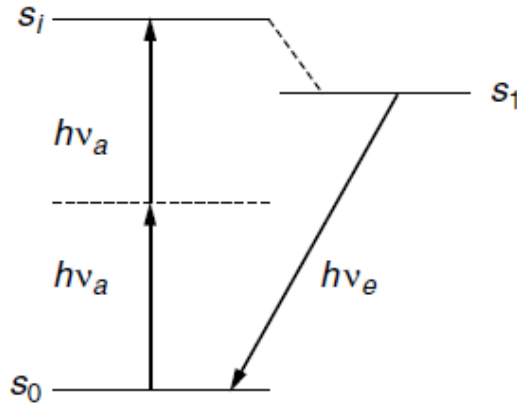
Konfokal açıklığın kullanılması, odak dışı ışığı engellemek suretiyle görüntü zıtlığını artırır. Ancak konfokal açıklık floresans sinyal seviyesini de azalttığından, daha fazla uyartım ışığı kullanılmasına neden olabilir. Bu da daha fazla fotobeyazlamaya yol açar. Diğer bir problem de, tek foton konfokal mikroskopi yönteminde kullanılan ışığın dalgaboyundan kaynaklanmaktadır. Morötesi veya mavi ışık bölgesindeki dalgaboylarında, ışık dokuda oldukça zayıflamaya uğramaktadır. Bu durum derine erişimi engellemektedir. İki foton mikroskopi yöntemi ile bu problemlerin bazılarının üstesinden gelinebilir (Prasad, 2003).



Şekil 2.1(Prasad, 2003) Konfokal mikroskop çalışma prensibi.

Çoklu-Foton Mikroskopi Yöntemi

Çoklu-foton mikroskopi (multi-photon microscopy) yönteminde, floroforlar (ışık yapan madde) çok fotonlu soğurma ile uyarılır. Çok-fotonlu floresans mikroskopisinde, hem iki hem de üç foton soğurmadan kaynaklanan floresansın kullanımı ile görüntüleme yapılmıştır. Ancak üç foton soğurmada oldukça yüksek güç kullanımı gerektiğinden, biyo-görüntülemeye iki-foton mikroskopi etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. İki foton tarama mikroskopi yönteminde, uyartım için, kırmızı ve yakın kızılötesi dalga boyu aralığında, çok kısa süreli (femtosaniye) darbeler üreten lazer kullanılır. Bu uyartımın sonucunda görünür dalga boyu aralığında yayılım ortaya çıkar.



Şekil 2.2 İki foton soğurma ve yayılım (Prasad, 2003). Şekilde h , v_a , v_e ve s sembolleri sırasıyla planck sabiti, soğurma frekansı, yayılım frekansı ve enerji seviyesini temsil etmektedir.

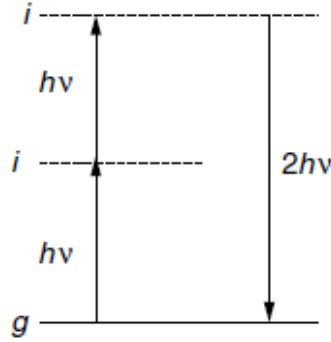
İki foton uyartımda, istenilen dalgaboyu aralığında ışıma olabilmesi için, iki fotonun aynı anda soğurulması gerekir (Şekil 2.2). Aynı anda iki foton soğurma olasılığı ani ışık şiddetinin karesiyle orantılıdır. Bu da çok şiddetli lazer darbesi gerektirir. Çok kısa süreli darbeleri lazer kullanılması tercih edilir. Bu sayede ortalama güç çok az seviyede tutulur ve hücrelerin zarar görme derecesi azaltılmış olur. En yaygın seçimlerden birisi, 100 femtosaniye civarında darbe üreten ve 50 kW mertebesinde tepe güç üreten Titanyum Safir lazerdir.

İki foton mikroskopi yönteminde oldukça iyi odaklanmış uyartım ışığı kullanıldığından, odak dışı bölgenin uyartım ihtimali oldukça düşüktür. İki foton uyartımın bu özelliği sayesinde konfokal açıklığa ihtiyaç olmadan da odak dışı floresans önemli ölçüde engellenir. Ayrıca sadece odak noktası bölgesinin uyartımı, odak dışı fotobeyazlamayı da oldukça düşük seviyeye indirir. Tek foton uyartıma göre, iki foton uyartımın bir diğer getirisi de nüfuz derinliğin fazla olmasıdır. Daha uzun dalgalı boylarında ışık daha az saçılmaya uğradığından, ışık daha derine nüfuz eder. Ancak iki foton mikroskopi yönteminin tek foton mikroskopi yöntemine göre götürüsü de vardır. Bu da, kullanılan ışığın dalgalı boyundan dolayı, iki foton yönteminin daha az çözünürlüğe imkan vermesidir.

İkinci Harmonik Mikroskopi Yöntemi

Bu yaklaşımda, görüntü zıtlığının kaynağı olarak, doğrusal olmayan optik bir süreç olan ikinci harmonik üretimi kullanılır. İkinci harmonik üretimi “simetri merkezi olmayan” (non-centrosymmetric) ortamda oluşur. İkinci harmonik üretiminde, uyartım ışığının iki katı frekansta (ya da yarı dalgalı boyunda) yayılım

ışığı oluşur (Şekil 2.3). İki-foton sürecinde olduğu gibi, ikinci harmonik üretimi de ışık şiddetinin karesi ile orantılıdır.



Şekil 2.3 İkinci harmonik üretimi enerji seviyesi gösterimi (Prasad, 2003). Şekilde h planck sabitini, ν frekansı, g ve i ise enerji seviyelerini temsil etmektedir.

İkinci harmonik üretimi, eğer uyartım ışığı soğurma bandı dışında seçilirse, soğurma sürecini içermediğinden fotobeyazlamaya neden olmaz. Ayrıca ışıma yapma özelliği olmayan örnekler ve dokularda da, ikinci harmonik üretimi mikroskopi yöntemi kullanılabilir.

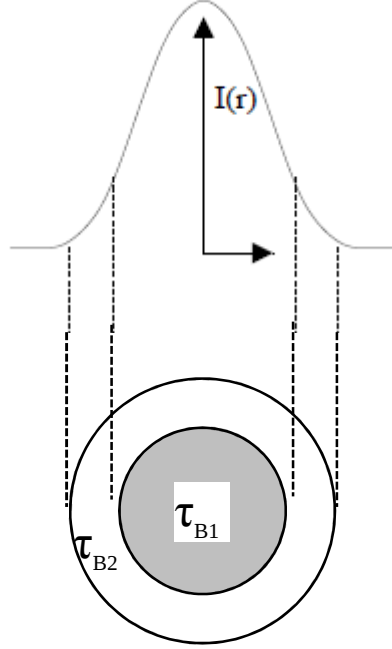
İki foton yöntemine göre en büyük götürüsü sadece simetrik olmayan ortamlarda üretilebilmesidir.

Fotobeyazlama

Fotobeyazlama, floroforların optik görüntüleme süresince ışıma yapma özelliğini yitirmesi, solması anlamına gelir. Fotobeyazlamanın nedeni, fotokimyasal tepkime sonucu moleküllerin soğurma-yayınım döngüsünün dışına çıkmasıdır. Kısa süreler için fotobeyazlamanın tersine çevrilemez bir süreç olduğu kabul edilebilir (Pawley, 2006). Bu kabul, özellikle aydınlatılan alan dışındaki floroforların, fotobeyazlamaya uğramış alana difüzyonu ilkesine dayanan yöntemler için ön şarttır.

Deneyisel çalışmalarda elde edilen fotobeyazlama eğrileri ikili üstel ifadelerle temsil edilebilir (Gavriluk, et al., 2007). Bunun nedeni fotobeyazlama oranının uyartım ışığına bağlı olması ve uyartım ışığının uzaysal dağılımının homojen olmamasıdır. Işık darbesinin uzaysal dağılımının homojen olmamasının ise iki nedeni vardır. Birincisi ışığın soğurma nedeni ile zayıflaması, ikincisi ise ışık darbesinin Gauss dağılımlı olmasıdır. Aydınlatılan bölge, ışığın homojen olmayan bu dağılımı nedeni ile yaklaşık olarak iki kısma ayrılabilir (Şekil 2.4). Şekilde koyu renkte gösterilen birinci kısım, yüksek ışık şiddetine maruz kalan

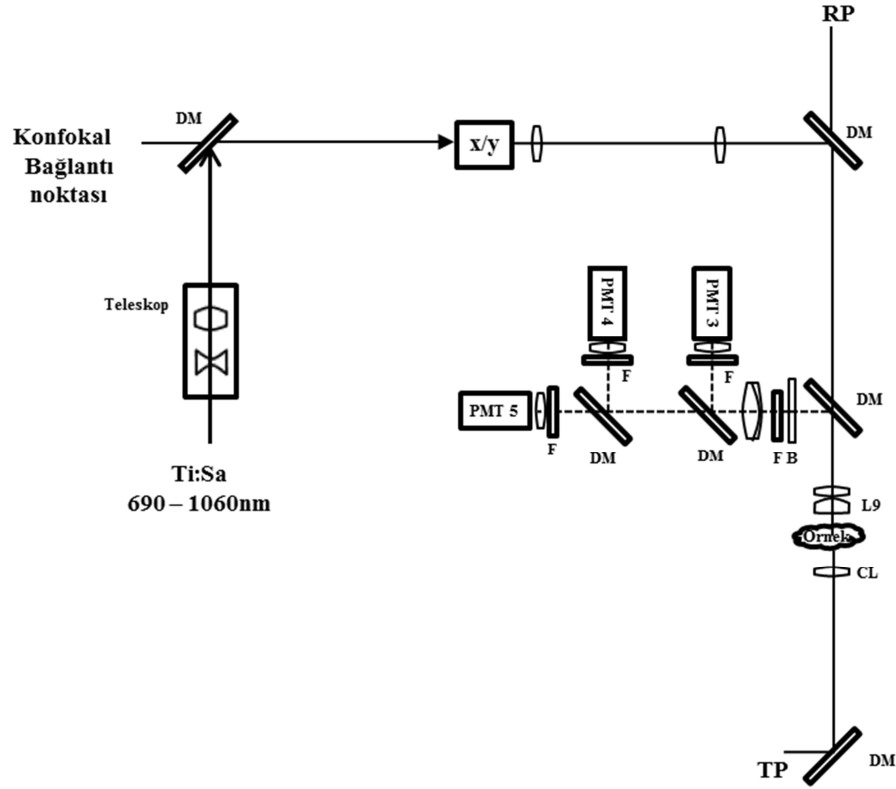
dolayısıyla yüksek fotobeyazlama oranına ($1/\tau_{B1}$) sahip odak bölgesi, açık renkte gösterilen ikinci kısım ise daha az ışık şiddetine maruz kalan dolayısıyla daha az fotobeyazlama oranına ($1/\tau_{B2}$) sahip dış bölgedir ($\tau_{B1} < \tau_{B2}$).



Şekil 2.4 Işık darbesinin homojen olmayan dağılımı (Gavrilyuk, et al., 2007) .

Kullanılan Mikroskop

DsRed2 ve ECM taklitlerinin ölçümleri, tek demetli, intravital (canlı dokuları yüksek çözünürlükte görüntülemeye yarayan bir mikroskopi türü) bir mikroskopla (TrimScope, LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) gerçekleştirilmiştir. Mikroskobun yapısı Şekil 2.5a ve b’de görülmektedir.

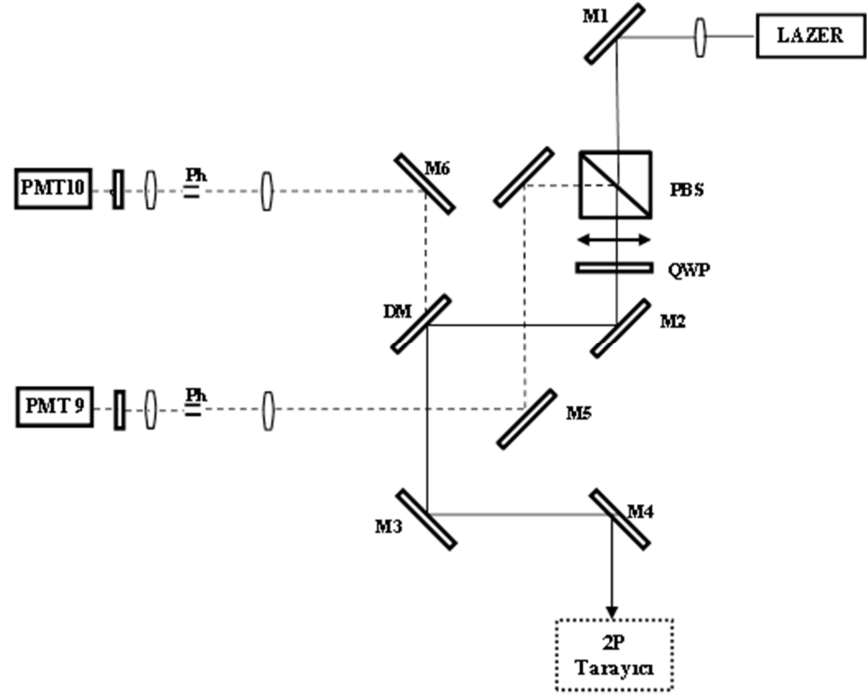


Şekil 2.5a İki foton biriminin yapısı.

Mikroskop, aynı anda iki foton ve SHG görüntülemenin yanısıra konfokal görüntülemeyi de mümkün kılan, konfokal birimini (Şekil 2.5b) barındırmaktadır. İki foton süreçleri, üçlü algılayıcı (Şekil 2.5a, PMT 3,4,5) aracılığıyla kaydedilir. Bu süreçlerde, uyartım ışığı ile yayınım ışığı aynı yolu takip etmezler (non-descanning). Konfokal floresans ve yansıma görüntülemesi, yeşil spektrumda uyartım ve kırmızı spektrumda algılama yapılabilecek şekilde (Şekil 2.5b, PMT 10) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, DsRed2 floresans ve ECM taklitlerinin konfokal yansıma ölçümleri, konfokal birimi (Şekil 2.5b) ile gerçekleştirilirken, DsRed2, eGFP floresans ve ECM taklitlerinin SHG ölçümleri iki foton birimi (Şekil 2.5a) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Konfokal birimi, ArKr lazerden (643-PERYB-A01, Melles Griot) gelen doğrusal kutuplu ışığı (568nm) kullanır. Lazer ışığı konfokal birimine fiber optik bir kablo ile bağlı olup, ünite içinde ışık paralel hale getirilir. Daha sonra ışık, PBS (Polarizing Beam Splitter cube, kutuplayıcı demet bölücü) ve doğrusal kutuplu ışığı dairesel hale getiren QWP'den (Quarter Wave Plate, çeyrek dalga plaka) geçer. Örnekten yansıyan ışığın kutuplanma yönü ters döner ve QWP'den geçip, PBS'den yansayıp algılama modülüne ulaşır. Bu yaklaşım, diğer konfokal mikroskop tasarımı (örneğin Şekil 2.1) yaklaşımlarından farklı olarak, aynı anda

yansıma ve floresans ölçümüne izin verir. Deneylerimizde, floresansı algılamak için gerekli ışık şiddetine ulaşıldığında, yansımayı algılayan dedektörün doyuma ulaşmaması için, dedektörün önüne bu ışığı zayıflatacak filtre (Absorbitive Neutral Density Filter, NE510B, Thorlabs) konulması gerekmiştir.



Şekil 2.5b Konfokal Biriminin Yapısı

İki foton birimi, tarayıcı üniteye bağlı olan TiSaph lazer ışık kaynağını kullanır. Tarayıcı ünite, objektif lensin çıkış aralığına (exit pupil) düşen ışık demetinin çapının ayarlanmasını sağlayan üçlü lens teleskopu, örnek üzerindeki ışık darbesi genişliğini 120 femtosaniyede tutmayı sağlayan sabit prizma tabanlı cıvıltı düzenleyici (chirp compensator) ve saniyede 1500'e kadar çizgi taranmasına olanak sağlayan x/y tarayıcısından ibarettir. Lazer ışığı şiddeti ise elektro-optik modülatör kullanılarak ayarlanır.

Deneyler için kullanılan TrimScope mikroskobun başarımı, Molecular Probes' PS-Speck™ mikroskop nokta kaynak seti (P7220) ve agarose jel içine ekili altın küreler kullanılarak değerlendirilmiştir. Görüntülenen küreler, nokta dağılım fonksiyonunun (point spread function) aksiyel ve yanal Yarı Maksimum Güçteki Tam Darbe Genişliği'nin (FWHM, Full Width Half Maximum) ölçülmesinde kullanılmıştır. Floresans küreler $0.175 \pm 0.005 \mu\text{m}$ ve altın küreler yaklaşık 30nm çaplarındadır. Sistemin kırınım ile sınırlı çözünürlüğünün teorik değeri yaklaşık $0.4 \mu\text{m}$ 'dir ($\text{ro}=0.61\lambda/\text{NA}$, $\text{NA}=0.9$)(Born & Wolf, 1993).

Konfokal floresans görüntüleme konfigürasyonu için teorik yarıçapsal çözünürlük 0.29 mikrondur ($FWHM_{r_0} = 0.61\lambda_{uyartım}/NA/\sqrt{1+\beta^2}$, $\beta = \lambda_{uyartım}/\lambda_{algılama}=0.9$, $NA = 0.9$)(Mueller, 2005). Konfokal floresans sisteminin teorik yanal çözünürlüğü, sonsuz küçük pinhole için 1.38 mikron ($FWHM_z = 2n\lambda_{uyartım}/NA^2/\sqrt{1+\beta^2}$) (Mueller, 2005), 20 mikron çaplı pinhole için 4.33 mikrondur ($FWHM_{z_{büyükpinhole}}=7.4na^2/\lambda/M^2$, $n=1.33$, $a=10$, $M=20$)(Kino, 1996).

Konfokal floresans konfigürasyon için yanal çözünürlüğün deneysel değerleri beklediğimizden daha kötü çıktı. Bunun nedeni, kullandığımız pinhole çapının 20 mikron (ideal çap 10 mikron olmalı) olmasıdır. Sistemin büyütmesi 20 olduğundan 20 mikron çaplı pinhole'den geçen ışık demeti, örnek üzerinde 1 mikron çaplı ışık demeti oluşturmaktadır. Bu çaptaki açıklık ise yaklaşık 2 Airy birime karşılık gelmektedir.

İki foton floresans için değerler, benzer bir düzenek kullanan çalışmadaki(Niesner, et al., 2007) ile benzer çıkmaktadır.

Mikroskobun konfokal biriminin konfigürasyonu eGFP uyartımı için uygun olmadığından, bu ölçümleri gerçekleştirmek için Zeiss Lazer Tarama Mikroskobu (LSM 510, 40x NA:1.0 WI) kullanılmıştır.

Floresans, band geçiren bir filtre (500-550nm) üzerinden toplanmıştır. Argon ve NIR (Near Infra Red, Yakın Kızılötesi) lazerin üzerinden geçmesi için çift dalgaboylu demet bölücü (HFT KP 700/488) kullanılmıştır.

2.1.2 Bağ dokusu taklitleri

2.1.2.1 İncelenen bağ dokusu taklitleri

Agarose: Polisakkarit tabanlı olan agarose, hücrelere kafes görevi sağlayan gözenekli bir yapıya sahiptir (ortalama gözenek boyutu konsantrasyon ve agarose'un türüne bağlıdır, fakat tipik olarak 100'den 300nm'ye kadardır (Griess, et al., 1989)). Agarose, tek başına hücre bağlanmasını kuvvetlendiremez. Bu bir ölçüde üç boyutlu kültür olarak kullanılmasını sınırlar (Lin, et al., 2005). Yine de Agarose, yaygın bir biçimde ekilme ortamı (embedding medium) olarak kullanılmaktadır. Örneğin, sınır mühendisliği çalışmalarında üç boyutlu iskele görevi görmektedir (Cao, et al., 2009).

Kollajen I: Pek çok dokunun bağ dokusunda bulunup, adezyon (yapışma) ve proteoliz (proteinlerin parçalanması) incelemelerine olanak sağlar. Alt deri, tendon ve kemiklerde bol bulunduğundan genellikle bu yerlerden elde edilir. Bazı uygulamaları, tümör hücresi yayılması, göçü ve fibril gelişimi olarak sayılabilir (Leavesley, et al., 1993; Seppa, 1988).

Fibrin: Fibrinojenin trombinle etkileşmesinden oluşur. Kollajene göre üstünlüğü, hücreler fibrini daha kolay şekillendirebilir ve kendi bağ dokularıyla yer değiştirebilir (Black, et al., 2009). Oldukça esnek, yumuşak bir yapıda olması ve yıkılmasının aprotinin (protein yıkımını engelliyor) ile kontrol edilebilir olmasından, fibrin önemli bir bağ dokusu bileşenidir. Kanamanın durdurulması, yara iyileşmesi ve kanser çalışmalarında kullanılır (Atala & Lanza, 2001; Jockenhoevel, et al., 2001).

Gelatin: Kollajenin denatüre biçimidir. Kollajenle kıyaslanabilir özelliklere sahiptir ve çok daha ucuzdur (Ratanavaraporn, 2006). Fakat kollajenden daha az antijen özelliği vardır (Lien, et al., 2009). Gelatin karışımlı iskeleler, kıkırdak gibi doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Huang, et al., 2005).

Puramatrix[3DM]: Sentetik peptit tabanlıdır ve çeşitli hücre kültürü deneylerinde tanımlanmış üç boyutlu mikro çevre oluşturmak için geliştirilmiştir (Ma & Elisseeff, 2005). Doğal olarak yeniden oluşturulmuş bağ dokusu taklitlerinden daha iyi hidrasyon ve besin difüzyonu özelliği vardır. Puramatrix, kalıcı(kıvamlı) ve tanımlı bir bağ dokusu mikroçevresi sağlar. Bazı uygulamaları, hücre rejenerasyonu, hücre terapisi ve ilaç dağıtım sistemini içerir.

Matrigel[BD Biosciences,California]: Doğal bağ dokusunu daha iyi temsil etmek için, çeşitli bağ dokusu proteinlerinin karışımıdır. %56 laminin, %31 kollajen IV ve %8 entaktin içerir. Matrigel, nöronlar, damara ait endotel hücreleri ve karaciğer hücreleri gibi hücrelerde bağlanma ve başkalaşımda etkilidir. Fakat agarose ve kollajen I'den daha pahalıdır.

2.1.2.2 İncelenen bağ dokusu taklitlerinin hazırlanması

Agarose, Kollajen I, Fibrin, Gelatin, Matrigel ve PuraMatrix jelleri, mikroskop lamı üzerine No 0 cam örtülerek yapılan, 20x20x2 mm boyutlu kutucuklarda hazırlanmıştır.

Agarose, %2'lik PBS(phosphate buffered saline, fosfat tamponlu tuz) solüsyonu yapıldıktan sonra mikrodalgada eritilip, lam kutucuğunda soğumaya bırakılarak hazırlanmıştır.

Kollajen I (BD Biosciences) 3mg/ml olacak şekilde: 4X kültür ortamından 250ul/ml, uygun hacimde kollajen I, son hacime 1ml eklenen su ve pH'ını ayarlamak için az hacimde 1M NaOH kullanılmak suretiyle oluşturulmuştur. Kollajen, polimerize olması için 20dk. boyunca 37°C'de lam kutucuğuna konulmuştur.

Fibrin, 3mg/ml fibrinojenin (Sigma) 2U/ml trombin çözeltisi ile karıştırılması suretiyle hazırlanmıştır.

Gelatin, %5'lik PBS solüsyonu yapıp, mikrodalgada eritilip, lam kutucuğunda soğumaya bırakılmak suretiyle hazırlanmıştır.

Matrigel, (BD Biosciences) 4°C'de eritilip lam kutucuğuna yerleştirilmiş, 20 dk. boyunca 37°C'de polimerleşmeye bırakılmıştır.

Puramatrix (BD Biosciences), üretici firmanın protokolü takip edilmek suretiyle hazırlanmıştır. PuraMatrix 1:1 ölçeğinde su ile seyreltilmiş, lam kutucuğuna 50ml'lik damla konulmuş ve PBS dikkatlice damlanın kenarına eklenmiştir. Lam, 37°C'lik inkübatör içerisine konulmuş ve PuraMatrix pH'ını dengeleyebilmek için üç defa PBS değiştirilmiştir.

2.1.3 Çift renkli işaretlenmiş hücreler

MCF-7 meme kanseri hücrelerine, histon etiketli GFP füzyon proteini ve RFP proteini beraber aktarılmıştır. Hücreler, FuGene-6 (Roche, aktarım ayırıcı) kullanılmak suretiyle aktarılmış ve Zeocin ile Blastocidin (seçici antibiyotikler) kullanılarak seçilmiştir. RFP taşıyıcı, BamHI ve NotI sınırlama bölgelerinde pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen) içine klonlanan DsRed2(Clontech) kullanılmak suretiyle yapılmıştır. Nükleer hedefli GFP, pBOS-H2BGFP taşıyıcı (BD Pharmingen) ile elde edilmiştir. Üç boyutlu kültürlerin görüntülenmesinde, çift renkli işaretlenmiş hücreler yaklaşık 1-5 milyon hücre/ml konsantrasyonunda kollajen jel içerisine konulmuştur.

2.2 Yöntem

2.2.1 Bağ dokusu taklitlerinin görüntülenmesi

ECM taklitleri, konfokal yansıma (568nm) ve SHG (780nm) yöntemleri kullanılarak görüntülenmiştir. Oto-floresansın temel olarak UV ile uyartımla oluşacağı ve mavi dalgaboylarında yayılım yapacağı farzedildiğinden, 780nm dalgaboyu seçilmiştir. SHG'yi algılamak için band geçiren filtre FF01-377/50 (Semrock) ve dikroik ayna Di01-R405-25x36 (Chroma), otofloresans için ise band geçiren filtre HQ450/100M-2p-25 (Chroma) ve dikroik ayna 505dcxr (Chroma) kullanılmıştır.

ECM taklitleri, 80µm ve 400µm derinlik için optimize edilmiş iki farklı ayar kullanılarak görüntülenmiştir. Lazer bloke edilerek elde edilen arkaplan görüntüleri, her bir matris jelin görüntüsünden çıkarılmıştır. Sensör arkaplanı çıkartılan ECM jel görüntüleri için, ışık şiddetinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Görüntü şiddeti değerleri, örnek üzerine düşen lazer gücü dikkate alınarak düzeltilmiştir. Bu düzeltmede, ışık şiddeti güç ilişkisinin, konfokal için doğrusal ve TPEF (Two Photon Excited Fluorescence, iki foton uyartımlı floresans) için ikinci dereceden olduğu dikkate alınmıştır.

Elde edilen görüntü kalitesini değerlendirmek için, ortalama ışık şiddeti ve kalite faktörü (bir görüntüdeki ortalama ışık şiddetinin en yüksek %10 ve en düşük %10'u arasındaki fark) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, ışık şiddeti ile derinlik arasındaki ilişki aşağıdaki üstel bağıntıya uydurulmuştur:

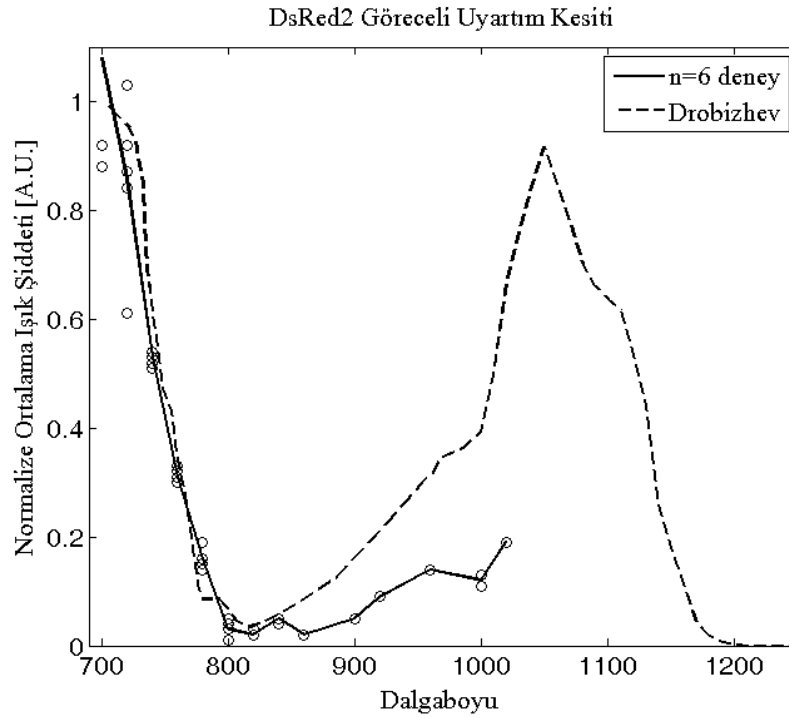
$$I(z) = I_0 e^{-\mu z} \quad (1)$$

Burada; μ zayıflama katsayısı ve z derinliği ifade etmektedir (Jacques & Gareau, 2006). Zayıflama katsayısı, soğurma çok az olduğundan, esas olarak saçılma katsayısını içermektedir. Ancak saçılma yönünden ve objektif lensin nümerik açıklığından da (NA) etkilenmektedir (Jacques & Gareau, 2006). Bu üstel denklemden, ışık şiddetinin 1/e (%37) değerine düştüğü durumdaki derinlik değeri (optik derinlik) belirlenmiş ve tüm ECM taklitleri için karşılaştırılmıştır.

2.2.2 Floresans proteinlerin görüntülenmesi

2.2.2.1 DsRed2'nin görüntülenmesi

DsRed2, mikroskobun konfokal birimi ile 568nm'de ve iki foton birimi ile 720nm ve 760nm'de uyarılıp, fotobeyazlama ve nüfuz derinliğini değerlendirmek için, kollajen I içerisine ekili (embedded) çift renkli hücreler üzerinden görüntülenmiştir. Deneylere başlamadan önce 700nm'den 1020nm'ye kadar, 20mW'lık lazer gücünde, uyartım dalgaboyu taraması yapılmış ve uyartım verimliliği sonuçlarının, düşük dalgaboyları için, önceki çalışmayla (Drobizhev, et al., 2009) uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 2.6). Şekildeki eğri deneyin altı kez (n=6) tekrarlanması sonucu elde edilmiştir.



Şekil 2.6 İki foton floresans mikroskobu ile DsRed2 için dalgaboyu taraması.

Konfokal biriminde, DsRed2'yi algılamak için, konfokal floresans PMT'nin (PMT 10 Şekil 2.5b) önüne band geçiren filtre FF01-630/92 (Semrock) yerleştirilmiştir. İki foton floresansı algılamak için aynı filtre en sondaki PMT'nin (PMT 5 Şekil 2.5a) önüne yerleştirilmiştir.

DsRed2 nüfuz derinliği deneyleri, her bir adım 4µm olmak üzere 400µm derinlik için gerçekleştirilmiştir. Konfokal floresans ve iki foton floresansın

ortalama şiddetlerinin oranının nüfuz derinliğine bağlı değişimi, konfokal görüntünün yanısıra iki foton görüntüdeki hücre ya da hücre grubu etrafında aynı dairesel ROI (ROI; Region of Interest, ilgilenilen alan) için ortalama şiddet bulunarak hesaplanmıştır. ROI seçimi, 3 boyutlu görüntü yığını boyunca tekrarlanmıştır. Konfokal floresans için elde edilen değerler ve iki foton floresans için elde edilen değerlere bölünüp, bu oranın derinlik ile değişimi elde edilmiştir. Bu oran üstel bir bağıntıya (denklem 1) eşitlenmiştir. Bağıntıdaki üstel sabit, iki yöntem arasındaki zayıflama sabiti farkını göstermektedir.

DsRed2 için fotobeyazlama, konfokal floresans (568nm 9.2µW) ve iki foton floresans (760nm 44mW ve 720nm 22mW) yöntemleri ile aynı düzlemin ardı ardına taranması sonucu yayının şiddetindeki azalma olarak değerlendirilmiştir. Güç ayarları, aynı tip PMT sensörlerde aynı ortalama yayının şiddetini verecek şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca iki foton mikroskobun optik parametrik osilatör kullanılıp dalga boyu aralığı genişletilmiş hali ile başka bir çalışmada (Andresen, et al., 2009) yapılan ölçümler yazarın izniyle kullanılmıştır. Bu çalışmada, 760nm’de yapılan ölçümler kendi ölçümlerimizdeki 760nm sonuçları ile aynı ölçeğe getirilerek, 1100nm’deki sonuçlar uyarlanmış ve uyarlanan sonuçlar diğer sonuçlarımızla karşılaştırılmıştır. Örnekler aynı derinlik noktası için ardı ardına 100 taramaya maruz bırakılmıştır. Yayının şiddeti değerleri, ilk düzlemde elde edilen şiddete göre normalize edilmiştir. Bütün eğriler, başka çalışmalarda (Gavrilyuk, et al., 2007; Moissoglu, et al., 2006) rapor edilen, iki üstel terimden oluşan aşağıdaki fonksiyona uydurulmuştur:

$$I(n) = Ae^{-\alpha n} + Be^{-\beta n} \quad (2)$$

Burada; A, B, α ve β pozitif sayılardır ve düzlem içi fotobeyazlamaya daha yoğun ve daha az maruz kalmış molekülleri ifade ederler. Daha açık ifadeyle, fotobeyazlamaya maruz kalan ve odak bölgesi içerisinde olduğundan yüksek ışık şiddeti düşen bölgeye difüzyonla gelen moleküllerin göreceli yoğunluğu A ile ifade edilirse, daha az ışık şiddeti düşen alandaki moleküllerin göreceli yoğunluğu B ile ifade edilir. α ve β ise, her iki bölgenin fotobeyazlama oranlarını temsil etmektedir.

Objektif lens üzerine düşen ışık demet çapının fotobeyazlamaya etkisi, 20x objektif lensin (XLUMPLFL, Olympus) arka açıklığı üzerinde birisi 13mm, diğeri 18mm çapındaki iki farklı demet için karşılaştırılmıştır. Lazer gücü, iki demet çapı

için odakta aynı olacak şekilde ayarlanmıştır. Şiddet azalması denklem 2'ye uydurulmuştur.

Ayrıca, üç boyutlu görüntü yığını, düzlem dışı fotobeyazlamayı incelemek için, adım miktarı $1\mu\text{m}$ olmak üzere $40\mu\text{m}$ derinliğe kadar 40 kez ölçülmüş ve iki yöntem arasındaki fark analiz edilmiştir.

2.2.2.2 eGFP'nin görüntülenmesi

eGFP'nin konfokal ve iki foton floresans yöntemleri ile görüntülenmesini karşılaştırmak için LSM 510 (Zeiss) mikroskobu kullanılmıştır. Konfokal ölçümleri için 488nm ($102\mu\text{W}$) ve iki foton floresans ölçümleri için 920nm (22mW) seçilmiştir. Her iki yöntem için yapılan deneylerde aynı PMT kullanılmış ancak iki foton floresans için pinhole tamamen açılmıştır.

Kollajen jel içerisine konulan çift renkte işaretlenmiş hücrelerden eGFP, adım miktarı $4\mu\text{m}$ olmak üzere $476\mu\text{m}$ derinliğe kadar görüntülenmiştir. Hücre görüntüleri, ilk kez $120\mu\text{m}$ 'de ortaya çıkmıştır. Eğriler, DsRed2 ile benzer şekilde elde edilmiştir. Üstel şiddet düşümü ile ilgili veri, hücrelerin yığında nerede gözlendiğine bağımlı değildir. Çünkü kollajen yoğunluğu örneklerde sabit tutulduğundan, zayıflama da sabit olmaktadır.

2.2.2.3 Çift renkli işaretlenmiş hücrelerin konfokal ve iki foton ile birleşik görüntülenmesi

Birleşik konfokal ve iki foton floresans görüntüleme sisteminin gösterimi için, çift renkli hücreler kollajen I içerisine konulup, konfokal yansıma, SHG ve iki foton floresans mikroskopi yöntemleri ile görüntülenmiştir. eGFP ve SHG (920nm 'de) için kullanılan filtre ve dikroik aynalar şunlardır:

- Band geçiren filtreler FF01-525/50 (Semrock) ve FF02-460/80 (Chroma),
- 490dcxr (Chroma) dikroik ayna (SHG'yi yansıtmak için),
- FF568-Di01 (Semrock) dikroik ayna (eGFP'yi, eGFP PMT (PMT4, Şekil 2.5a) ve SHG PMT (PMT3, Şekil 2.5a) üzerine yansıtmak için).

Konfokal PMT'ler, DsRed2'yi ve konfokal yansımayı kaydetmek için önceden anlatıldığı biçimde düzenlenmiştir. Belirtilmesi gereken önemli bir nokta da şudur: 780nm'de ECM taklitlerinin görüntülenmesinde elde edilen sinyal, 920nm'de elde edilene göre daha güçlüdür çünkü SHG şiddeti kısa dalgaboylarında artmaktadır (Zipfel, et al., 2003).

2.2.3 Hücre görüntülerinin üç boyutlu modellenmesinde görüntü iyileştirme

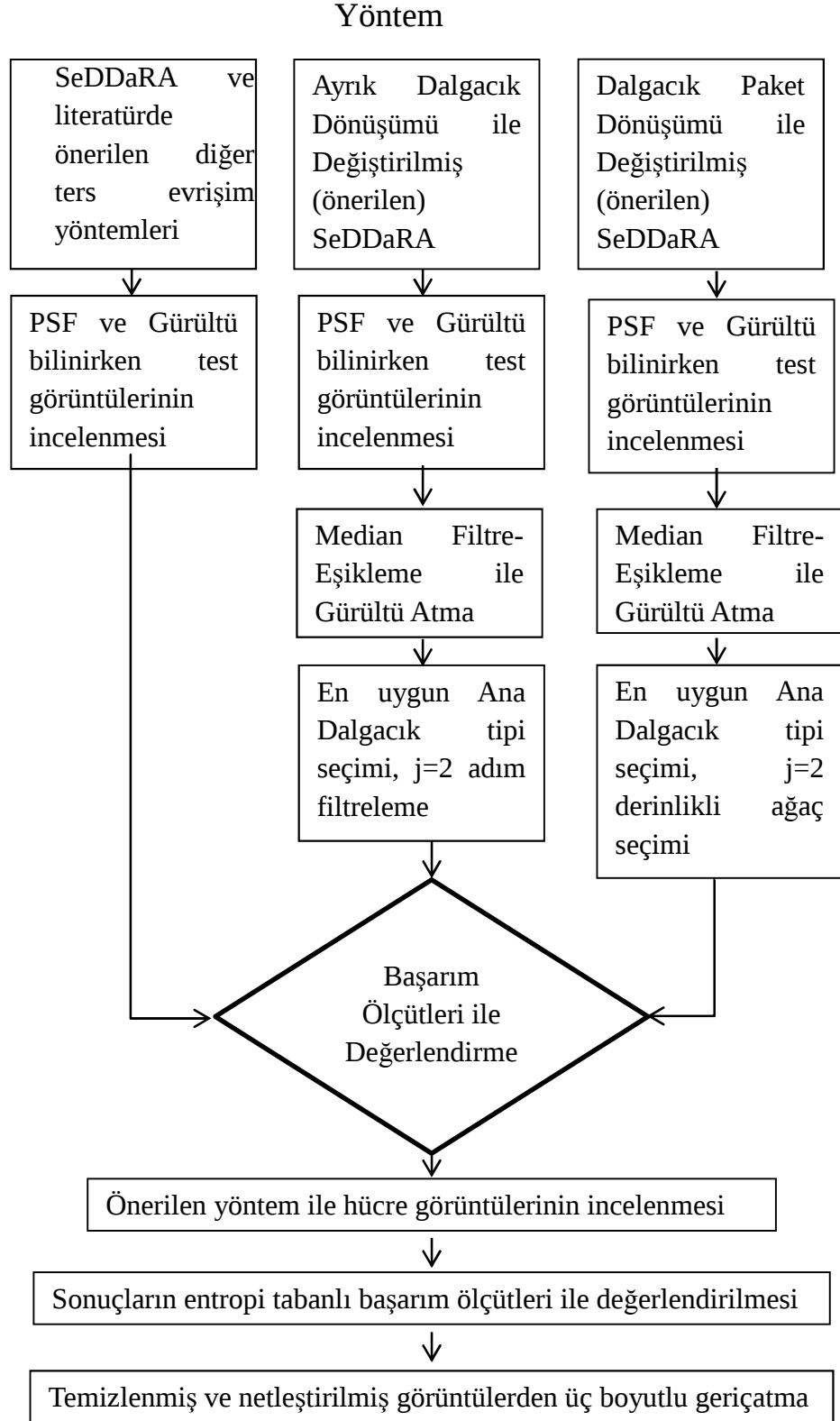
Bu kısımda elde edilen hücre görüntülerinden; üç boyutlu, daha temiz ve net bir görüntü elde edebilmek için kullanılan görüntü işleme yöntemlerinden bahsedilmiştir. Konfokal ve iki foton mikroskopi yöntemlerinde ya da daha genel ifadeyle floresans görüntüleme bozucu etki, mikroskop optiğinden (PSF, point spread function ile modellenen) ve gürültüden kaynaklanmaktadır.

Fotodedektörde, foton yayınının rasgele doğasından kaynaklanan foton vuru gürültüsü temel gürültü kaynağıdır. Bu süreç, Poisson model ile modellenebilir. Ek olarak, ısı gürültü ve okuma gürültüsü gibi sinyalden bağımsız gürültü etkileri de vardır. Sinyalden bağımsız gürültünün toplam etkisi normal dağılımlı farzedilebilir. Ancak görüntüleme donanımındaki son gelişmeler, gürültünün sadece foton vuru gürültüsü olarak alınıp diğer etkilerin ihmal edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda; gürültü atma (denoising) işlemi ve ters evrişim işlemi yapılmıştır. Ters evrişimde amaç, netlik kaybını (blurring) gidermektir.

Bu çalışmada Fourier tabanlı bir ters evrişim yöntemi olan SeDDaRa yönteminin (Caron, et al., 2002) Dalgacık Dönüşümü tabanlı yeni bir türü geliştirilmiştir. Önerdiğimiz ters evrişim yönteminde gürültü temizleme de yapılmaktadır. Temizlenmiş ve netleştirilmiş görüntüler, ImageJ programının eklentisi olan Volume Viewer (Barthel, 2005) ile 3 boyutlu olarak geri-çatılmıştır.

Kullandığımız yöntemler hücre görüntülerine uygulanmadan önce, bilinen temiz görüntüler üzerinde test edilmiştir. Görüntü kalitesi; RMSE, başka bir çalışmada (Gabarda, et al., 2007) önerilen AQI (Anisotropic quality index, yöne bağımlı kalite indisi) ölçütü ve geliştirdiğimiz entropi tabanlı kalite ölçütü ile değerlendirilmiştir. Referans görüntünün bilinmediği durumlarda, görüntü kalitesinin netleştirme anlamında değerlendirilmesinde önerdiğimiz dalgacık entropisi tabanlı görüntü kalitesi parametresinin (De & Sil, 2010; Gabarda, et al., 2007) oldukça uygun düştüğü görülmüştür.

Zıtlık arttırımı ve gürültü atmayı içeren, görüntü iyileştirme aşamasında kullanılan genel işlem akışı Şekil 2.7’de verilmektedir.



Şekil 2.7 Görüntü iyileştirme işlem akış şeması.

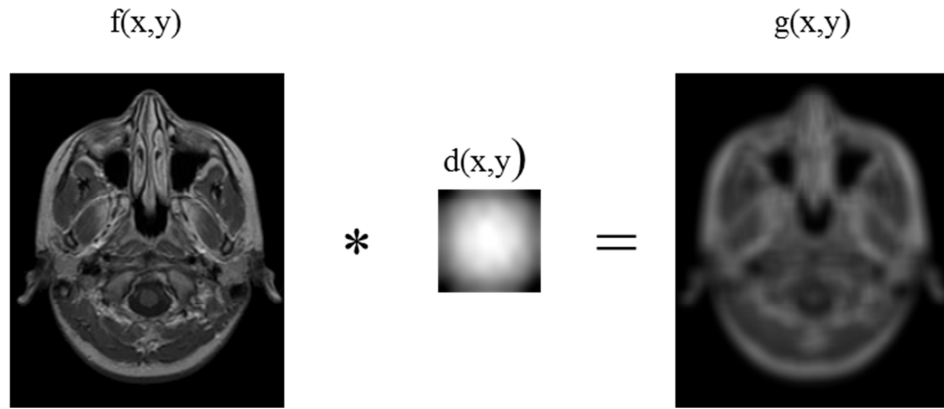
2.2.3.1 Ters evrişim yöntemleri

Bulanıklaşma; temiz görüntünün sistem PSF'i ile evrişimi (convolution) olarak ifade edilir. Ters evrişim; istenilmeyen bu evrişim etkisini telafi etmek için, sinyalin (görüntünün) filtrelenmesi (netleřtirilmesi) sürecidir. Evrişim işlemi, şekil 2.8'de örnek bir görüntü üzerinden verilmektedir.

Pek çok görüntüleme uygulaması için görüntünün bozulmasını, $f(x,y)$ gerçek görüntü, $*$ evrişim operatörü, $d(x,y)$ nokta dağılım fonksiyonunu (PSF), $w(x,y)$ gürültü ve $g(x,y)$ kaydedilen görüntüyü temsil etmek üzere řu şekilde modelleyebiliriz:

$$g(x,y) = f(x,y) * d(x,y) + w(x,y) \quad (3)$$

Ters evrişim; $f(x,y)$ 'nin kestirimini, $g(x,y)$ 'den elde etme iřlemidir. Ancak, hiçbir zaman ideal(gerçek) görüntü tekrar elde edilemez. Fakat gerçek görüntünün kestirimi, ters evriřimle daha iyi çözünürlükte ve daha yüksek işaret gürültü oranında (SNR, signal to noise ratio) elde edilebilir.



şekil 2.8 Evrişim işlemi.

Floresans görüntülemelerde PSF, odak düzlemindeki noktasal kaynak tarafından görüntü düzleminde üretilen benek ya da mikroskop optiğinden kaynaklanan evrişimin bir ölçümü olarak tanımlanabilir. PSF, deneysel olarak mikroskobun (görüntüleme sisteminin) çözünürlüğünden daha küçük floresans yapan küreler kullanılarak ölçülebilir. Analitik olarak da, Gibson ve Lanni'nin (Gibson & Lanni, 1992) klasik kırınım temelli modeli ile hesaplanabilir. Üçüncü yöntem de, PSF'in bilinmediğı ve kaydedilen görüntüden kestirildiğı durumdur.

Floresans mikroskopi görüntülemeye kullanılan ters evrişim yöntemlerini kısaca aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (Sarder & Nehorai, 2006):

Doğrusal Yöntemler

En basit yöntemlerdir. Yinelemeli (iterative) olmadıklarından oldukça hızlıdır. Tipik gürültü seviyeleri için kullanılırlar.

Görüntünün bozulmasında, denklem 3'deki modelde, gürültünün ihmal edilebileceğini farzederek (gürültüyü ele almama ters filtrenin en önemli götürüsüdür), Fourier dönüşümünü alarak, G, F, D sırasıyla $g(x,y), f(x,y), d(x,y)$ 'nin Fourier dönüşümü olmak üzere, $G=F.D$ ifadesini elde ederiz. Ters evrişim probleminin doğrudan çözümü, F 'i elde etmek için basitçe G 'yi D 'ye bölmektir. F 'in ters Fourier dönüşümü alınması suretiyle net görüntü f elde edilir. Bu işleme, ters filtreleme denir. Ancak D 'nin sıfıra yakın değerler aldığı durumda, ters filtreleme az bir miktardaki gürültüyü ciddi oranda kuvvetlendirir (McNally, et al., 1999). Bu kararsızlığı gidermenin en basit yolu, ε küçük pozitif bir sabit olmak üzere:

$$f(x, y) = \begin{cases} \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{G(u, v)}{D(u, v)} \right\}, & |D(u, v)| \geq \varepsilon \\ 0, & |D(u, v)| \leq \varepsilon \end{cases} \quad (4)$$

ifadesindeki gibi sınırlama getirmektir. Ters filtrenin daha ileri düzeyde kararlı hali Wiener filtredir (Wiener, 1949):

$$f(x, y) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{1}{D(u, v)} \frac{|D(u, v)|^2 G(u, v)}{|D(u, v)|^2 + K} \right\} \quad (5)$$

Burada K ; gürültünün güç spektrumunun net görüntünün güç spektrumuna oranıdır. Ancak pratikte net görüntünün güç spektrumu çok nadir bilineceğinden, K en iyi görsel durumu elde edecek şekilde seçilen pozitif bir sabit (0.001-0.1 aralığında) olarak alınır (Agard, et al., 1989). Denklem 5'deki $G(u,v)$ ifadesi, $G=DF+W$ şeklinde açık yazılınca paydada yer alan K sabitinin artmasının, gürültü (W) ifadesini küçülttüğü daha rahat görülebilir. Ancak K sabitinin artması, gürültüyü azaltırken görüntünün görsel olarak bozulmasına neden olacağından, K için en uygun tercih yapılmalıdır.

Eğer d alçak geçiren filtre ise, Wiener filtresi band geçiren filtre gibi davranır. Yüksek ve düşük frekansları zayıflatırken, orta frekansları güçlendirir. Bu nedenle ortalama gürültüye sahip görüntülerde kullanışlıdır.

Doğrusal yöntemlerin bir üstünlüğü de, Fourier Dönüşümü ile etkili bir biçimde uygulanabilmeleridir. Ancak PSF'daki hatalara (gürültüden kaynaklanan yanlış tahminine) karşı çok duyarlıdırlar (Sarder & Nehorai, 2006). Bunun yanı sıra, özellikle kenarlara yakın yerlerde ve kullanılan sınır koşulları nedeniyle görüntü sınır bölgelerinde, gölge benzeri hatalara neden olurlar (Elhayek, 2010). Doğrusal yöntemlerin bu eksikliklerinden dolayı daha fazla iyileştirme için doğrusal olmayan yöntemlere ihtiyaç vardır.

Doğrusal Olmayan Yöntemler

Bu yöntemler doğrusal yöntemlerin eksiklerini gidermek için çeşitli kısıtlamalar (negatif olmama gibi) getirir. Ancak yinelemeli olduklarından işlem hacimleri daha fazladır.

Yinelemeli Sınırlanmış Tikhonov-Miller algoritması (ICTM, Iterative Constrained Tikhonov-Miller algorithm), mikroskopi görüntülerinin iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılan, doğrusal olmayan bir ters evrişim yöntemidir. ICTM algoritmasında, gürültünün toplamsal Gauss gürültüsü olarak modellenebileceği varsayılır. Tikhonov; iyi bilinen Tikhonov fonksiyoneli, ε gürültü varyansının bir tahmini ve ρ bir enerji sınırı olmak üzere:

$$\varphi(f) = \|g - d * f\|^2 + \left(\frac{\varepsilon}{\rho}\right)^2 \|f\|^2 \quad (6)$$

tanımlamıştır. ICTM algoritması, $\varphi(f)$ için minimum değeri, her yinelemeden sonra negatif değerleri sıfır alarak araştırır. Yinelemeli arama işlemi, genelde eşlenik türev (conjugate gradient) optimizasyonu temelli yapılır.

Doğrusal olmayan yöntemlerin götürülerinden birisi, istatistiksel yöntemler gibi bir gürültü azaltma önlemi olmamasıdır.

İstatistiksel Yöntemler

Bu yöntemler ters evrişim problemini, gürültü barındıran $g(x,y)$ ölçümünden, bilinmeyen $f(x,y)$ nesnesinin tahmini olarak ele alırlar. Bu bakış açısı, Kestirim Teorisinden (Estimation Theory) iyi bilinen pek çok yöntemi kullanma imkanı verir. Bunlardan en yaygın olanları En Büyük Olabilirlik Kestirimi ve Bayes Kestirimi'dir (Shah, 2006).

Bu yöntemler, gürültünün fazla olduğu durumlarda diğer yöntemlere daha etkin çözüm sunarlar. Ancak doğrusal ve doğrusal olmayan yöntemlere göre işlem yükü oldukça fazladır.

Kör ters evrişim yöntemleri

Yukarıda bahsi geçen yöntemlerin hepsi PSF'in tam olarak bilindiği (ya da modellendiği) durumlar için geliştirilmiştir. Ancak uygulamada PSF'i tam olarak bilmek zordur. Deneysel PSF ölçümleri her zaman gürültü barındırır. Teorik PSF modellemeleri de mikroskop optiğinin tüm parametrelerini belirleyemez. Kör ters evrişim yöntemleri, hem mikroskopun PSF'i hem de görüntü için aynı anda tahminde bulunurlar.

Richardson-Lucy (RL) algoritması, floresans mikroskop görüntülerinin iyileştirilmesinde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. RL algoritması tabanlı ve gürültüyü Poisson olarak ele alan kör ve yinelemeli bir ters evrişim algoritmasının parametreleri, i her denklemin, k ise algoritmanın yineleme sayısı olmak üzere :

$$d_{i+1}^k(x, y) = \left\{ \left[\frac{g(x, y)}{d_i^k(x, y) \otimes f^{k-1}(x, y)} \right] * f^{k-1}(-x, -y) \right\} d_i^k(x, y) \quad (7)$$

$$f_{i+1}^k(x, y) = \left\{ \left[\frac{g(x, y)}{f_i^k(x, y) \otimes d^{k-1}(x, y)} \right] * d^{k-1}(-x, -y) \right\} f_i^k(x, y) \quad (8)$$

şeklinde verilebilir (Sarder & Nehorai, 2006). RL algoritması, gürültüye çok duyarlıdır.

2.2.3.2 Önerilen ters evrişim yöntemi

Üzerinde değişiklik yaptığımız SeDDara yöntemi, Fourier tabanlı, yinelemeli olmayan, kör (PSF bilinmeyen) bir ters evrişim yöntemidir. Kirli

görüntü $g(x,y)$, temiz görüntü $f(x,y)$, gürültü $w(x,y)$ ve nokta dağılım fonksiyonu $d(x,y)$ ile ifade edilirse, şu bağıntıyı yazabiliriz:

$$g(x, y) = f(x, y) * d(x, y) + w(x, y) \quad (9)$$

Burada amaç; temiz görüntü $f(x,y)$ 'i, elimizde bulunan görüntüden, gürültü ve görüntüleme sisteminin bozucu etkisinin bilinmediği (PSF bilinmeden) durumda en iyi şekilde tahmin edebilmektir. Her iki tarafın Fourier dönüşümünü alırsak:

$$G(u, v) = F(u, v)D(u, v) + W(u, v) \quad (10)$$

ifadesini yazabiliriz. Burada u,v frekans uzayındaki koordinatları temsil etmektedir. Denklem 10'un her iki tarafı $D^*(u,v)$ ile çarpılırsa aşağıdaki ifade elde edilir:

$$G(u, v)D^*(u, v) = F(u, v)|D(u, v)|^2 + W(u, v)D^*(u, v) \quad (11)$$

Denklemin her iki tarafı $F(u,v)$ ile bölünür ve $F(u,v)$ yalnız bırakılırsa:

$$F(u, v) = \frac{G(u, v)D^*(u, v)}{|D(u, v)|^2 + \frac{W(u, v)D^*(u, v)}{F(u, v)}} \quad (12)$$

ifadesi bulunur. Paydadaki ikinci terimin yerine gürültünün kuvvetlenmesini engelleyici bir değişken olarak, K ($|D(u,v)|$ 'nin ortalamasının %1'i) seçilmesi uygun olacaktır (Caron, 2011). Sonuç olarak ters evrişimi, ters filtre (pseudoinverse filter) kullanarak şu şekilde ifade edebiliriz:

$$F(u, v) = \frac{G(u, v)D^*(u, v)}{|D(u, v)|^2 + K} \quad (13)$$

Literatürde (Caron, et al., 2002) $D(u,v)$ şu şekilde kabul edilmiştir:

$$D(u, v) = [K_G S\{|G(u, v) - W(u, v)|\}]^{\alpha(u,v)} \quad (14)$$

Burada $\alpha(u,v)$ ayarlama parametresidir, K_G de $|D(u, v)| \leq 1$ olacak şekilde seçilen gerçel ve pozitif bir sayıdır. S ifadesi uygulanacak filtreyi (smoothing filter) temsil etmektedir. Ayrıca $\alpha(u,v)$, $0 \leq \alpha(u,v) < 1$ olacak şekilde seçilmelidir.

Basitleştirmek açısından $W(u,v)$ 'yu ihmal edip, filtrelemeyi (smoothing filter) uygularsak denklem (10)'u şu şekilde ifade edebiliriz:

$$D(u, v) = \frac{S\{|G(u, v)|\}}{S\{|F(u, v)|\}} \quad (15)$$

$D(u,v)$ 'nin yavaş değişen bir fonksiyon olduğu farzedilerek, yumuşatma operatörünün (S) etkisi kaldırılmıştır.

$\alpha(u,v)$ 'yi çözmek için denklem 15'deki $D(u,v)$ ifadesini denklem 14'de yerine koyarsak:

$$\begin{aligned} \frac{S\{|G(u, v)|\}}{S\{|F(u, v)|\}} &\approx \frac{K_G S\{|G(u, v)|\}}{K_{F'} S\{|F'(u, v)|\}} \\ &= [K_G S\{|G(u, v)|\}]^{\alpha(u,v)} \end{aligned} \quad (16)$$

elde ederiz. Burada K_G ve $K_{F'}$, $|D(u,v)| \leq 1$ olması için $K_G = 1/\text{Max}[S\{|G(u,v)|\}]$ ve $K_{F'} = 1/\text{Max}[S\{|F'(u,v)|\}]$ olarak alınmıştır. Gerçek görüntü $F(u,v)$ bilinemediği için yerine $F'(u,v)$ (mikroskop görüntü yığınının ortalaması) alınmıştır (Caron, 2011). Burada yumuşatma filtresinin varlığında, aşağıdaki ifade sağlanmalıdır:

$$K_{F'} S\{|F'(u, v)|\} \approx K_F S\{|F(u, v)|\} \quad (17)$$

Denklem (16)'dan $\alpha(u,v)$ 'yi her iki tarafın logaritmasını almak suretiyle çekecek olursak:

$$\alpha(u, v) \approx \frac{\text{Ln}[K_G S\{|G(u, v)|\}] - \text{Ln}[K_{F'} S\{|F'(u, v)|\}]}{\text{Ln}[K_G S\{|G(u, v)|\}]} \quad (18)$$

elde ederiz.

Sonuç olarak $D(u,v)$ (bizim için PSF tahmininin Fourier dönüşümünü ifade ediyor) şu şekilde ifade edilebilir:

$$D(u, v) = [K_G S\{|G(u, v)|\}]^{\alpha(u,v)} \quad (19)$$

Çalışmamızda kirli görüntünün filtrelenmesi sırasında Ayırık Dalgacık Dönüşümü kullanılmıştır. Önerdiğimiz ters evrişim işleminde, denklem 13’de yer alan $G(u,v)$ ve denklem 19’da yer alan $S\{G(u,v)\}$ filtrelenmiş görüntünün Fourier dönüşümünü ifade etmektedir.

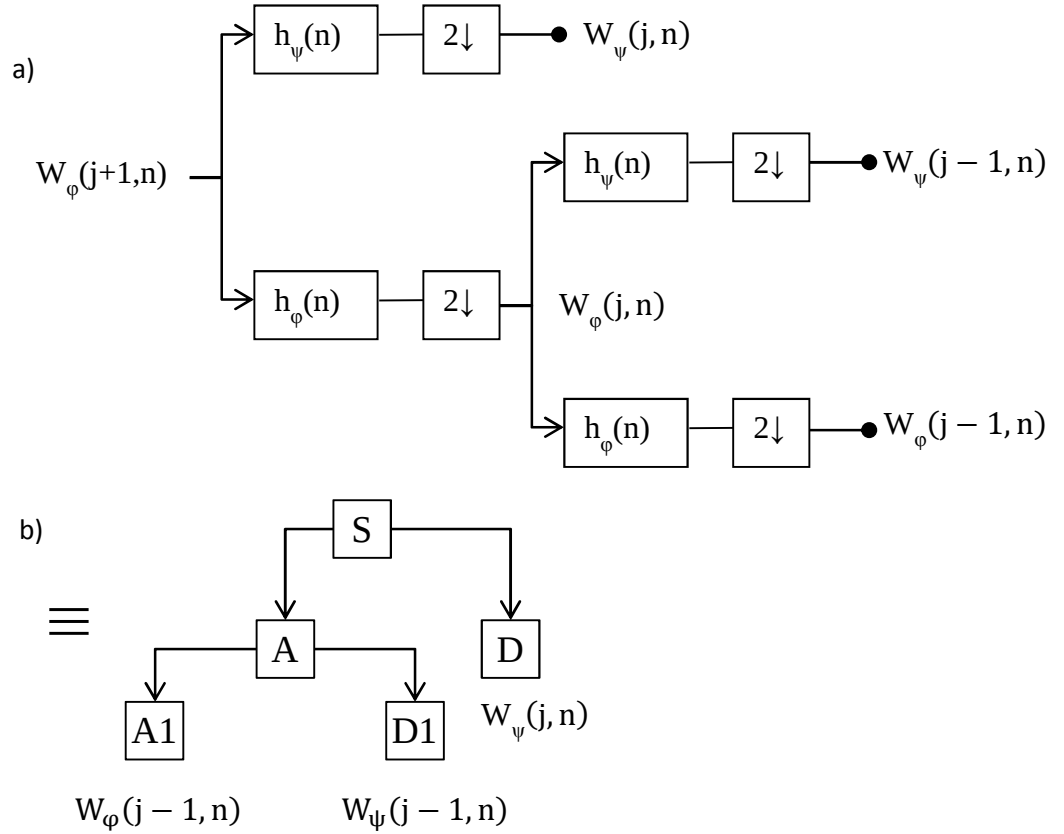
Dalgacık Analizi

Fourier Dönüşümü, 1950’lere kadar dönüşüm temelli görüntü işlemede ana akım olsa da daha yeni bir dönüşüm olan Dalgacık Dönüşümü, görüntü analizini ve sıkıştırmasını daha kolay hale getirmiştir (Gonzalez & Woods, 2008). Dalgacık dönüşümü ile görüntünün birden fazla çözünürlükte temsili ve analizi, pek çok uygulama için etkin bir yöntem olması nedeni ile son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir (Mallat, 1989). Dalgacık Dönüşümü, görüntü işlemede en çok, gürültü temizleme, görüntü sıkıştırma (Bernas, et al., 2006; Grgic, et al., 2001; Shapiro, 1993), görüntüdeki baskın etkilerin yeri (Olivo-Marin, 2002) ve kenar algılamada kullanılır (Willett & Nowak, 2003).

Klasik Fourier Dönüşümü ile sadece frekans bilgisini elde ederiz, zaman bilgisi yok olur. Dalgacık Dönüşümü ile sinyale(görüntüye) hem zaman(veya konum) hem de ölçek (frekans) perspektifinden bakarız. Kısa Zamanlı Fourier Dönüşümünde, zamanda pencerelenmiş işaretin Fourier Dönüşümü alınmakta, pencere kaydırılıp tüm işaret taranarak aynı işlem devam etmektedir. Böylece zaman boyutu eklenmiş olsa da, pencere fonksiyonu tüm frekanslar için aynıdır. Yani yüksek ve alçak frekanslar için pencere genişliği sabittir. Dalgacık Dönüşümünde, değişken boyutlu pencere kullanıldığı için, çoklu çözünürlükte analiz imkanı sağlanır.

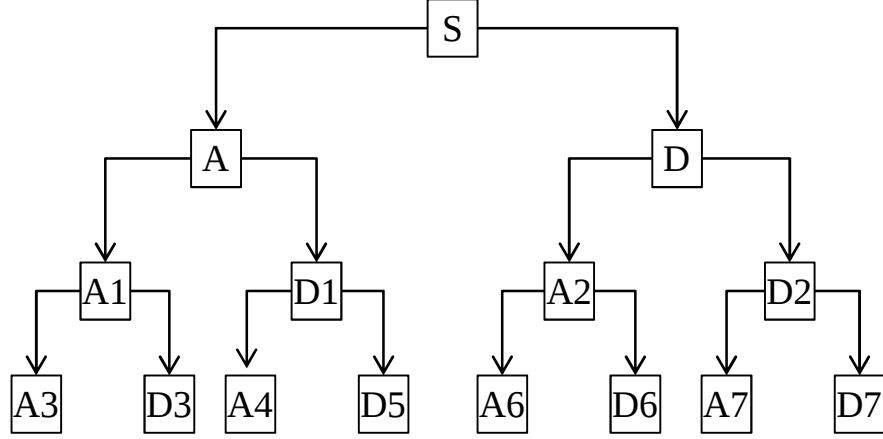
Fourier Dönüşümünde taban fonksiyonları karmaşık üstellerdir. Dalgacık Dönüşümünde ise geçici ve zamanla değişen bileşenler içeren sinyal ve görüntüleri en iyi şekilde temsil ve analiz edebilmek için, aynı anda zaman ve frekans boyutunda sınırlandırılmış yeni taban fonksiyonları geliştirilmiştir. Bu fonksiyonlara, pek çoğu kısa süreli dalga veya gittikçe çöken görünümünde olduğundan dalgacık adı verilmiştir. Dalgacık, ölçekleme ile genişletilip-sıkıştırılabilir ve ayrıca zaman ortamında ötelenebilir. Dalgacık Dönüşümünde sinyal (ya da görüntü) ölçeklenmiş ve ötelenmiş ana dalgacık ile temsil ve analiz edilir. Dalgacık Dönüşümünde yaygın olarak kullanılan ana dalgacık türleri Haar, Daubechies, Coiflet, Symlet, Morlet ve Meyer’dir (Mallat & Peyré, 2009).

Ayrık Dalgacık Dönüşümü (ADD) ile bir sinyal, alçak frekans bileşenlerini içeren yaklaşım (approximation) ve yüksek frekans bileşenlerini içeren ayrıntı (detail) alt bileşenlerine ayrılır. Daha sonra yaklaşım bileşeni tekrar alt bileşenlerine ayrılır ve istenen çözünürlüğe ulaşıncaya kadar bu işlem devam eder. Şekil 2.9a,b’de ADD’de sinyalin herhangi bir j çözünürlüğü için yaklaşım ve ayrıntı katsayılarının elde edilmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.9 : Ayrık Dalgacık Dönüşümü, a. Bir boyutlu sinyal analiz filtre bankası b. Eşdeğer gösterim, S sinyal, A yaklaşım, D ayrıntı anlamında kullanılmıştır.

Dalgacık Paket Dönüşümünde (DPD) ise yaklaşım bileşeninin yanısıra ayrıntı alt bileşeni de alçak ve yüksek frekans bileşenlerine ayrılır. Bu durum Şekil 2.10’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10 : Dalgacık Paket Dönüşümü

İki Boyutlu Ayırık Dalgacık Dönüşümü: İki boyutlu Fourier Dönüşümünü hatırlarsak tek boyutlu taban fonksiyonu $e^{-i\omega t}$, iki boyutlu taban fonksiyonu $e^{-i(\omega_1 t_1 + \omega_2 t_2)}$ ’ye dönüşür. İki boyutlu Dalgacık Dönüşümü için de, dönüşüm katsayısı iki değişkenli fonksiyona dönüşür. Ölçekleme ve dalgacık fonksiyonları iki değişkenli fonksiyonlardır ve $\varphi(x,y)$ ve $\psi(x,y)$ ile gösterilirler ve ayrılabilir fonksiyonlardır (Gonzalez & Woods, 2008):

$$\varphi(x, y) = \varphi(x)\varphi(y) \quad (20)$$

$$\psi^Y(x, y) = \psi(x)\varphi(y)$$

$$\psi^D(x, y) = \varphi(x)\psi(y)$$

$$\psi^K(x, y) = \psi(x)\psi(y)$$

Burada; Y yatay, D dikey ve K köşegen anlamlıdır. Görüntüler için yöne duyarlı bu dalgacıklar farklı yönlerdeki gri seviye değişimlerini ölçmektedirler. $\psi^Y(x,y)$ sütunlar boyunca olan değişimlere (örneğin yatay kenarlar), $\psi^D(x,y)$ satırlar boyunca olan değişimlere (örneğin dikey kenarlar) ve $\psi^K(x,y)$ köşegenler boyunca olan değişimlere karşılık gelir.

Bir işaret ya da fonksiyon taban fonksiyonları kullanılarak daha iyi analiz edilebilir. İki boyutlu ayırık dalgacık dönüşümünde kullanılan ölçeklenmiş ve ötelenmiş taban fonksiyonları şu şekilde tanımlanabilir:

$$\varphi_{j,m,n}(x,y) = 2^{j/2} \varphi(2^j x - m, 2^j y - n) \quad (21)$$

$$\psi_{j,m,n}^i(x,y) = 2^{j/2} \psi(2^j x - m, 2^j y - n) \quad i = \{Y, D, K\}$$

Bu ifade de j ölçeği (eksenler boyunca ne kadar dar ya da geniş olduğunu), $2^{j/2}$ ise yüksekliği veya genliği kontrol eder. Diğer değişkenler m ve n ise konumla ilgilidirler.

Aşağıda $M \times N$ boyutlu $f(x,y)$ fonksiyonunun ayrık dalgacık dönüşümü verilmiştir:

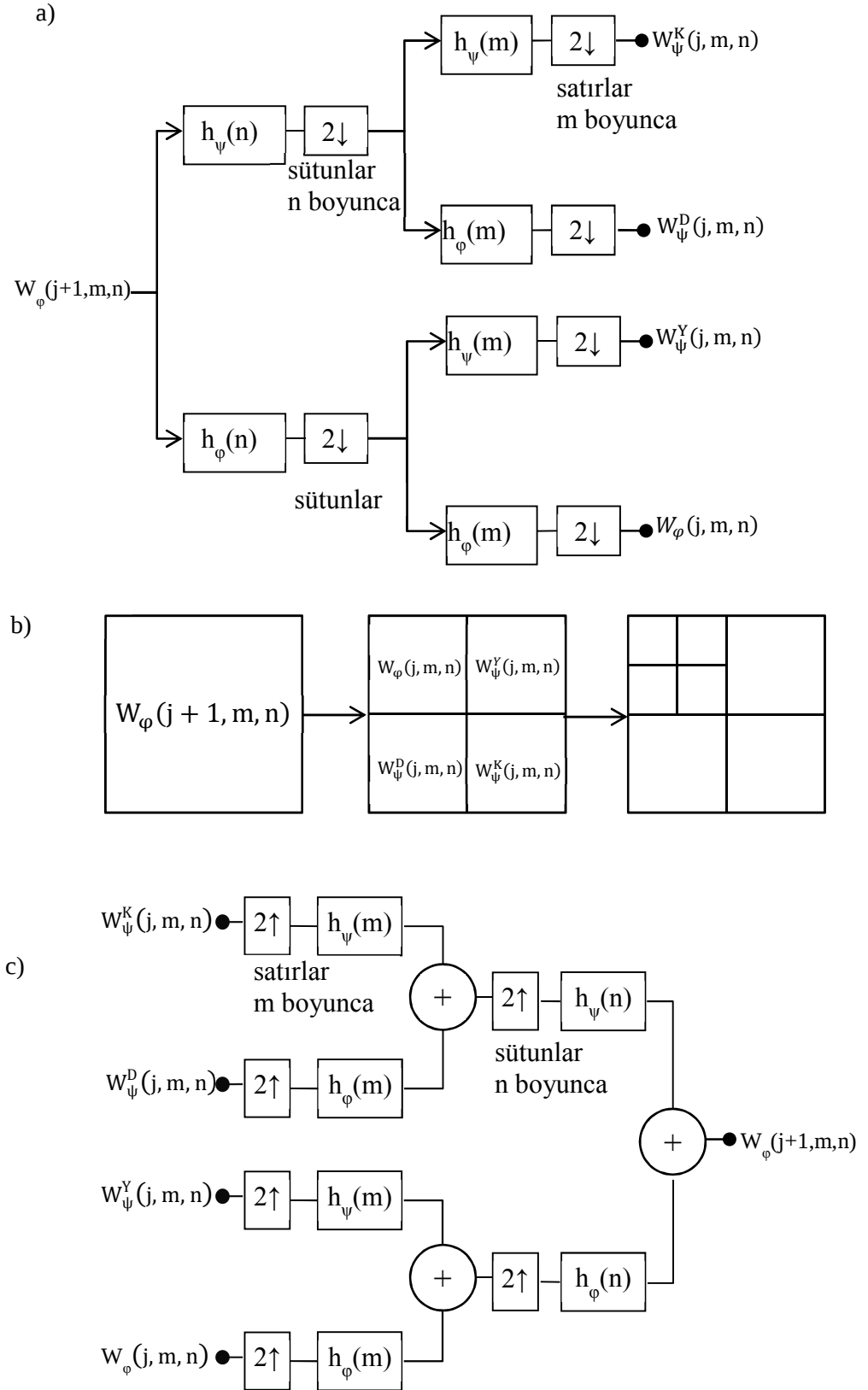
$$W_\varphi(j_0, m, n) = \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x,y) \varphi_{j_0,m,n}(x,y) \quad (22)$$

$$W_\psi^i(j, m, n) = \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x,y) \psi_{j,m,n}^i(x,y)$$

Bu ifadede j_0 rasgele bir ölçek ve $W_\varphi(j_0, m, n)$ katsayıları ise j_0 ölçeğinde $f(x,y)$ 'nin bir yaklaşımıdır. $W_\psi(j, m, n)$ ise $j \geq j_0$ ölçekleri için yatay, dikey ve köşegen detayları ekler. Denklem 22'de verilen bu katsayılar kullanılarak, $f(x,y)$ ters ayrık dalgacık dönüşümü ile elde edilir.

$$\begin{aligned} f(x,y) = & \frac{1}{\sqrt{MN}} \sum_m \sum_{n_\infty} W_\varphi(j_0, m, n) \varphi_{j_0,m,n}(x,y) \\ & + \frac{1}{MN} \sum_{i=Y,D,K} \sum_{j=j_0} \sum_m \sum_n W_\psi^i(j, m, n) \psi_{j,m,n}^i(x,y) \end{aligned} \quad (23)$$

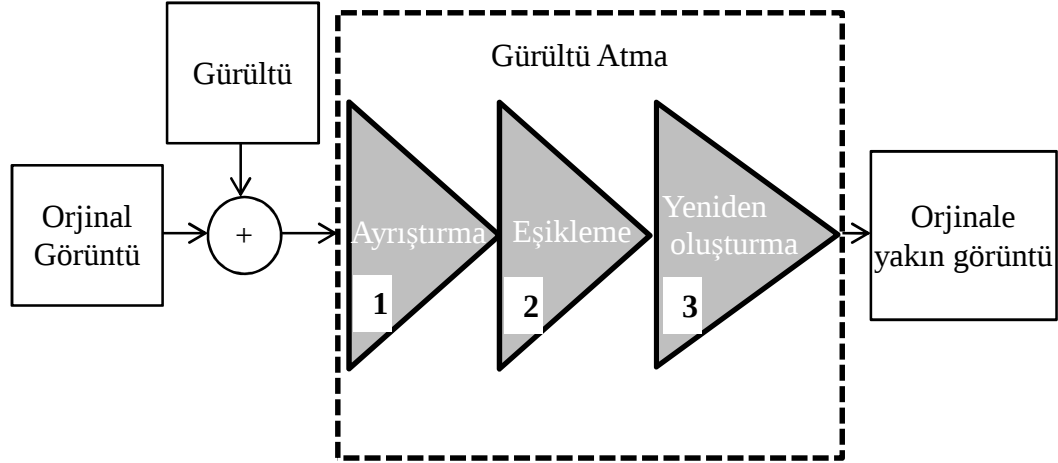
Dalgacık dönüşümünde her dallanma kolu; filtreleme ve aşağı örnekleme (down sampling) ile gerçekleştirilebilir. İlk adımda giriş görüntüsünden filtreleme ile düşük ve yüksek frekans bileşenleri elde edilir. İkinci adımda filtrelenmiş çıkışlar ikiyle aşağı örneklenir. Filtrelenmiş görüntüler, asıl görüntünün yarısı kadar bant genişliğine sahip olduğundan aşağı örnekleme işlemi bilgi kaybına neden olmaz. Son aşamada da filtreleme ve aşağı örnekleme ile 4 alt görüntü elde edilir. Sentez işleminde analiz işlemindeki adımların tersi yapılır ve görüntü elde edilir. Dalgacık Dönüşümünde görüntünün analiz ve sentezi Şekil 2.11-a,b,c'de özetlenmiştir.



Şekil 2.11a,b,c : a.Hızlı dalgacık dönüşümü analiz filtre bankası. Alçak ve yüksek geçiren filtreler kullanılarak görüntünün herhangi bir j çözünürlüğündeki dönüşüm katsayılarının bulunması b. Görüntünün alt bantlara ayrılması c. Sentez filtre bankası.

Dalgacık Dönüşümü ile Gürültü Atma

Dalgacık dönüşümü ile gürültü atma işlemi, genel olarak üç aşamadan oluşur (Şekil 2.12). Bunlar ayrıştırma, eşikleme ve yeniden oluşturmadır (Pizurica, et al.).



Şekil 2.12 Dalgacık dönüşümü ile gürültü atma

Ayrıştırma, ayrık dalgacık dönüşümü ile N seviyeli dalgacık ayrışımının hesaplanması yani yaklaşım ve ayrıntı katsayılarının bulunmasıdır. Eşikleme ise her bir seviye için seçilen eşik değerinin ayrıntı katsayılarına uygulanmasıdır. Yeniden oluşturmada ise N seviyesinin orjinal yaklaşım katsayıları ve 1’den N’e kadar hesaplanan değiştirilmiş ayrıntı katsayıları kullanılıp ters ayrık dalgacık dönüşümü ile görüntü tekrar oluşturulur.

Bu tarz gürültü atmadaki temel varsayım, küçük genlikli katsayılarda gürültünün baskın olması, büyük genlikli katsayılarda ise gürültüden ziyade işaret (görüntü) bilgisinin taşınmasıdır (Rangarajan, et al., 2002). Gürültülü katsayıların değiştirilmesi ve görüntünün yeniden oluşturulması daha az gürültülü görüntünün elde edilmesini sağlayacaktır. Eşiklemede iki yaklaşım mevcuttur. Birincisi sert eşikleme, ikincisi ise yumuşak eşiklemedir.

Sert eşikleme şu şekilde ifade edilebilir:

$$\begin{cases} |x| > t \Rightarrow f(x) = x \\ |x| \leq t \Rightarrow f(x) = 0 \end{cases} \quad (24)$$

Yumuşak eşikleme ise şu şekilde ifade edilebilir:

$$\begin{cases} |x| > t \Rightarrow f(x) = \text{sgn}(x)(|x| - t) \\ |x| \leq t \Rightarrow f(x) = 0 \end{cases} \quad (25)$$

Burada $f(x)$ işareti, t ise eşik değerini göstermektedir.

Sert eşiklemede bazen saf gürültü eşik değerini geçebilir ve yeniden oluşturmadan sonra istenmeyen işaretler kalabilir. Yumuşak eşikleme ise bunları küçültür.

Dalgacık eşikleme yöntemlerinde eşik değerinin seçimi önemli bir problemdir. Genel anlamda eşik seçimindeki yaklaşımları ikiye ayırabiliriz (Isaac Hernandez-Fajardo, 2008). Birincisi, belirlenen eşik değerinin bütün dalgacık katsayılarına uygulandığı genel (global) eşiklerdir. İkincisi ise, her çözünürlük seviyesinde farklı eşik değerinin uygulandığı seviyeye bağlı (level-dependent) eşiklerdir. Her iki yaklaşım da gürültü seviyesine dair bir kestirim gerektirmektedir. Genel eşiklemeye bir örnek olarak evrensel (universal) eşik verilebilir (Donoho & Johnstone, 1994). Evrensel eşik değeri, σ gürültü varyansı ve N sinyal uzunluğu olmak üzere;

$$T = \sigma \sqrt{2 \log(N)} \quad (26)$$

ifadesiyle hesaplanır (Sachin D Ruikar, 2011).

SURE (Stein's unbiased risk estimate) ise seviyeye bağlı bir eşik belirleme yöntemidir (Strela, et al., 1999). SURE işlecini (operatörünü) aşağıdaki şekilde ifade edilir (Rangarajan, et al., 2002):

$$SURE(t; X) = n - 2 \cdot \# \{i : |X_i| \leq t\} + \sum_{i=1}^n [\min(|X_i|, t)]^2 \quad (27)$$

Burada X altbanddaki kirli katsayıları, n boyutu ve $\#$ ise küme eleman sayısını temsil etmektedir. Bu yöntemde eşik değeri aşağıdaki şekilde hesaplanır (Sachin D Ruikar, 2011):

$$T = \min(t, \sigma \sqrt{2 \log(N)}) \quad (28)$$

Burada t , SURE işlemini minimize eden değerdir.

Bilindiği üzere floresans görüntülemeye gauss tipi gürültünün yanında poisson tipi gürültü de görüntüler üzerinde bozucu bir etki oluşturmaktadır. Özellikle ışık kaynağının gücünün düşük olduğu ya da fotobeyazlama gibi durumlardan sakınmak için, bilerek düşük tutulduğu durumlarda, fotodedektöre

çok az sayıda foton gelmektedir. Bu da sinyale bağlı gürültüyü (poisson olarak modellenebilen) baskın hale getirmektedir. Literatürde poisson tipi gürültüye özgü önerilen dalgacık tabanlı gürültü atma yöntemleri mevcuttur (Luisier, et al., 2011). Bunlardan bazıları, dönüştürülmüş bölgede poisson süreçlerinin izini sürmek daha zor olduğu için, çözüm olarak poisson tipi gürültüyü “gauss tipine dönüştürme (gaussianizing)” ile gerçekleştirilen yöntemlerdir. Bu işlem, genellikle ham veriye doğrusal olmayan (örneğin karekök) bir fonksiyon uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Anscombe (Anscombe, 1948) tarafından önerilen bu durumdan gürültü atmada ilk olarak Donoho (Donoho, 1993a) faydalanmıştır. Anscombe varyans durağanlaştırma dönüşümü (variance stabilizing transform, VST), daha sonra Murtagh tarafından, gauss gürültüsüyle bozulmuş poisson rasgele değişkeninin varyansını durağanlaştırmak için genelleştirilmiştir (Murtagh, et al., 1995). Durağanlaştırmadan (stabilizing) sonra gauss tipi gürültüyü atmak için kullanılan herhangi iyi bir yöntem kullanılabilir.

Çeşitli çalışmalarda da normalize olmayan Haar dalgacık dönüşümünün poisson dağılımını alçakgeçiren kanallarında koruma özelliğinden faydalanılır. Freylewicz ve arkadaşları, verilen bir seviyedeki ölçekleme katsayılarının aynı seviyedeki dalgacık katsayılarının gürültü varyansının iyi bir kestirimi olduğu gözlemine dayalı bir yöntem önermişlerdir (Fryzlewicz & Nason, 2004). PURE-LET (poisson unbiased risk estimate-linear expansion of thresholds, poisson yansız risk kestirimi-eşiklerin doğrusal genişlemesi) yönteminde de aynı gözlemden hareketle her seviyedeki yaklaşım katsayısının karekökünün belirli bir sabitle çarpımı o seviyedeki ayrıntı katsayısı için eşik belirlenmesinde kullanılmaktadır (Florian, et al., 2010). PURE-LET yönteminde yaklaşım katsayısı ile çarpılan sabit hata değerini (MSE) minimize edecek şekilde seçilmektedir. Normalize olmayan Haar dalgacık dönüşümünün poisson verilere uygulanmasında diğer ilginç bir özellik ise mevcut seviyedeki ölçek (ebeveyn, parent) katsayısı ile bir sonraki ölçek (çocuk, child) katsayısı arasında çok basit istatistiksel bir ilişki bulunmasıdır. Aralarındaki koşullu olasılık ($C|E$) binom dağılımına sahiptir. Bu özelliklerden Bayesçi çerçevede (Bayesian framework) farklı çalışmalarda faydalanılmıştır (Kolaczyk, 1999; Lefkimmiatis, et al., 2009; Lu, et al., 2004; Timmermann & Nowak, 1999).

Dalgacık dönüşümü ile gürültü atmada, eşikleme aşamasında ayrıntı katsayılarına medyan filtre uygulaması da literatürde mevcuttur (Koç, et al., 2006; Li, et al., 2008). Çalışmamızda kullanılan e-medyan filtre (epsilon medyan filtre) şu şekilde ifade edilebilir (Haseyama, et al., 2000):

$$f(x,y) = g_m(x,y) + X(g(x,y) - g_m(x,y))$$

$$X(x) = \begin{cases} x, & |x| > \lambda \\ 0 & \text{diğer} \end{cases} \quad (29)$$

Burada, $g(x,y)$ gürültü eklenmiş görüntü, $g_m(x,y)$ filtrelenmiş görüntü, λ eşik değerini ifade etmektedir. Kirli ve filtrelenmiş görüntünün piksel değerleri arasındaki fark belirli bir eşik değerinin altında ise filtrelenmiş görüntünün piksel değeri alınmaktadır, eşik değerinin üstünde ise kirli görüntünün piksel değeri korunmaktadır. Bu da belirli bir oranda gürültü atma yapılırken, keskin kenarların onarılmasını sağlar. Bu tarz filtrelemenin gürültü atma etkisini sınamak için ideal MRI (MRI, Magnetic Resonance Image) ve mikroskopik görüntülere farklı tipte gürültüler eklenmiştir. ADD ile iki seviyeli ayırıştırma gerçekleştirilmiş ve yaklaşım ve ayrıştırma katsayıları elde edilmiştir. Daha sonra gürültü atma işlemi, ayrıştırma katsayılarında (3,3) boyutunda medyan filtre kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Eşik değerleri poisson tipi gürültü ve gauss tipi gürültü için farklı seçilmiştir. Poisson tipi gürültünün belirleyici olduğu mikroskopik görüntülerde eşik için yaklaşım katsayıları kullanılmıştır. Her seviye için yaklaşım katsayılarının karekök ortalaması (rms, root mean square) o seviyedeki ayrıştırma katsayıları için eşik olarak seçilmiştir (Florian, et al., 2010). Gauss tipi gürültü için ise o seviyedeki ayrıştırma katsayılarının karekök ortalaması o seviyedeki ayrıştırma katsayıları için eşik olarak seçilmiştir (Fletcher, 2002). Daha fazla iyileştirme için gürültü atma işleminin yinelemeli olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir (Koç, et al., 2006).

Çalışmamızda önerdiğimiz ters evrişim yöntemini uygulamak için önce kirli $g(x,y)$ görüntüsü üzerinde, iki aşamalı Dalgacık Dönüşümü kullanılarak, filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıştırma katsayıları e-medyan filtre ile ayrı ayrı filtrelenip (yumuşatılıp) görüntü ters dalgacık dönüşümü ile tekrar oluşturulmuştur. Elde edilen filtrelenmiş görüntü denklem 19'da yerine konularak PSF'nin Dalgacık tabanlı tahmini elde edilmiştir. Daha iyi bir PSF tahmini için değişken bir parametre olarak kullanılan $\alpha(u,v)$, denklem 19'da $0 \leq \alpha < 1$ olacak şekilde sabit bir sayı (0.05 ve 0.1) alınmıştır ve bu şekilde frekanstan bağımsız şekilde alınması daha düşük hatalı (RMSE ve görsel anlamda) sonuçlar vermiştir. Yapılan ters evrişim işlemlerinde, $\alpha(u,v)$ için sabit bir sayı yerine denklem 18'deki frekans bağımlı formül ile bulunan değerin alınması durumunda, görüntülerde hata anlamında artış görüldüğünden sonuçlara burada değinilmemiştir. Sabit bir sayı alınmasının incelediğimiz görüntüler açısından iyileşme sağlaması nedeni ile uygun düştüğü gözlemlenmiştir.

E-medyan filtre ile gürültü atma işlemi, farklı ana dalgacık tipleri için hata anlamında karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu karşılaştırmalar Dalgacık Paket Dönüşümü kullanılarak da yapılmıştır. Dalgacık Paket Dönüşümünde iki seviyeli ağaç seçimi yapılmıştır. E-medyan filtre ile yumuşatma seçilen ağaçta elde edilen ayrıştırma katsayılarına uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Ayrık Dalgacık Dönüşümünde olduğu gibi farklı ana dalgacık tipleri için karşılaştırmalar

yapılmıştır. En az hata veren ana dalgacık tipi en uygun olarak dikkate alınmıştır. Filtrelenmiş görüntünün Fourier dönüşümü ile elde edilen $G(u,v)$ ve $D(u,v)$ denklem 13’de yerine konulup ters Fourier Dönüşümünün alınması ile net görüntü tahmini elde edilmiştir. K değeri de $D(u,v)$ ’nin ortalama değerinin %1’i seçilmiştir.

2.2.3.3 Önerilen görüntü kalitesi ölçütü

Özgün görüntülerin (referans görüntülerin) bilindiği durumlar için hata; MSE (mean square error) ve PSNR (Peak Signal to Noise Ratio, Tepe İşaret Gürültü Oranı) parametreleriyle değerlendirilebilir.

$$MSE = \frac{1}{mn} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [G(i,j) - F(i,j)]^2 \quad (30)$$

$$PSNR = 10 \log_{10} \frac{\max_i^2}{MSE} = 20 \log_{10} \frac{\max_i}{RMSE} \quad (31)$$

Burada G kaydedilen görüntü, F ideal görüntü ve $\max_i$ alabileceği en büyük piksel seviyesini ifade etmektedir (örneğin 8 bit için 255).

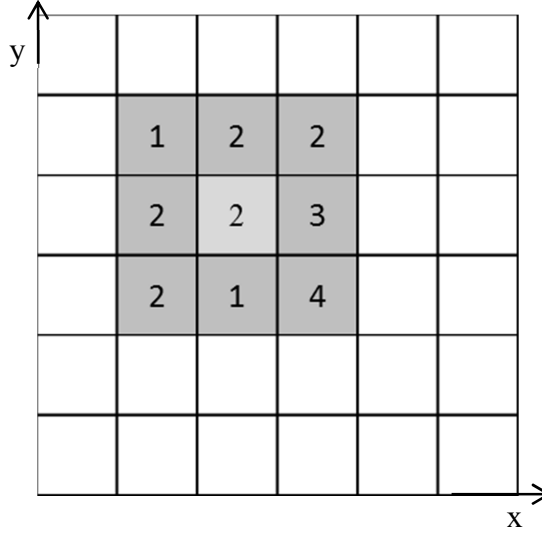
Ancak uygulamada genellikle referans görüntüyü bilemediğimizden kullandığımız yöntemlerin, görüntü kalitesini ne kadar iyileştirdiğini test edebilmek için başka parametrelere ihtiyacımız vardır. Bunlardan birisi entropi tabanlı yöntemlerdir (De & Sil, 2010; Gabarda, et al., 2007). Çalışmamızda; bu yöntem değiştirilmiş ve dalgacık entropisi tabanlı bir ölçüt türetilmiştir.

Öncelikle $M \times N$ boyutlu görüntünün her pikselinin merkezde olduğu 9×9 ’luk bir pencere kullanılarak oluşturulan çerçevedeki piksellerin dalgacık entropisi bulunur. Bu amaçla, görüntü çerçevesi ADD ile iki seviye ayrıştırılmıştır. Entropi hesaplaması, p , her seviyedeki dalgacık enerjisinin (E_j) toplam enerjiye (E_t) oranını ifade etmek üzere şu formülle gerçekleştirilir:

$$e = - \sum p \log_2 p, \quad p = \frac{E_j}{E_t} \quad (32)$$

Dalgacık enerjisi E_j , ayrıştırma katsayılarının karesel toplamıdır.

Her çerçeve için bu hesaplama yapılmak suretiyle $M \times N$ boyutlu entropi görüntüsü elde edilir. Pencereleme işlemi (örnek verme açısından 3×3 boyutlu seçilmiştir) Şekil 2.13’de gösterilmiştir. Entropi görüntüsünün elde edilmesine şu şekilde örnek verilebilir. Piksel matrisi (pencere) tek boyutlu bir satır vektörüne çevrilir.



Şekil 2.13 Merkezdeki piksel $f(x,y)=2$ için entropi hesaplamasında kullanılan 3×3 'lük pencere.

Elde edilen tek boyutlu işaret, ADD ile iki seviye ayrıştırılır. Birinci ve ikinci seviye için yaklaşım ve ayrıntı katsayılarının karesel toplamı sırasıyla a_1 , a_2 , d_1 ve d_2 ile ifade edilmek üzere, $p_1 = d_1 / (a_2 + d_1 + d_2) = 2/9$, $p_2 = d_2 / (a_2 + d_1 + d_2) = 4/9$ olarak kabul edilip, bu değerler denklem 32’de yerine konulursa:

$$e = -[(2/9) \cdot \log_2(2/9) + (4/9) \cdot \log_2(4/9)] = 1.0022$$

elde edilir. Bu işlem her piksel için tekrar edilir ve entropi görüntüsü elde edilir.

Entropi tabanlı görüntünün standart sapması (σ_{ent}) bize görüntü kalitesine (deblurring, netleştirme anlamında) dair fikir verir. Bulanıklaşma arttıkça σ_{ent} ’in azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca önerilen σ_{ent} ölçütü başka bir çalışmada önerilen AQI (Anisotropic quality index, yöne bağımlı kalite indisi) ile de paralellik göstermektedir. Bu ilişki, σ_{ent} ölçütünü görüntü kalitesini değerlendirmede kullanabileceğimizi göstermektedir. Gürültü ile bozulmada kullanılamaması önerilen ölçütün bir sınırlılığıdır. Literatürde önerilen benzer ölçütlerinde sınırlılıkları mevcuttur. Önerilen ters evrişim yöntemini sınarken, σ_{ent} ölçütünün

yanısıra hem gürültü hem de bulanıklaşma ile bozulmada görüntü kalitesine dair fikir veren AQI ölçütü referans ölçüt olarak kullanılmıştır.

AQI ölçütü, her piksel için farklı yönlerde istenen uzunlukta bir boyutlu pencerenin Renyi entropisi hesaplanarak bulunur (Gabarda & Cristobal, 2007). Görüntü bozulması arttıkça AQI ölçütünün aldığı değer azalmaktadır.

2.2.3.4 Üç boyutlu görüntünün oluşturulması

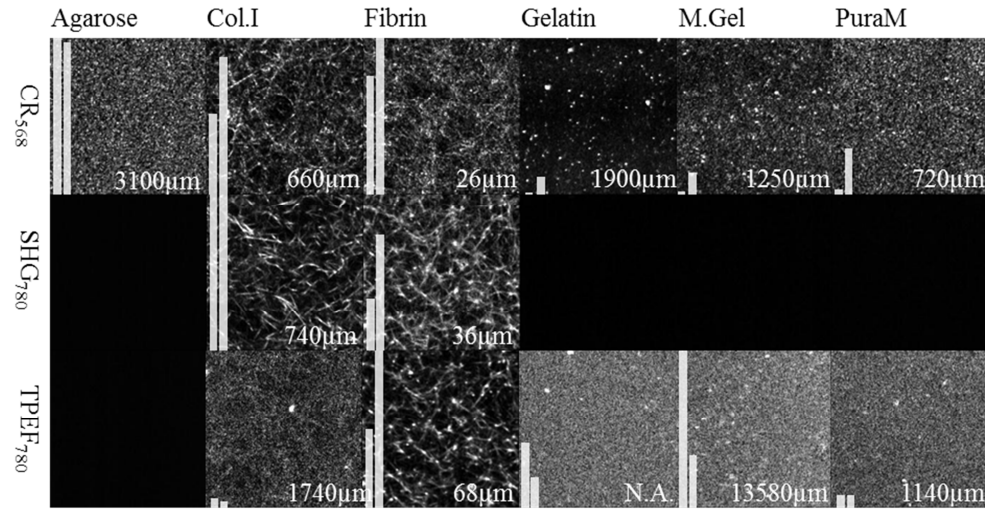
İki boyutlu görüntü çerçeveleri, ters evrişim ve gürültü atma yöntemleri ile iyileştirildikten sonra üç boyutlu şekilde geriçatılmıştır. Üç boyutlu geriçatma için ImageJ programının eklentisi olan Volume Viewer kullanılmıştır (Barthel, 2005). Hacim kaplama (volume rendering) yöntemi ile üç boyutlu görüntü oluşturulmuştur.

3. SONUÇLAR

3.1 Bağ Dokusu Taklitlerinin Görüntülenmesindeki Sonuçlar

Bağ dokusu taklitlerinin konfokal yansıma (CR) , SHG ve iki foton floresans (TPEF) ile görüntülenmesi ile ilgili sonuçlar Şekil 3.1’de gösterilmiştir. İlk satırda jellerin konfokal yansıma görüntüleri (568nm aydınlatma), ikinci ve üçüncü satırlarda ise jellerin SHG ve iki foton floresans görüntüleri (lazer dalgaboyu 780nm) gösterilmiştir. Her görüntüdeki ilk çubuk ortalama ışık şiddetini ve ikinci çubuk zıtlığı göstermektedir. Sayısal değerler, ışık şiddetinin 1/e kadarına (37%) düştüğü derinlik miktarını göstermektedir. Belli bir ışık şiddeti eşliğinin altındaki görüntüler siyah gösterilmiştir. Görüntünün daha net görülebilmesi için bütün görüntüler filtrelenmiş ve zıtlıkları ayarlanmıştır (medyan filtre 2x2, %1 en yüksek-düşük piksel değerleri atılmıştır). Hesaplamalar yapılırken fotodedektör arkaplanı çıkartılmıştır.

Şekilde de görülebileceği üzere, konfokal yansıma mikroskopi yöntemi ile bütün jeller gözlenebilir bir yapı sergilemişlerdir. SHG sadece Kollajen ve Fibrin için gözlenebilirken, Agarose için otofloresans ihmal edilebilecek düzeyde olduğu gözlenmiştir. Konfokal yansıma mikroskopi yöntemi ile en yüksek şiddet ve kontrast Agarose, Kollajen ve Fibrin’de elde edilmiştir.



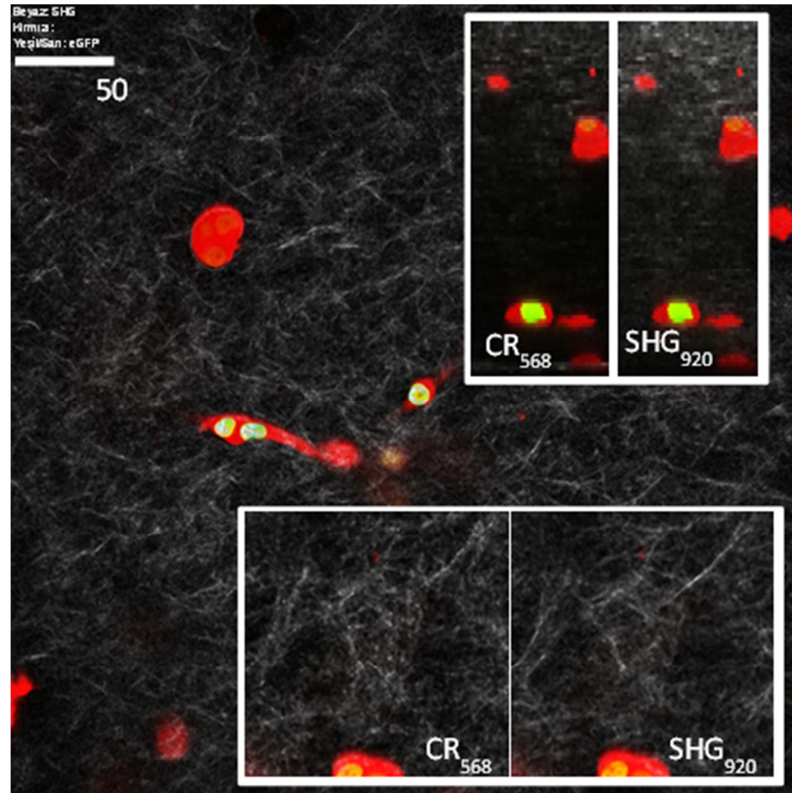
Şekil 3.1 ECM Taklitleri Görüntülenmesinin Özeti

İncelenen mikroskopi yaklaşımları ile Agarose küçük yapılar sergilerken, sadece Kollajen ve Fibrin’in belli bir ölçek için fibril yapıya sahip olduğu

gözlenmiştir. En fazla optik derinlik 3mm ile Agarose’da, en az ise 100 mikrondan daha derinde Fibrin jellerin incelenmesini zor kılacak şekilde Fibrin’de gözlenmiştir. Matrigel ve Gelatin için optik derinlik 1mm’nin üzerine ulaşabilmiştir ancak zıtlığın zayıf olduğu gözlenmiştir. Kollajen’in optik derinliği milimetre miktarına ulaşmıştır ve diğer bütün jeller gibi doğrusal olmayan görüntüleme yöntemleri ile gözlem aralığı genişlemiştir. Kollajen SHG en fazla zıtlığı ve aynı zamanda diğer görüntüleme yöntemlerine göre en iyi detayları sergilemiştir. En yüksek otofloresans Matrigel ve Fibrin için gözlenirken, Fibrin en yüksek zıtlığı sergilemiştir. Kollajen içinde bir miktar floresans yapı gözlenmiştir.

3.2 Çift Renkli İşaretlenmiş Hücrelerin Konfokal ve İki Foton ile Birleşik Görüntülenmesi Sonuçları

Konfokal ve İki foton ile birleşik görüntüleme sonuçları şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Çift renkte işaretlenmiş hücrelerin kollajen içerisinde görüntülenmesi.

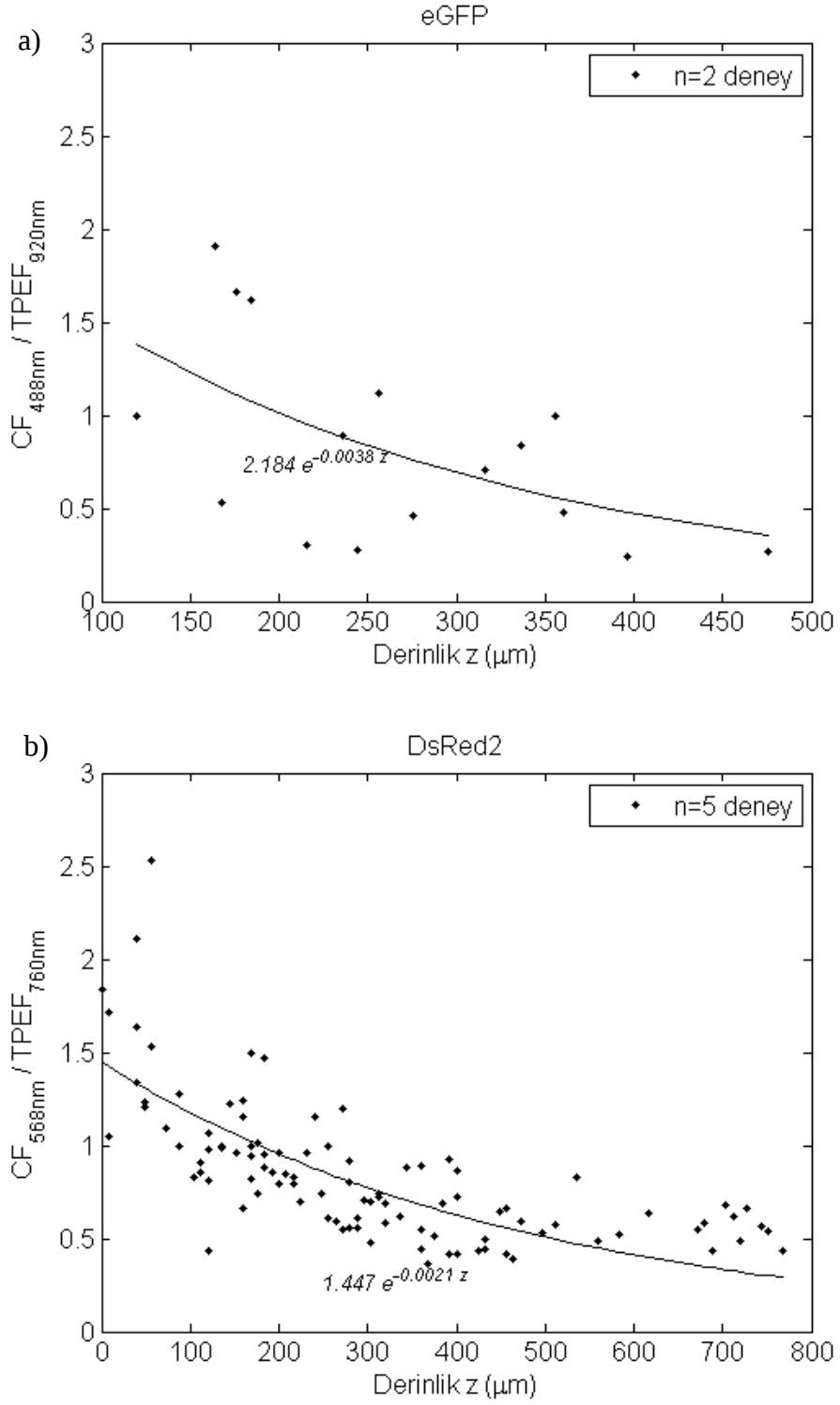
eGFP ile işaretli çekirdeğin 920nm’de uyarımla ve DsRed2 ile işaretli sitozolun 568nm’de uyarımla floresans yapması sağlanmıştır. Üst ve alt köşelerdeki görüntü çiftleri konfokal yansıma ve SHG görüntülemenin farkını göstermektedir. Üst köşede 180µm derinliğe kadar hücre görüntüleri yığınının kesiti, alt köşede ise kollajen liflerin konfokal yansıma ve SHG görüntülemeindeki zıtlık farkını göstermek için daha yakın (2x) bir görüntü sunulmuştur.

DsRed2 ve yansıma görüntülemesi konfokal birimi ile gerçekleştirilirken, eGFP ve SHG görüntülemesi doğrusal olmayan yöntemle 920nm’de gerçekleştirilmiştir. Hücreler 180µm’ye kadar rahatça gözlenebilmektedir. 920nm’de SHG, konfokal görüntülemeden daha iyi sonuçlar vermektedir ve zayıflama şekil 3.1’deki verilerden de beklendiği gibi daha azdır.

3.3 Derindeki Örneklerin Konfokal ve İki Foton ile Görüntülenmesi Sonuçları

DsRed2 ve eGFP, konfokal floresans (568nm, 488nm) ve iki foton floresansın (760nm, 920nm) performansını karşılaştırmak amacıyla görüntülenmiştir. Bu karşılaştırma floresans proteinlerin ortalama ışık şiddeti oranının nüfuz derinliği ile değişimi üzerinden yapılmıştır. Şekil 3.3a eGFP için konfokal floresans ışık şiddetinin iki foton floresans ışık şiddetine oranının nüfuz derinliğiyle değişimini göstermektedir. Şekil 3.3b ise DsRed2 için konfokal floresans ışık şiddetinin iki foton ışık şiddetine oranının nüfuz derinliğiyle değişimini göstermektedir. Şekillerin sağ üst köşesinde yer alan n sayısı, deneylerin tekrar sayısını ifade etmektedir. Eğri denklemleri için denklem-1’de verilen eşitlik kullanılmıştır.

İki foton floresans’da konfokal floresans yöntemine göre ışığın zayıflaması daha az olduğundan, şiddet açısından iki foton floresansın üstünlüğü vardır. Bu nedenle Şekil 3.3a ve b’de konfokal floresans ışık şiddetinin iki foton floresans ışık şiddetine oranı derinlikle üstel olarak azalmaktadır. DsRed2, 760nm ve 568nm’de, eGFP 920nm ve 488nm’de görüntülenmiştir. DsRed2 için zayıflama sabiti 2/mm, eGFP için 4/mm olarak gözlemlendi bu da iki foton floresansın sırasıyla yaklaşık 320µm ve 180µm’de iki kat şiddet üstünlüğü ile sonuçlanır.



Şekil 3.3 Nüfuz Derinliği Eğrileri, a. eGFP. b. DsRed2.

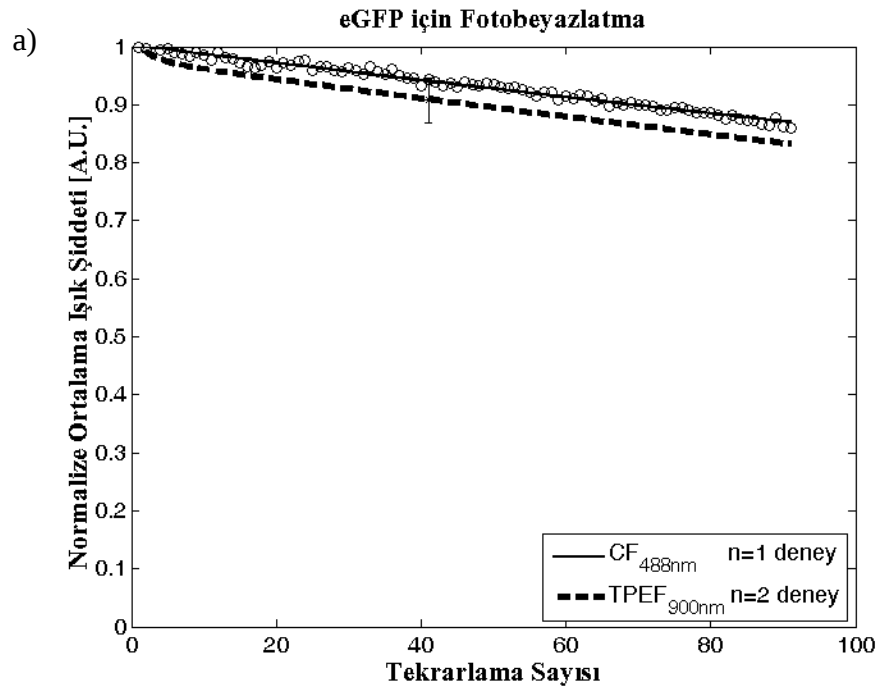
3.4 Düzlem İçi Fotobeyazlama

İki foton mikroskopi yönteminin odak dışı bölgelerde azalmış fotobeyazlamaya sahip olduğu bilinmektedir (Denk, et al., 1990). Fakat

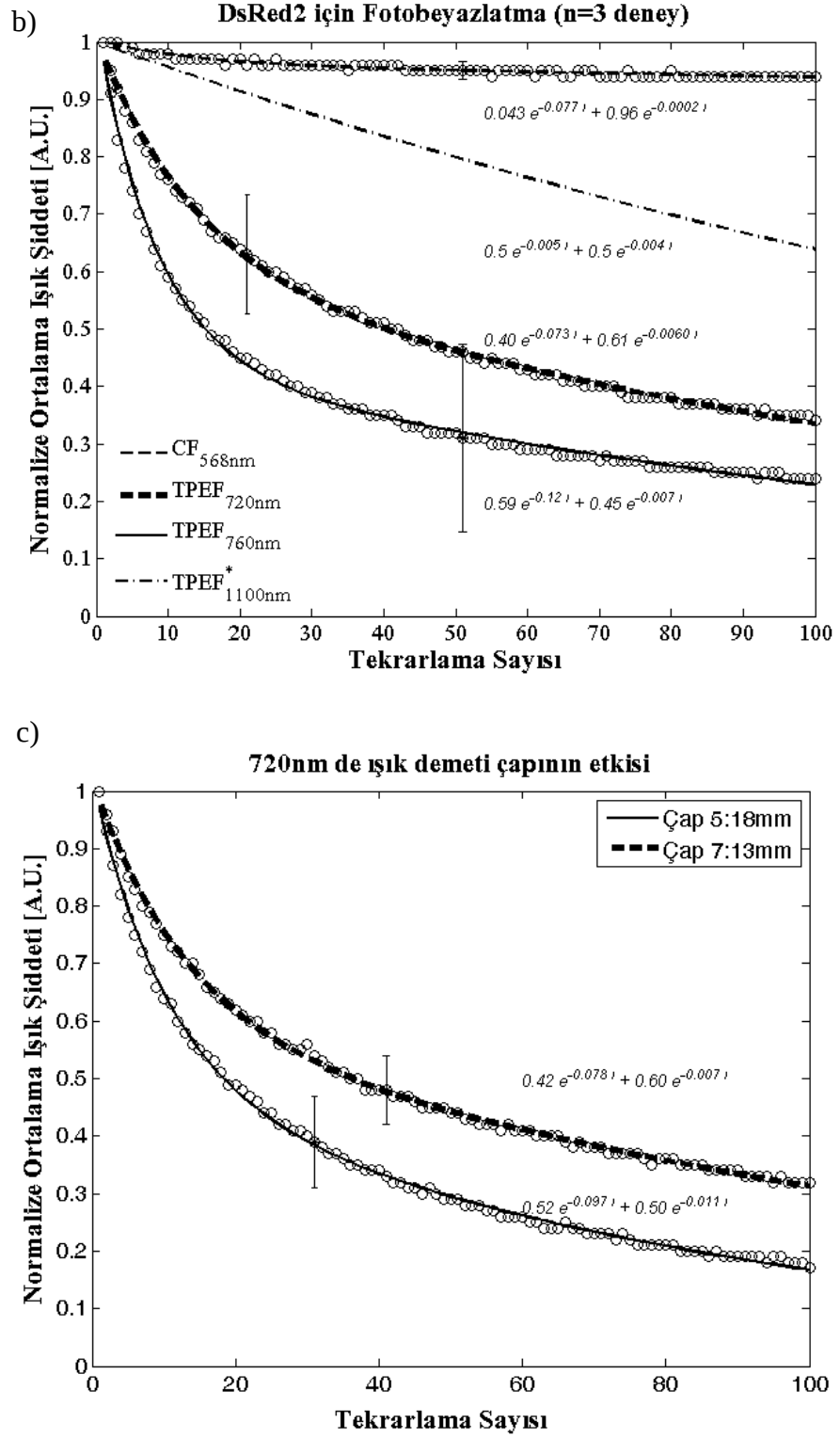
fotobeyazlama iki foton uyarım altında tek fotona göre daha hızlıdır (Patterson & Piston, 2000). eGFP ve DsRed2 görüntüleme sonuçları sırasıyla şekil 3.4a ve 3.4b’de gösterilmiştir. Grafikler, aynı düzlem 100 defa arka arkaya görüntülenmesi ve elde edilen ortalama ışık şiddeti değerlerinin ilk ölçüme göre normalize edilmesiyle oluşturulmuştur. 1100nm için değerler başka bir çalışmadan alınmıştır (Andresen, et al., 2009). Bütün eğriler ikili üstel fonksiyonlara uydurulmuştur (denklem 2).

DsRed2 fotobeyazlaması iki foton floresans uyarımı altında, konfokal görüntülemeye göre önemli ölçüde artmıştır. Fotobeyazlama sırasıyla 760nm, 720nm ve 1100nm uyarım dalgaboları için azalmıştır (Şekil 3.4b). Konfokal fotobeyazlama aynı düzlem 100 defa üst üste ölçüldükten sonra en az 15 kat daha düşüktür. eGFP’nin fotobeyazlamaya daha dayanıklı olduğunu ve iki foton floresans ve konfokal mikroskopi arasındaki farkın az olduğu gözlemlenmiştir (şekil 3.4a).

Konfokal mikroskopide pinhole’ü genişletmek, sinyal seviyesini korurken, fotobeyazlamayı azaltabilir (çözünürlüğün azalması pahasına). Benzer şekilde iki foton floresansda ışık demet çapını azaltmak, örnekleme hacmini artırır. Şekil 3.4c, ışık demeti çapını %30 azaltmanın, %45 azalmış beyazlama sağladığını göstermektedir. Ancak bu iyileşme, konfokal görüntülemeye göre küçüktür.



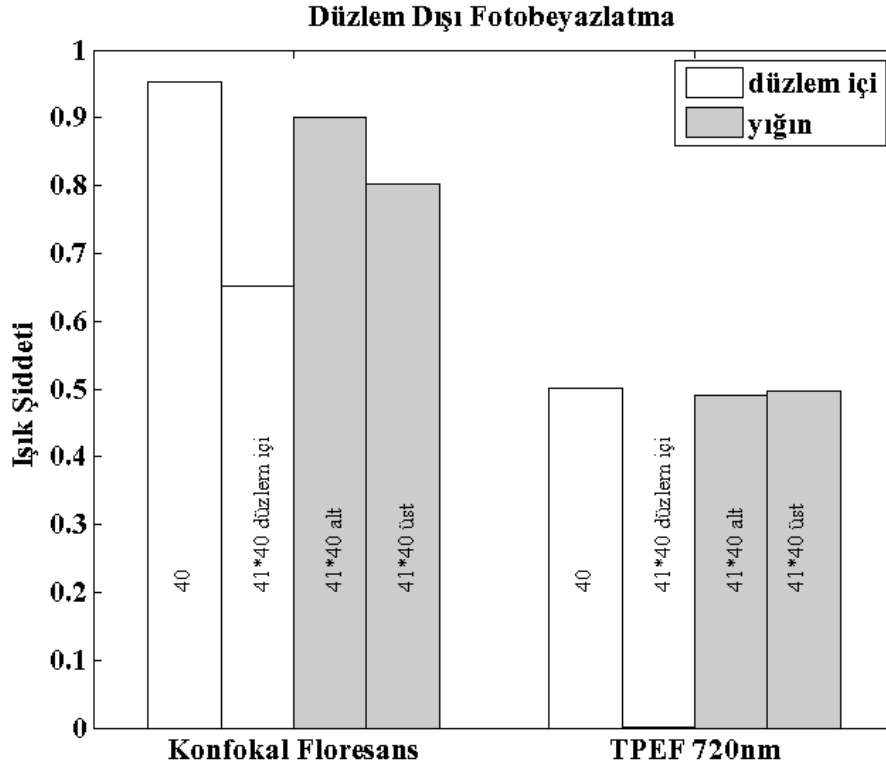
Şekil 3.4 Fotobeyazlatma: a. Konfokal ve iki foton görüntüleme için eGFP fotobeyazlaması.



Şekil 3.4 Fotobeyazlatma: b. Konfokal ve iki foton görüntüleme için DsRed2 fotobeyazlaması. c. Işık demeti çapının 720nm’de DsRed2 fotobeyazlamasına etkisi.

3.5 Odak Dışı Fotobeyazlama

Konfokal floresans ile iki foton floresansın düzlem içi ve düzlem dışı fotobeyazlaması karşılaştırılmıştır. Şekil 3.5, aksinel olarak 1 μ m aralıklı 41 görüntünün 40 kez görüntülenmesi ile DsRed2'nin düzlem içi ve düzlem dışı fotobeyazlamasını göstermektedir. Şekildeki iki grup için de ilk çubuklar aynı derinlikteki düzlemin 40 defa ardı ardına görüntülenmesi sonucu elde edilen normalize edilmiş ışık şiddetini göstermektedir. İkinci çubuklar ise varsayımsal maksimum düzlem dışı fotobeyazlama miktarını göstermektedir (görüntülenen düzlemin beyazlatmasının komşu düzlemlerle aynı miktarda olduğunun varsayıldığı durum, bu deney için tek düzlemin 41*40 defa görüntülenmesine karşılık gelmektedir). Üçüncü ve dördüncü çubuklar ise görüntü yığının 40 defa ardı ardına görüntülenmesi durumunda yığının alt ve üst noktalarındaki fotobeyazlamayı göstermektedir. Konfokal görüntülemeye, iki foton ile görüntülenmenin aksine düzlem dışı fotobeyazlama mevcuttur. Ayrıca yığının üst kısmında fotobeyazlama miktarı artmaktadır.



Şekil 3.5 Düzlem içi ve düzlem dışı fotobeyazlamanın karşılaştırılması.

Aynı düzlemin 40 defa görüntülenmesi konfokalda %5, iki foton floresans için %50 şiddet düşümü ile sonuçlanmaktadır. Eğer 41 μ m derinlikli hücre görüntüsü yığını iki foton floresans ile 40 defa ölçülürse yığının üst ve alt kısımlarının fotobeyazlaması arasında ihmal edilebilir bir fark oluşur ve

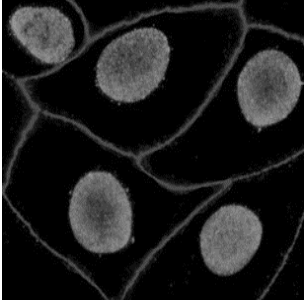
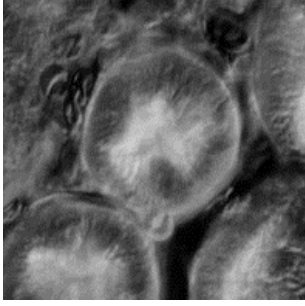
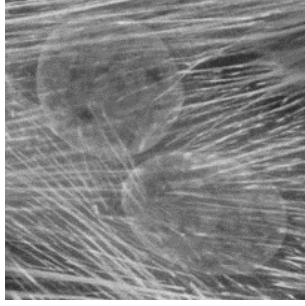
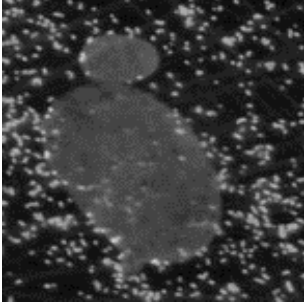
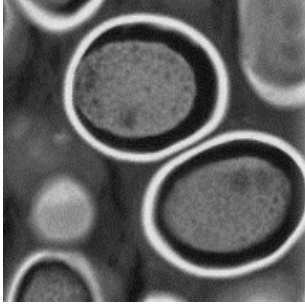
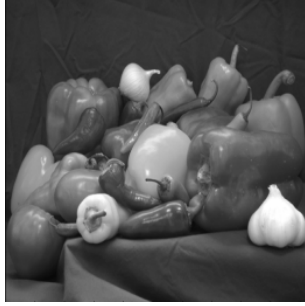
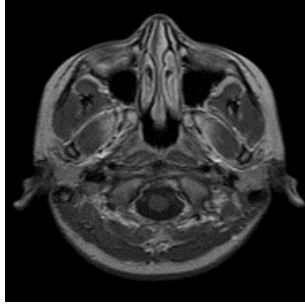
fotobeyazlama ışık demetinin odağı ile sınırlı kalmaktadır. Ancak konfokal görüntülemeye yığının üst kısmındaki şiddet %80'ine, alt kısımdaki ise %90'ına düşmektedir, bu da fotobeyazlamanın sadece odakta değil uyartım ışını boyunca gerçekleştiğini göstermektedir. Düzlem dışı fotobeyazlama, uyartım ışını derinlikle zayıfladığından, beklenildiği gibi üst kısımlarda yüksek çıkmıştır. Fazladan düzlem dışı fotobeyazlama, her durum için düzlem içi fotobeyazlamadan düşük çıkmıştır. Çünkü aynı seviyede olsaydı ışık şiddetinin %65'e düşmesi gerekirken %80'e düştüğü gözlenmiştir. DsRed2 için konfokal görüntülemeye düzlem dışı fotobeyazlamanın iki foton görüntülemeyle benzer seviyeye ulaşması için çok büyük yığınların ölçülmesi gerekmektedir.

3.6 Hücre Görüntülerinin Üç Boyutlu Modellenmesindeki Görüntü İyileştirme Sonuçları

Bu bölümde, kullanılan gürültü atma yöntemi ve önerilen ters evrişim yöntemi literatürdeki yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Ayrıca önerilen kalite ölçütü farklı görüntüler üzerinde denenmiştir.

3.6.1 Kullanılan gürültü atma yöntemi ile ilgili sonuçlar

Önerdiğimiz ters evrişim yönteminde e-medyan filtre ile gürültü atma yapılmaktadır. Bu nedenle, gürültü atma algoritmasında kullandığımız Ayrık Dalgacık Dönüşümü ve Dalgacık Paket Dönüşümü, farklı ana dalgacık tipleri için karşılaştırılmıştır. Gürültü atma etkisi referans görüntünün bilindiği durum için mikroskop görüntüsünde (Şekil 3.6, Görüntü 1) RMSE ölçütü ile değerlendirilmiştir. Çizelge 3.1'de görüntünün poisson tipi gürültü ile kirletildiği durum için karşılaştırma verilmiştir. Hata değerleri için ortalama değer ve standart sapma, program algoritmalarının 100 defa çalıştırılması sonucu elde edilmiştir. En fazla gürültü atma coif5 ana dalgacık tipi seçiminde elde edilmiştir.

Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3
		
Görüntü 4	Görüntü 5	Görüntü 6
		
Görüntü 7	Görüntü 8	Görüntü 9
		

Şekil 3.6 Çalışmada kullanılan test görüntüleri. Floresans mikroskop görüntüleri (1-6) Nikon (Nikon) sayfasından alınmıştır.

Dalgacık Tipi	Gürültü eklenmiş durumda RMSE	Gürültü atmadan sonra RMSE
Haar	5.287±0.026	5.299±0.026
db2	5.288±0.025	5.195±0.023
db4	5.289±0.025	5.195±0.026
coif5	5.290±0.025	5.100±0.027
sym2	5.288±0.023	5.195±0.025
sym4	5.287±0.026	5.122±0.028
bior1.1	5.282±0.023	5.299±0.023
bior1.5	5.282±0.027	5.432±0.028
dmey	5.287±0.024	5.47±0.022

Çizelge 3.1 Kullanılan gürültü atma algoritmasının, poisson tipi gürültü eklenmesi durumunda, farklı dalgacık tipleri için karşılaştırılması.

DPD için de farklı ana dalgacık tipleri için karşılaştırma yapılmıştır. Çizelge 3.2’de özetlenen bu karşılaştırma için, mikroskop görüntüsüne poisson tipi gürültü eklenmiştir. En fazla gürültü atma coif5 ana dalgacık tipi kullanıldığı durum için elde edilmiştir. Kullanılan gürültü atma algoritmasında DPD kullanılması durumunda, ADD kullanıldığı durumdan daha fazla gürültü atma elde edilmiştir. Optimum gürültü atma için Çizelge 3.1 ve 3.2’de elde ettiğimiz sonuçlar bize fikir vermektedir.

Dalgacık Tipi	Gürültü eklenmiş durumda RMSE	Gürültü atmadan sonra RMSE
Haar	5.286±0.027	5.366±0.027
db2	5.284±0.024	5.201±0.025
db4	5.287±0.026	5.076±0.026
coif5	5.285±0.021	4.998±0.023
sym2	5.285±0.026	5.205±0.026
sym4	5.286±0.024	5.076±0.026
bior1.1	5.289±0.027	5.368±0.029
bior1.5	5.287±0.025	5.587±0.025
dmey	5.288±0.027	5.32±0.022

Çizelge 3.2 Dalgacık paket için elde edilen hata değerleri (poisson).

Kullandığımız gürültü atma algoritması, bilinen ADD ve DPD tabanlı sert ve yumuşak eşikleme yöntemleri (Coifman & Donoho, 1995; Donoho, 1995; Donoho, 1993b) ile poisson tipi gürültü atma için geliştirilmiş Pure-Let yöntemi ile karşılaştırıldı. Sert ve yumuşak eşikleme ile gürültü atmada eşik değeri olarak evrensel eşik değeri seçilmiştir. Pure-Let için eşik değeri ise yaklaşım katsayıları kullanılarak seviyeye bağlı seçilmiştir (Florian, et al., 2010). Karşılaştırma için mikroskop görüntüsü (Şekil 3.6, Görüntü 1) poisson tipi gürültü ile kirletildi. Program algoritmalarının 100 defa çalıştırılması sonucu elde edilen değerler Çizelge 3.3’de özetlenmiştir.

Pure-Let yönteminde ve kullandığımız yöntemde her durum için gürültü atma gözlenmiştir. Çizelge 3.3’den görüleceği üzere diğer yöntemlerin gürültü atma yapamadığı durumlar bulunmaktadır. Bu durum dalgacık dönüşümü tabanlı

gürültü atmada eşik seçiminin kritik olmasına bağlanabilir. Pure-Let ve kullandığımız yöntemde eşik seçimi seviyeye bağlı olarak belirlenmektedir.

	Görüntü 1	Görüntü 2	Görüntü 3	Görüntü 4	Görüntü 9
Gürültü eklenmiş durum	5.29±0.025	9.58±0.038	11.24±0.038	7.62±0.042	6.25±0.034
ADD-Sert Eşikleme	5.25±0.025	7.39±0.033	11.074±0.042	11.44±0.058	6.01±0.062
DPD-Sert Eşikleme	5.25±0.025	9.58±0.043	11.238±0.037	7.61±0.039	6.21±0.035
ADD-Yumuşak Eşikleme	4.19±0.020	7.88±0.022	12.57±0.025	14.37±0.036	5.56±0.24
DPD-Yumuşak Eşikleme	4.25±0.021	9.58±0.043	11.238±0.037	7.61±0.039	5.10±0.035
Önerilen ADD ile	5.16±0.026	7.70±0.044	9.91±0.045	7.47±0.045	6.01±0.037
Önerilen DPD ile	5.00±0.024	7.57±0.045	9.53±0.041	7.23±0.044	5.86±0.039
Pure-Let	4.03±0.019	6.40±0.024	8.01±0.027	6.52±0.041	5.18±0.028

Çizelge 3.3 Gürültü atma yöntemlerinin karşılaştırılması.

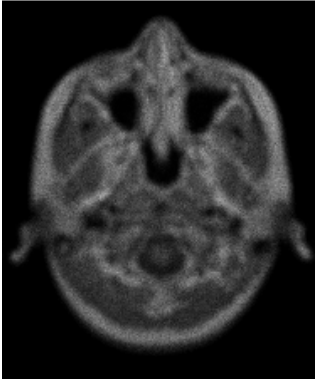
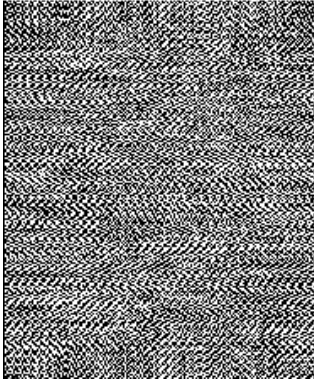
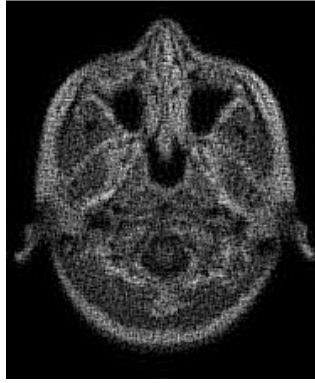
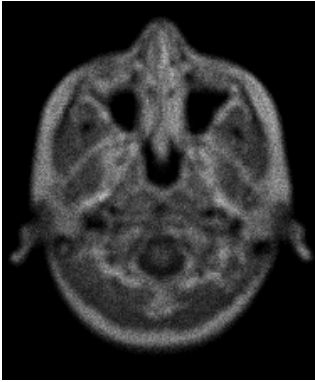
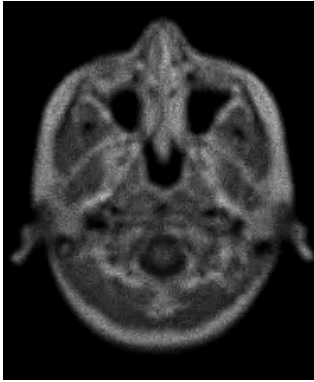
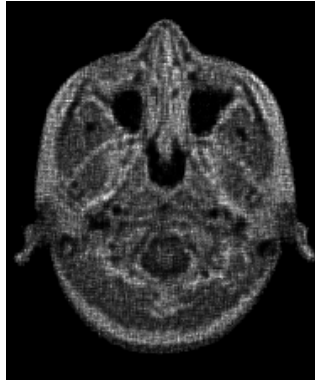
3.6.2 Önerilen ters evrişim yöntemi ile ilgili sonuçlar

Önerdiğimiz ters evrişim yönteminde, gürültü atmada en iyi sonucu veren coif5 ana dalgacık tipi kullanılmıştır. Önerilen yöntem diğer ters evrişim yöntemleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 3.7 ve 3.8).

Poisson tipi gürültü için karşılaştırma sonuçları

Önerdiğimiz yöntem ve SeDDaRa yöntemi, kör ters evrişim yöntemleri olması nedeni ile PSF bilinmezken, Richardson-Lucy ve Wiener yöntemlerinde PSF'in bilindiği kabul edilmiştir. Önerdiğimiz algoritmada ve SeDDaRa algoritmasında yüksek α değeri görüntü zıtlığını arttırırken gürültüyü de arttırmaktadır. Bu nedenle en uygun değer ($\alpha=0.05$) alınmıştır. Wiener filtre, iki farklı K (NSR, noise to signal power ratio, gürültünün işaret gücüne oranı) değeri için karşılaştırılmıştır. Wiener filtre'de K değerinin sıfır alınması ideal ters filtreye karşılık gelmektedir.

İdeal görüntüler PSF (5x5) ile bulanıklaştırılmış ve görüntülere poisson tipi gürültü eklenmiştir. Bozulmuş görüntülere ise karşılaştırılan yöntemler ile ters evrişim yapılmış ve RMSE hata değerleri hesaplanmıştır. Hata değerleri için ortalama değer ve standart sapma, program algoritmalarının 100 defa çalıştırılması sonucu elde edilmiştir.

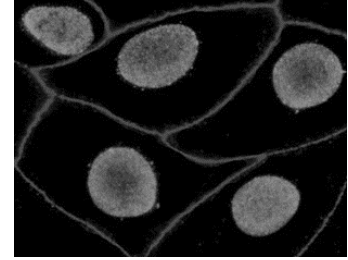
Bulanık ve kirli görüntü  RMSE: $13,66 \pm 0,04$	Ters filtre (NSR=0)  RMSE: $158,33 \pm 0,437$	Wiener filtre (NSR=0.01)  RMSE: $20,62 \pm 0,124$
SeDDARa ($\alpha=0.05$ filtre 2x2)  RMSE: $14,34 \pm 0,047$	Önerilen yöntem ($\alpha=0.05$)  RMSE: $13,52 \pm 0,055$	Richardson-Lucy  RMSE: $15,06 \pm 0,11$

Şekil 3.7 Önerilen ve diğer ters evrişim yöntemlerinin karşılaştırılması (poisson).

Önerilen ters evrişim yöntemi ile en az hata elde edilirken, beklendiği üzere en fazla hata ters filtre ile elde edilmiştir.

Aynı karşılaştırma mikroskop görüntüsü içinde yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.8’de özetlenmiştir. Mikroskop görüntüsünde en az hata önerilen yöntem ile elde edilmiştir.

	Bulanık ve kirli görüntü	Ters filtre (NSR=0)	Wiener filtre (NSR=0.01)
RMSE	9,06±0,028	163,29±0,4	16,69±0,1
	SeDDARa	Önerilen yöntem	Richardson-Lucy
RMSE	9,77±0,034	8,96±0,039	11,96±0,08



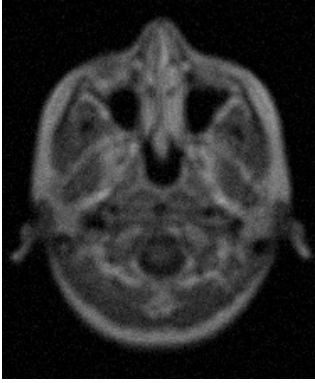
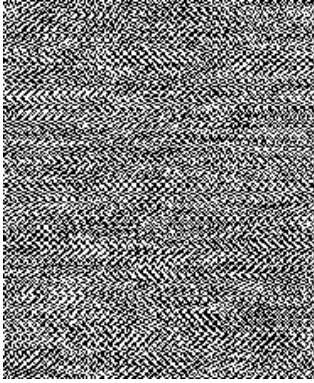
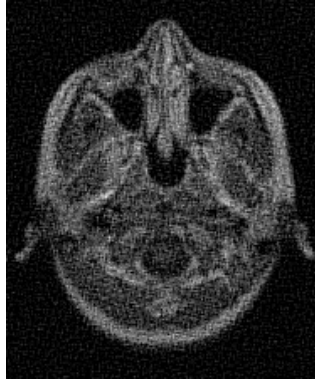
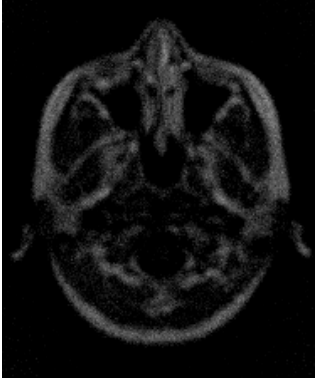
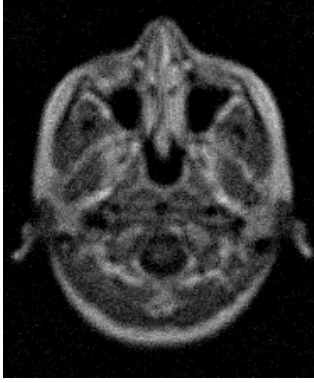
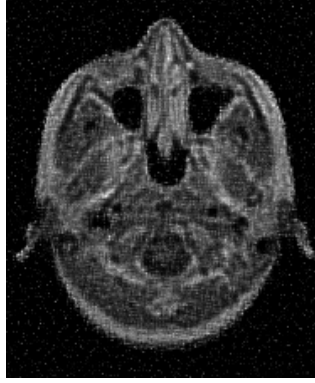
Şekil 3.8 Mikroskop görüntüsü için yöntemlerin karşılaştırılması (poisson).

Gauss tipi gürültü için karşılaştırma sonuçları

Önerdiğimiz yöntem ve diğer ters evrişim yöntemleri, gauss tipi gürültü için karşılaştırılmıştır (Şekil 3.9 ve 3.10). İdeal görüntüler evrişim (PSF5x5) ile bulanıklaştırıldıktan sonra görüntülere gauss tipi gürültü eklenmiştir. Bozulmuş görüntülere ise karşılaştırılan yöntemler ile ters evrişim yapılmış ve RMSE hata değerleri hesaplanmıştır. Hata değerleri için ortalama değer ve standart sapma, program algoritmalarının 100 defa çalıştırılması sonucu elde edilmiştir.

Önerdiğimiz yöntem ve SeDDaRa için $\alpha=0.1$ alınmıştır. Ayrıca SeDDaRa yöntemi için medyan filtrenin boyutu 3x3 seçilmiştir. Bu karşılaştırmada α 'nın önceki karşılaştırmadan yüksek alınması zıtlığı arttırırken gürültüyü de arttırmaktadır ve bu durum da hata değerinin artmasına neden olmaktadır.

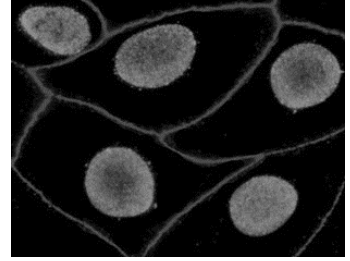
Gauss tipi toplamsal gürültü eklenmesi durumunda önerilen ters evrişim yöntemi ile en az hata elde edilirken, ters filtre ile en fazla hata elde edilmiştir.

Bulanık ve kirli görüntü  RMSE: 14,1±0,037	Ters filtre (NSR=0)  RMSE: 158,81±0,36	Wiener filtre (NSR=0.01)  RMSE: 21,54±0,11
SeDDARa ($\alpha=0.1$ ve filtre 3x3)  RMSE: 35,11±0,031	Önerilen yöntem ($\alpha=0.1$)  RMSE: 17,2±0,56	Richardson-Lucy  RMSE: 17,33±0,12

Şekil 3.9 Önerilen yöntem ve diğer yöntemlerin karşılaştırılması (gauss).

Aynı karşılaştırma mikroskop görüntüsü için de yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.10'da özetlenmiştir. En az hata önerilen yöntem ile elde edilmiştir.

Gürültü: 0.001	Bulanık ve kirli görüntü	Ters filtre (NSR=0)	Wiener filtre (NSR=0.01)
RMSE	10,08±0,028	18,79±0,07	164,20±0,3
	SeDDARa	Önerilen yöntem	Richardson- Lucy
RMSE	10,93±0,03	9,88±0,032	16,15±0,072

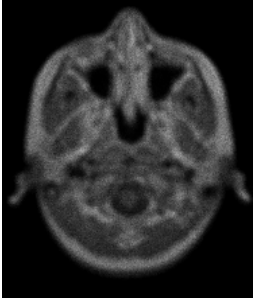
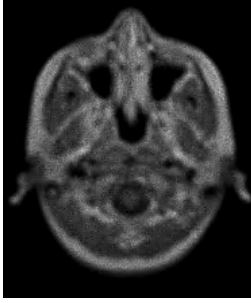
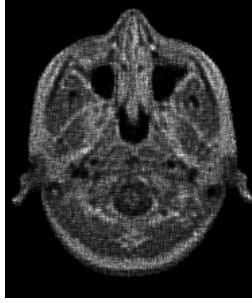
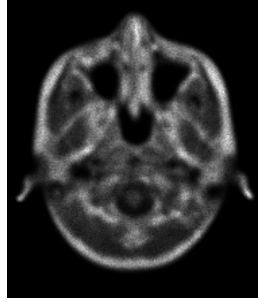
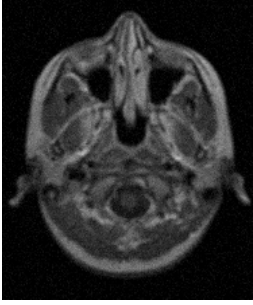
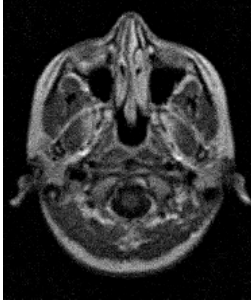
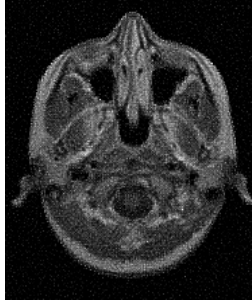
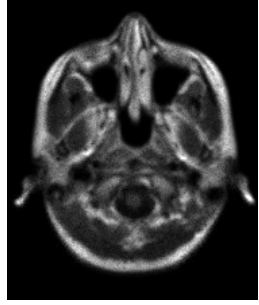


Şekil 3.10 Mikroskop görüntüsü için yöntemlerin karşılaştırılması (gauss).

Kör ters evrişim için karşılaştırma sonuçları

Önerdiğimiz yöntem, Lucy-Richardson tabanlı yinelemeli kör ters evrişim yöntemi ile karşılaştırıldı (Şekil 3.11). Bu yöntemde başlangıçta PSF için bir kabulde bulunuluyor ve yinelemeli olarak PSF ve görüntü tahmini güncelleniyor. Bu yöntemin kritik noktalarından birisi seçilen PSF'in boyutudur.

Karşılaştırma için temiz MRI görüntüsü (5,5) boyutlu filtre ile bulanıklaştırıldı ve 0.001 varyanslı gürültü eklendi. Önerdiğimiz yöntem ve kör RL yöntemi ile görüntü iyileştirildi. Aynı işlemler görüntünün (3,3) boyutlu PSF ile bulanıklaştırıldığı durum için de gerçekleştirildi.

Bulanık (5x5) ve poisson gürültülü görüntü	Önerilen yöntem ($\alpha=0.05$)	Kör RL (PSF 5x5)	Kör RL (PSF mxn)
			
13,65±0,04	13,5±0,06	15,53±1,43	21,35±0,06
Bulanık (3x3) ve gauss gürültülü (0.001) görüntü	Önerilen yöntem ($\alpha=0.1$)	Kör RL (PSF 3x3)	Kör RL (PSF mxn)
			
10,044±0,032	15,3±0,049	17,68±4,14	19,31±0,098

Şekil 3.11 Önerilen yöntem ve RL tabanlı kör ters evrişim yönteminin karşılaştırılması.

3.6.3 Önerilen kalite ölçütü ile ilgili sonuçlar

Çalışmamızın Çizelge 3.4 ve 3.5'te özetlediğimiz sonuçlarında önerdiğimiz görüntü iyileştirme ölçütünün geçerliliği gösterilmeye çalışılmıştır. Önerilen ölçüt, başka bir çalışmada önerilen AQI ölçütü ile de karşılaştırılmıştır. Şekil 3.6'da verilen görüntüler farklı boyutlarda PSF ile bulanıklaştırılmıştır. Bulanıklaşmanın artması ile önerdiğimiz ölçüt ve AQI ölçütünün aldığı değerler çizelgelerde gösterilmiştir. Bu değerler, net görüntüye göre normalize edilmiş

değerlerdir. Çizelge 3.4’de görüldüğü üzere bulanıklaşma arttıkça AQI ve σ_{ent} ölçütlerinin değeri azalmaktadır.

Test Görüntüleri	PSF Boyutu	AQI	σ_{ent}
Görüntü 1	Net	1	1
	3	0.5	0.94
	5	0.42	0.92
	9	0.36	0.88
Görüntü 2	Net	1	1
	3	0.23	0.87
	5	0.02	0.74
	9	0.01	0.54
Görüntü 3	Net	1	1
	3	0.2	0.62
	5	0.05	0.41
	9	0.01	0.22
Görüntü 4	Net	1	1
	3	0.22	0.70
	5	0.06	0.51
	9	0.01	0.29
Görüntü 5	Net	1	1
	3	0,23	0,92
	5	0,14	0,80
	9	0,08	0,51

Çizelge 3.4 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün sınanması

Test Görüntüleri	PSF Boyutu	AQI	σ_{ent}
Görüntü 6	Net	1	1
	3	0.34	0.87
	5	0.13	0.76
	9	0.04	0.57
Görüntü 7	Net	1	1
	3	0.35	0.89
	5	0.14	0.70
	9	0.04	0.60
Görüntü 8	Net	1	1
	3	0.18	0.61
	5	0.06	0.45
	9	0.01	0.27

Çizelge 3.4 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün sınanması (devamı).

Gürültü (0.001 varyanslı) eklenmiş görüntülerde de ölçütün, bulanıklaşmanın artması ile azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 3.5). Ancak gürültülü durumda ölçütü sınarken görüntülere gürültü atma işlemi uygulanmıştır. Gürültü ile bozulmayı belirleyememesi ölçütün sınırlılığdır. Bu nedenle hem gürültü hem de bulanıklaşma ile bozulmayı belirleyen AQI ölçütü referans ölçüt olarak kullanılmıştır.

Test Görüntüleri	PSF Boyutu	AQI	σ_{ent}
Görüntü 1	3	1	1
	5	0.5	0.74
	9	0.37	0.73
Görüntü 2	3	1	1
	5	0.51	0.90
	9	0.51	0.71
Görüntü 3	3	1	1
	5	0.19	0.67
	9	0.03	0.37
Görüntü 4	3	1	1
	5	0.55	0.74
	9	0.42	0.45
Görüntü 5	3	1	1
	5	0.92	0.87
	9	0.49	0.56
Görüntü 6	3	1	1
	5	0.73	0.88
	9	0.02	0.67
Görüntü 7	3	1	1
	5	0.17	0.94
	9	0.04	0.85

Çizelge 3.5 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün gürültü varken sınanması.

Test Görüntüleri	PSF Boyutu	AQI	σ_{ent}
Görüntü 8	3	1	1
	5	0.34	0.76
	9	0.02	0.48

Çizelge 3.5 Önerilen görüntü kalitesi ölçütünün gürültü varken sınanması (devamı).

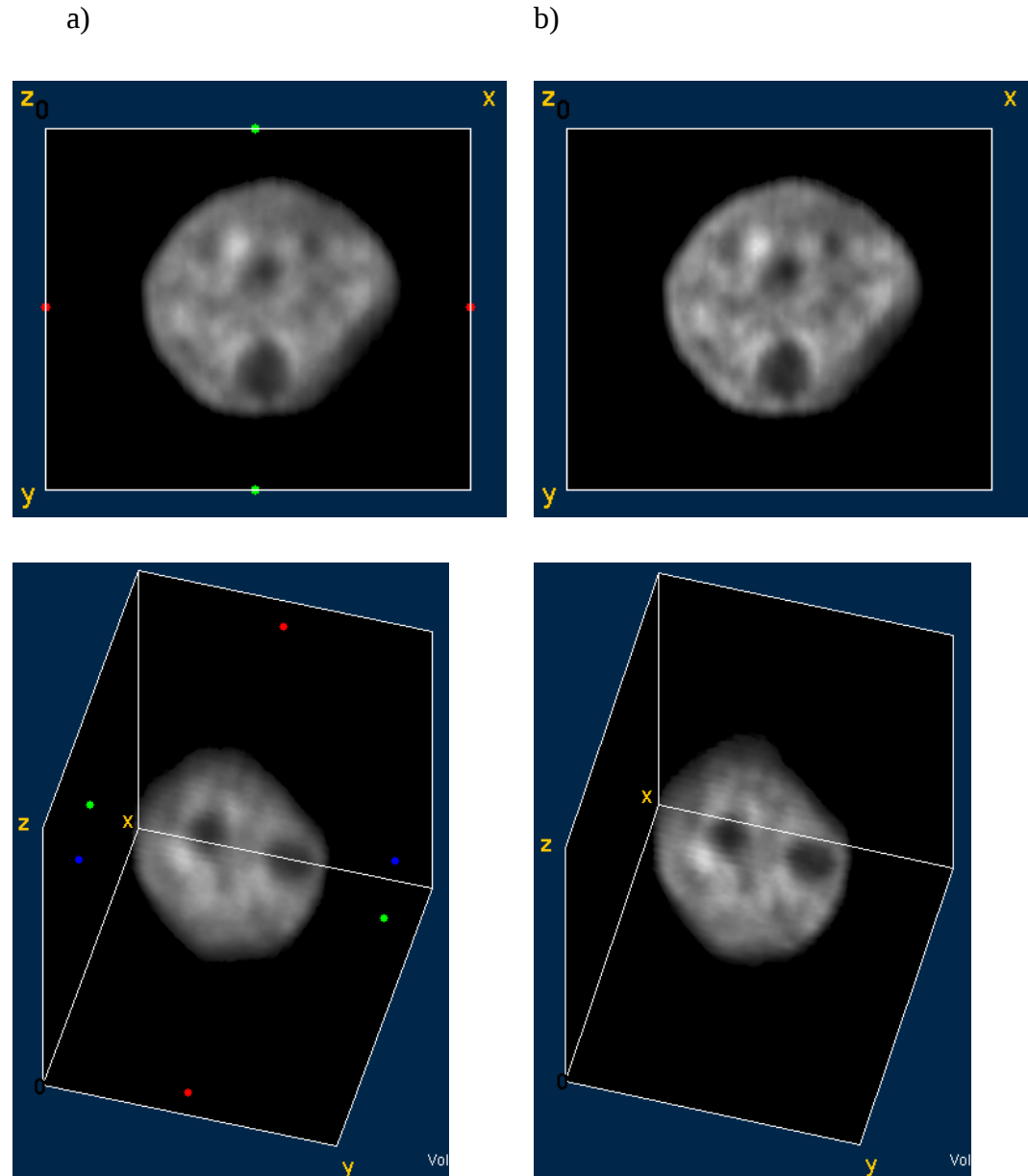
Önerdiğimiz ters evrişim algoritmasının, konfokal ve iki foton ile kaydedilen hücre görüntüleri üzerindeki iyileştirme etkisini gösterebilmek için, önerdiğimiz ölçüt ve AQI ölçütünün iyileştirmeden önce ve sonra aldığı değerler Çizelge 3.6’da özetlenmiştir. Ölçütlerin değerlerinin artması bize görüntü kalitesinde bir iyileştirme sağladığımızı göstermektedir.

Görüntü tipi	Dalgacık Dönüşümü Tipi	Ölçüt	Kaydedilmiş Hücre Görüntüsü	Önerdiğimiz ters evrişim ile iyileştirilmiş durum
Konfokal Floresans	ADD	AQI	0,0044	0,0197
		σ_{ent}	0,1528	0,2097
	DPD	AQI	0,0044	0,0172
		σ_{ent}	0,1528	0,2117
İki Foton Floresans	ADD	AQI	0,0029	0,0103
		σ_{ent}	0,0866	0,123
	DPD	AQI	0,0029	0,0140
		σ_{ent}	0,0866	0,123

Çizelge 3.6 Hücre görüntüleri için görüntü iyileştirme sonuçları.

3.6.4 Üç boyutlu geriçatma

Üç boyutlu geriçatma için bütün iki boyutlu görüntüler netleştirilmiş ve temizlenmiştir. ImageJ Volume Viewer ile üç boyutlu görüntü oluşturulmuştur. Şekil 3.12’de ise görüntülerin xy ve belirli bir açı için kesitleri verilmiştir. Kaydedilen hücre görüntüsü Şekil 3.12a’da, ters evrişim işleminden sonraki görüntü ise Şekil 3.12b’de verilmiştir.



Şekil 3.12 Üç boyutlu oluşturulmuş görüntüden alınan kesitler. a. Kaydedilen hücre görüntüsü b. Ters evrişim uygulandıktan sonra elde edilen iyileştirilmiş görüntü.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızın deneysel kısmında; konfokal floresans ve iki foton floresans mikroskopi yöntemleri kullanılarak floresans proteinler ile işaretlenmiş kanser hücreleri incelenmiştir. ECM taklitleri de konfokal yansıma ve SHG mikroskopi yöntemleri ile incelenmiştir.

Bütün incelenen ECM taklitleri (jeller) işaretli durumda da kontrast sağlayarak, jellerin içindeki boşlukların belirlenebilmesine imkan vermişlerdir. Gözlemlerimiz; Agarose'un uzun bir optik derinliğe izin vermesinden, iyi bir yansıma kontrastı sağlamasından ve çok az otofloresans sergilemesinden dolayı, optik incelemelerde kullanışlı bir ekilme ortamı olduğunu göstermiştir. Bu durum, büyük olasılıkla göreceli olarak saçılma kesitinin küçük olmasından ve temel olarak ileri ve geri yönde gerçekleşen izotropik olmayan saçılmadan kaynaklanmaktadır. Yani saçılma ve zayıflama etkisi oldukça düşük olmaktadır, ancak bu etki oluşursa da geriye, dedektöre doğru olmaktadır. Matrigel ve fibrin, kollajen ve agarose'a göre yüksek otofloresans gösterdiklerinden dolayı, zayıf floroforların görüntülenmesinde tercih edilmeleri uygun değildir. Ayrıca fibrin yüksek sinyal zayıflaması göstererek görüntülemeyi 100µm'nin altına sınırlamaktadır. ECM ile hücrel etkileşimlerin işaretli görüntülenmesinde kollajen I temelli hidrojeller idealdir. Çünkü sadece doğal bir mikro-ortam sağlamakla kalmaz aynı zamanda konfokal yansıma ve SHG görüntülemeye, 1mm veya daha fazla bir aralık içinde iyi bir kontrast sağlarlar.

Çift renkli işaretlenmiş hücrelerin görüntülenmesinde iki foton yönteminin konfokal'a göre eGFP için yaklaşık 180µm'de, DsRed2 için 320µm'de sinyal şiddeti açısından iki kat bir getirisi olduğu gözlenmiştir. Saçılmanın artan dalgaboyu ile azalması ve iki foton yönteminde 350nm ve 1300nm aralığında saçılmanın diğer etkenlere (örneğin su soğurması) göre baskın olduğu gözününe alınırsa (Kobat, et al., 2009), iki foton ve konfokal uyartım dalgaboyları arasındaki farkın artmasının iki foton yönteminin getirisini arttırması beklenir. Çalışmamızda, eGFP'nin görüntülenmesinde iki foton ve konfokal arasındaki uyartım dalgaboyu farkı yaklaşık 400nm, DsRed2 için bu fark 200nm'dir. Bu durum, iki foton yöntemi ile eGFP için 180µm'de iki kat sinyal getirisi tespit edilirken DsRed2 için bu derinlikte getirinin daha az olmasını açıklamaktadır.

Çift renkli işaretlenmiş hücrelerin doğal üç boyutlu bir ortamda görüntülenmesinde, DsRed2'nin iki foton ile uyartımında, konfokal

görüntülemeye göre önemli ölçüde fotobeyazlama ortaya çıkarmaktadır. Başka çalışmalarda iki foton için dalgaboyunu OPO ile 1120nm'ye genişleterek fotobeyazlamanın azaltılabileceği gösterilmiştir. Ancak çalışmalarımız, DsRed2'nin iki foton uyarımından kaynaklanan fotobeyazlamasının, konfokal görüntülemeden kaynaklanan fotobeyazlamasından önemli ölçüde yüksek kaldığını göstermektedir. Bazı araştırmacılar (Patterson & Piston, 2000) iki foton soğurmanın yanısıra, iki foton floresans görüntülemenin üç foton süreçlerini de içerebileceğini öne sürmüşlerdir. Fotobeyazlama oranlarında gözlemlediğimiz farklılıklara dayanarak, UV-C bandında üç foton soğurmanın bu oranları arttırdığı ortaya çıkmaktadır. eGFP, DsRed2 gibi iki foton ile uyarımda daha fazla fotobeyazlama sergilemiştir, ancak bu çok daha küçük miktardadır. eGFP'nin üç foton soğurma spektrumunun UV-C bandı dışında olduğu gözönüne alındığında, DsRed2'nin 720nm (üç foton soğurma 240nm) ve 760nm (üç foton soğurma 253nm)'de görüntülenmesinin neden eGFP'den daha fazla fotobeyazlamaya maruz kaldığı anlaşılmaktadır. Beklenildiği gibi iki foton floresans ile görüntülemeye düzlem dışı fotobeyazlama en az seviyededir. Konfokal görüntülemeye ise ayrıca düzlem dışı fotobeyazlama oluşur. DsRed2'yi görüntülerken, konfokal görüntülemeye DsRed2 fotobeyazlamasının, iki foton fotobeyazlamasına yaklaşabilmesi için, çok fazla sayıda yığının ölçülmesi gerekmektedir. eGFP'nin iki foton floresans ile üç boyutlu görüntülenmesi daha fazla nüfuz derinliği ve fotobeyazlamasının konfokal görüntülemeye çok az fazla olması nedeniyle idealdir.

Görüntü iyileştirme için yeni bir ters evrişim yöntemi ve referans görüntünün bilinmediği durumlarda görüntü iyileştirmesini değerlendirebilmek için bir ölçüt önerilmiştir. Bu noktalar ile ilgili olarak şunları belirtebiliriz:

- Fourier Dönüşümü tabanlı SeDDara yönteminin Dalgacık Dönüşümü kullanılarak düzenlenmesi daha az hata vermiştir.
- Daha önce farklı görüntülere uygulan SeDDara yönteminin Dalgacık Dönüşümü tabanlı düzenlenmiş halinin konfokal mikroskop görüntüleri gibi floresans görüntüleme yöntemlerinde uygulanabileceği gösterilmiştir.
- Bu uygulama için Dalgacık Paket Dönüşümü, Ayrık Dalgacık Dönüşümünden daha az hata vermiştir.

- İncelenen örneklem çerçevesinde entropi tabanlı kalite ölçütünün referans görüntünün bilinmediği gerçek durumlarda görüntü netleştirmesini değerlendirmek için kullanılabileceği gösterilmiştir.

Konfokal ve iki foton görüntülemeye nüfuz derinliğini; sadece sinyal zayıflaması değil aynı zamanda artan derinlikle kontrastın ve çözünürlüğün azalması da sınırlamaktadır. Deneysel çalışmalarımızda bu nokta ele alınmamıştır. Bir diğer nokta da; iki foton görüntülemenin konfokal görüntülemeye göre oldukça pahalı olmasıdır. Bu nedenle farklı spektrumda floresans yapan proteinlerin her iki yöntem için de değerlendirilmesi araştırmacılara ekonomik bir tercih yapabilmeleri için fikir verebilecektir.

Önerdiğimiz ters evrişim algoritmasının yinelemeli olarak geliştirilmesi görüntü netleştirmesini arttırmada daha etkili olabilir. Yöntem gürültü atmada diğer yöntemlere göre etkili olsa da daha fazla netleştirme yapması gerekmektedir. Başka bir çalışmanın konusu olabilecek diğer bir husus da; önerdiğimiz görüntü iyileştirme ölçütünün sadece bulanıklaşma değil gürültü ile bozulmaya da hassas olması sağlanmalıdır. Her ne kadar literatürdeki benzer ölçütlerin de çeşitli sınırlılıkları bulunsa da görüntüleri sınıflandırıp ölçütün belirli bir görüntü türü için her iki bozucu etkiyi algılayabilmesi sağlanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agard, D.A., Hiraoka, Y., Shaw, P. & Sedat, J.W.** (1989). Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol* **30**, 353-77.
- Andresen, V., Alexander, S., Heupel, W.M., Hirschberg, M., Hoffman, R.M. & Friedl, P.** (2009). Infrared multiphoton microscopy: subcellular-resolved deep tissue imaging. *Curr Opin Biotechnol* **20**(1), 54-62.
- Anscombe, F.J.** (1948). The transformation of poisson, binomial and negative-binomial data. *Biometrika* **35**(3-4), 246-254.
- Atala, A. & Lanza, R.P.** (2001). *Methods of tissue engineering*. San Diego, CA: Academic Press.
- Barthel, K.U.** (2005). Volume Viewer.
- Bernas, T., Asem, E.K., Robinson, J.P. & Rajwa, B.** (2006). Compression of fluorescence microscopy images based on the signal-to-noise estimation. *Microsc Res Tech* **69**(1), 1-9.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. & Johansen, T.** (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**(4), 603-14.
- Blab, G.A., Lommerse, P.H.M., Cognet, L., Harms, G.S. & Schmidt, T.** (2001). Two-photon excitation action cross-sections of the autofluorescent proteins. *Chemical Physics Letters* **350**(1-2), 71-77.
- Black, L.D., 3rd, Meyers, J.D., Weinbaum, J.S., Shvelidze, Y.A. & Tranquillo, R.T.** (2009). Cell-induced alignment augments twitch force in fibrin gel-based engineered myocardium via gap junction modification. *Tissue Eng Part A* **15**(10), 3099-108.
- Born, M. & Wolf, E.** (1993). *Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. Oxford [etc.]: Pergamon Press.
- Cao, Z., Gilbert, R.J. & He, W.** (2009). Simple agarose-chitosan gel composite system for enhanced neuronal growth in three dimensions. *Biomacromolecules* **10**(10), 2954-9.
- Caron, J.N.** (2011). Application of SeDDara Blind Deconvolution for Efficient Improvement of Confocal Microscopy.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caron, J.N., Namazi, N.M. & Rollins, C.J.** (2002). Noniterative blind data restoration by use of an extracted filter function. *Appl Opt* **41**(32), 6884-9.
- Coifman, R.R. & Donoho, D.L.** (1995). Translation-invariant de-noising. In *Wavelets and Statistics, Lecture Notes in Statistics 103*, A. Antoniadis and: Springer-Verlag.
- Condeelis, J. & Segall, J.E.** (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* **3**(12), 921-30.
- De, I. & Sil, J.** (2010). Wavelet entropy based no-reference quality prediction of distorted/decompressed images. In *Computer Engineering and Technology (ICCET), 2010 2nd International Conference on*, pp. V3-245-V3-250.
- Delpretti, S., Luisier, F., Ramani, S., Blu, T. & Unser, M.** (2008). Multiframe sure-let denoising of timelapse fluorescence microscopy images. In *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on*, pp. 149-152.
- Denk, W., Strickler, J.H. & Webb, W.W.** (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**(4951), 73-6.
- Donoho, D.** (1995). De-noising by soft-thresholding. *IEEE Trans. Inform. Theory* (41), 613--627.
- Donoho, D.L.** (1993a). Nonlinear Wavelet Methods for Recovery of Signals, Densities, and Spectra from Indirect and Noisy Data. In *Proceedings of Symposia in Applied Mathematics*.
- Donoho, D.L.** (1993b). Wavelet shrinkage and W.V.D.: a 10-minute tour. In *Progress in Wavelet Analysis and Applications*.
- Donoho, D.L. & Johnstone, J.M.** (1994). Ideal spatial adaptation by wavelet shrinkage. *Biometrika* **81**(3), 425-455.
- Drobizhev, M., Tillo, S., Makarov, N.S., Hughes, T.E. & Rebane, A.** (2009). Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins. *J Phys Chem B* **113**(4), 855-9.
- Elhayek, A.** (2010). Simultaneous Interpolation and Deconvolution Approach to 3D Reconstruction of Cell Images. In *Computer Science*, Saarbrücken: Saarland University.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fletcher, A.K.** (2002). Denoising via recursive wavelet thresholding. In *Electrical Engineering*, Berkeley: University of California.
- Florian, L., C, dric, V., Thierry, B. & Michael, U.** (2010). Fast interscale wavelet denoising of Poisson-corrupted images. *Signal Process.* **90**(2), 415-427.
- Friedl, P.** (2004). Dynamic imaging of cellular interactions with extracellular matrix. *Histochem Cell Biol* **122**(3), 183-90.
- Fryzlewicz, P. & Nason, G.P.** (2004). A Haar-Fisz Algorithm for Poisson Intensity Estimation. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **13**(3), 621-638.
- Gabarda, S, Cristobal & G.** (2007). *The generalized renyi image entropy: as a noise indicator*. Bellingham, WA, ETATS-UNIS: Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers.
- Gabarda, S. & Cristobal, G.** (2007). Blind image quality assessment through anisotropy. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **24**(12), B42-51.
- Gavrilyuk, S., Polyutov, S., Jha, P.C., Rinkevicius, Z., Agren, H. & Gel'mukhanov, F.** (2007). Many-photon dynamics of photobleaching. *J Phys Chem A* **111**(47), 11961-75.
- Gibson, S.F. & Lanni, F.** (1992). Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy. *J Opt Soc Am A* **9**(1), 154-66.
- Gonzalez, R.C. & Woods, R.E.** (2008). *Digital image processing*. Pearson/Prentice Hall.
- Grgic, S., Grgic, M. & Zovko-Cihlar, B.** (2001). Performance analysis of image compression using wavelets. *Industrial Electronics, IEEE Transactions on* **48**(3), 682-695.
- Griess, G.A., Moreno, E.T., Easom, R.A. & Serwer, P.** (1989). The sieving of spheres during agarose gel electrophoresis: quantitation and modeling. *Biopolymers* **28**(8), 1475-84.
- Hadjantonakis, A.K. & Papaioannou, V.E.** (2004). Dynamic in vivo imaging and cell tracking using a histone fluorescent protein fusion in mice. *BMC Biotechnol* **4**, 33.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hartmann, A., Boukamp, P. & Friedl, P.** (2006). Confocal reflection imaging of 3D fibrin polymers. *Blood Cells Mol Dis* **36**(2), 191-3.
- Haseyama, M., Takezawa, M., Kondo, K., Kitajima, H. & Ieee.** (2000). *An image restoration method using IFS.*
- Hayen, W., Goebeler, M., Kumar, S., Riessen, R. & Nehls, V.** (1999). Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. *J Cell Sci* **112 (Pt 13)**, 2241-51.
- Heikal, A.A., Hess, S.T., Baird, G.S., Tsien, R.Y. & Webb, W.W.** (2000). Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22), 11996-2001.
- Hoying, J.B., Boswell, C.A. & Williams, S.K.** (1996). Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**(7), 409-19.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. & Madihally, S.V.** (2005). In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* **26**(36), 7616-27.
- Isaac Hernandez-Fajardo, G.E., Ioannis Kougioumtzoglou, Xin Ming.** (2008). Signal Denoising using Wavelet-based Methods.
- Jacques, S.L. & Gareau, D.S.** (2006). Confocal microscopy to measure tissue optical properties. In *Saratov Fall Meeting 2005: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VII*, pp. 61630X-5. SPIE.
- Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S.P., Chalabi, K., Sachweh, J.S., Demircan, L., Messmer, B.J. & Turina, M.** (2001). Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* **19**(4), 424-30.
- Kim, Y., Comte, I., Szabo, G., Hockberger, P. & Szele, F.G.** (2009). Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration. *PLoS One* **4**(12), e8122.
- Kino, T.R.C.a.G.S.** (1996). *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems.* San Diego Academic Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kobat, D., Durst, M.E., Nishimura, N., Wong, A.W., Schaffer, C.B. & Xu, C.** (2009). Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Opt Express* **17**(16), 13354-64.
- Koç, Sema, Ergelebi & Ergun.** (2006). *Image restoration by lifting-based wavelet domain E-median filter*. Taejon, COREE, REPUBLIQUE DE: Electronics and Telecommunications Research Institute.
- Kolaczyk, E.D.** (1999). Bayesian Multiscale Models for Poisson Processes. *Journal of the American Statistical Association* **94**(447), 920-933.
- Leavesley, D.I., Schwartz, M.A., Rosenfeld, M. & Cheresh, D.A.** (1993). Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol* **121**(1), 163-70.
- Lefkimmatis, S., Maragos, P. & Papandreou, G.** (2009). Bayesian Inference on Multiscale Models for Poisson Intensity Estimation: Applications to Photon-Limited Image Denoising. *Image Processing, IEEE Transactions on* **18**(8), 1724-1741.
- Li, Y., Lu, J., Wang, L. & Yahagi, T.** (2008). Removal of Gaussian noise from degraded images in wavelet domain. *Electronics and Communications in Japan* **91**(1), 11-18.
- Lien, S.M., Ko, L.Y. & Huang, T.J.** (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* **5**(2), 670-9.
- Lin, P.W., Wu, C.C., Chen, C.H., Ho, H.O., Chen, Y.C. & Sheu, M.T.** (2005). Characterization of cortical neuron outgrowth in two- and three-dimensional culture systems. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **75**(1), 146-57.
- Lu, H., Kim, Y. & Anderson, J.M.M.** (2004). Improved Poisson intensity estimation: denoising application using Poisson data. *Image Processing, IEEE Transactions on* **13**(8), 1128-1135.
- Luisier, F., Blu, T. & Unser, M.** (2011). Image denoising in mixed Poisson-Gaussian noise. *IEEE Trans Image Process* **20**(3), 696-708.
- Ma, P.X. & Elisseeff, J.H.** (2005). *Scaffolding in tissue engineering*. Boca Raton: Taylor&Francis.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mallat, S.G.** (1989). A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* **11**(7), 674-693.
- Mallat, S.G. & Peyré, G.** (2009). *A wavelet tour of signal processing : the sparse way*. Burlington, Mass.: Academic Press.
- McNally, J.G., Karpova, T., Cooper, J. & Conchello, J.A.** (1999). Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods* **19**(3), 373-85.
- Mohler, W., Millard, A.C. & Campagnola, P.J.** (2003). Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* **29**(1), 97-109.
- Moissoglu, K., Slepchenko, B.M., Meller, N., Horwitz, A.F. & Schwartz, M.A.** (2006). In vivo dynamics of Rac-membrane interactions. *Mol Biol Cell* **17**(6), 2770-9.
- Mueller.** (2005). *Introduction to confocal microcopy*. SPIE.
- Murtagh, F., Starck, J.L. & Bijaoui, A.** (1995). Image restoration with noise suppression using a multiresolution support. *Astronomy & Astrophysics Supplement Series* **112**(1), 179-189.
- Nikon.** Fluorescence microscopy digital image gallery. Nikon.
- Niesner, R., Andresen, V., Neumann, J., Spiecker, H. & Gunzer, M.** (2007). The Power of Single and Multibeam Two-Photon Microscopy for High-Resolution and High-Speed Deep Tissue and Intravital Imaging. *Biophysical Journal* **93**(7), 2519-2529.
- Olivo-Marin, J.-C.** (2002). Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recognition* **35**(9), 1989-1996.
- Patterson, G., Day, R.N. & Piston, D.** (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**(Pt 5), 837-8.
- Patterson, G.H. & Piston, D.W.** (2000). Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys J* **78**(4), 2159-62.
- Pawley, J.** (2006). Handbook of Biological Confocal Microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J. Pawley (Ed.): Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pizurica, A., Wink, A.M., Vansteenkiste, E., Philips, W. & Roerdink, B.J.T.M.** A Review of Wavelet Denoising in MRI and Ultrasound Brain Imaging. *Current Medical Imaging Reviews* **2**(2), 247-260.
- Prasad, P.N.** (2003). *Introduction to biophotonics*. Wiley-Interscience.
- Rangarajan, R., Venkataramanan, R. & Shah, S.** (2002). Image Denoising Using Wavelets.
- Ratanavaraporn, J.e.a.** (2006). Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals* **Vol.16**(No.1), pp31-36.
- Sachin D Ruikar, D.D.D.** (2011). Wavelet Based Image Denoising Technique. *International Journal of Advanced Computer Science and Application* **2**.
- Sarder, P. & Nehorai, A.** (2006). Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *Signal Processing Magazine, IEEE* **23**(3), 32-45.
- Seppa, L.** (1988). Effects of a sodium fluoride solution and a varnish with different fluoride concentrations on enamel remineralization in vitro. *European Journal of Oral Sciences* **96**(4), 304-309.
- Shah, S.** (2006). Deconvolution Algorithms for Fluorescence and Electron Microscopy. In *Biomedical Engineering*: University of Michigan.
- Shapiro, J.M.** (1993). Embedded image coding using zerotrees of wavelet coefficients. *Signal Processing, IEEE Transactions on* **41**(12), 3445-3462.
- Strela, V., Heller, P.N., Strang, G., Topiwala, P. & Heil, C.** (1999). The application of multiwavelet filterbanks to image processing. *IEEE Trans Image Process* **8**(4), 548-63.
- Timmermann, K. & Nowak, R.D.** (1999). Multiscale modeling and estimation of Poisson Processes with application to photon-limited imaging. *IEEE Trans. Info. Theory*, vol (45), 846--862.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Wiener, N.** (1949). *Extrapolation, Interpolation and Smoothing of Stationary Time Series with Engineering Applications*. Technology Press and John Wiley & Sons, Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Willett, R.M. & Nowak, R.D.** (2003). Platelets: a multiscale approach for recovering edges and surfaces in photon-limited medical imaging. *Medical Imaging, IEEE Transactions on* **22**(3), 332-350.
- Wolf, K. & Friedl, P.** (2009). Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin Exp Metastasis* **26**(4), 289-98.
- Wu, Q., Merchant, F.A. & Castleman, K.R.** (2008). *Microscope Image Processing*. Amsterdam: Academic Press.
- Wu, R.F., Xu, Y.C., Ma, Z., Nwariaku, F.E., Sarosi, G.A., Jr. & Terada, L.S.** (2005). Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration. *J Cell Biol* **171**(5), 893-904.
- Zipfel, W.R., Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T. & Webb, W.W.** (2003). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12), 7075-80.