PERİFERİK YAYMA SONUÇLARININ OTOMATİK ANALİZİ İÇİN ZEKİ DENETİMLİ SİSTEM TASARIMI

2018
DOKTORA TEZİ
BİLGİSAYAR MÜHENDİSLİĞİ

Abdullah ELEN

PERİFERİK YAYMA SONUÇLARININ OTOMATİK ANALİZİ İÇİN ZEKİ DENETİMLİ SİSTEM TASARIMI

Abdullah ELEN

Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalında
Doktora Tezi
Olarak Hazırlanmıştır

KARABÜK
Mayıs 2018

Abdullah ELEN tarafından hazırlanan "PERİFERİK YAYMA SONUÇLARININ OTOMATİK ANALİZİ İÇİN ZEKİ DENETİMLİ SİSTEM TASARIMI" başlıklı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Kamil TURAN .....
Tez Danışmanı, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

KABUL

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 14/05/2018

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)	İmzası
Başkan : Doç. Dr. Mustafa KÖROĞLU (AKÜ)	.....
Üye : Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ (BEÜ)	.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Kâmil TURAN (KBÜ)	.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi İbrahim ÇAYIROĞLU (KBÜ)	.....
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ümit ATİLA (KBÜ)	.....

...../...../2018

KBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Filiz ERSÖZ .....
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

"Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim."

Abdullah ELEN

ÖZET

Doktora Tezi

PERİFERİK YAYMA SONUÇLARININ OTOMATİK ANALİZİ İÇİN ZEKİ DENETİMLİ SİSTEM TASARIMI

Abdullah ELEN

Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı:
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Kamil TURAN
Mayıs 2018, 175 sayfa

Periferik kan yayma, hastalardan alınan kan örneklerinin klinik laboratuvarda özel boyalarla boyanarak mikroskop ile inceleme tekniğidir. Hastalara ait kan örneklerindeki lökosit, eritrosit ve trombosit hücrelerinin sayılarına ve yüzde oranlarına bakılarak, aynı zamanda morfolojileri de incelenerek kan hastalıklarının tanısı yapılabilmektedir. Ancak, bu yöntem önemli derecede zaman alıcı bir süreçtir ve hematoloji uzmanının değerlendirmesine ihtiyaç duyar. Bu inceleme esnasında uzmanın klinik tecrübesi ve yargıları nedeniyle çoğu zaman kesin bir değerlendirme de sunulmaz. Değerlendirmeler uzmandan uzamana değişiklik de gösterebilir.

Bu çalışma özgün bir motorize mikroskop tasarımı, kan hücre segmentasyonu, lökosit hücrelerinin sınıflandırılması ve geliştirilen motorize mikroskop sisteminin uzaktan kontrolü olmak üzere dört aşamadan meydana gelmektedir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, iki farklı motorize mikroskop prototipi tasarlanarak bilgisayar destekli çalışmasına imkân sağlayan dahili ve harici kontrol yazılımları geliştirilmiştir. İkinci aşamada, periferik kan yayma görüntülerindeki lökosit, eritrosit ve trombosit hücrelerinin çıkartma işlemini otomatik olarak gerçekleştirilen yeni bir segmentasyon algoritması önerilmiştir. Algoritma, her bir görüntüyü evrensel bir küme (lökositler, ertirositler ve trombositler) olarak ele alır ve uygulanan işlemler sonucunda görüntüdeki her bir nesneyi alt küme olarak değerlendirir. Deneysel çalışmalarda farklı ışık koşullarında hazırlanmış 200 kan yayma görüntüsü kullanılarak, geliştirilen yöntemin istatistiksel testleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her üç kan hücresi içinde yüksek derecede doğruluk ve kesinlik başarısı sağlandığı görülmüştür. Üçüncü aşamada, segmente edilen lökosit hücrelerinin Monosit, Lenfosit, Nötrofil, Bazofil ve Eozinofil olmak üzere beş farklı sınıfa ayırabilen makine öğrenme algoritmalarıyla eğitim ve test işlemleri gerçekleştirilmiştir. Dördüncü ve son aşamada ise uzman hekimlerin geliştirilen prototip cihazın uzaktan kontrol edilebilmesi ve hasta veritabanına erişimi için web tabanlı bir uygulama geliştirilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda periferik kan yayma görüntüleri için literatüre yeni bir segmentasyon algoritması kazandırılmıştır. Makine öğrenme algoritmaları ile 350 örnek lökosit görüntüsü kullanılarak, lökosit hücrelerinin sınıflandırılması yapılmış ve algoritmaların performansları karşılaştırılmıştır. Tasarlanan elektromekanik mikroskop sistemi ile geliştirilen algoritmalar birleştirilerek, kan sayımı ve sınıflandırma işlemlerini yapabilen Hemascope isimli prototip bir cihaz üretilmiştir.

Anahtar Sözcükler : Periferik kan yayma, tıbbi görüntü işleme, tıbbi sınıflandırma, kan sayımı, zeki denetimli sistemler.

Bilim Kodu : 924.1.160

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INTELLIGENT CONTROLLED SYSTEM DESIGN FOR AUTOMATIC ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD SMEARS

Abdullah ELEN

Karabük University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Computer Engineering

Thesis Advisor:
Dr. Lecturer Muhammed Kamil TURAN
May 2018, 175 pages

Peripheral blood smear is an examining technique with microscope for blood samples from patients by painting special dyes in clinic laboratories. Blood diseases can be diagnosed by examining morphology, numbers and percentages of leukocyte, erythrocyte and thrombocyte cells in blood samples. However, this method is a considerably time-consuming process and requires an evaluation performed by a hematology specialist. It is not often provided a definitive due to specialist physician's clinical experience and judgment during examination. Additionally, assessments may vary from an expert to another specialist physician.

This study is composed of four sections such as a novel motorized microscope design, blood cell segmentation, leukocyte cell classification and remote control of the developed motorized system.

At the first stage of the thesis study, internal and external softwares that are suitable for computer aided running were developed by designing two different motorized microscope prototypes. At the second stage, a new segmetation algorithm that automatically extracts leukocyte, erythrocyte and thrombocyte cells on peripheral blood smear images was proposed. The algorithm handles each image as a universal set (leukocyte, erythrocyte and thrombocyte). As a result of each applied process, each object on image is evaluated as a subset. Statistical tests were performed fort he developed algorithm by using 200 blood smear images under different light conditions. According to obtained results, high accuracy and precision in all three blood cells were found to be achieved. In the third step, segmented leukocyte cells were subjected to training and testing with machine learning algorithms that distinguish between five different classes, namely Monocyte, Lymphocyte, Neutrophil, Basophil and Eosinophil. In the fourth and last stage, a web-based application was developed for a specialist physician to remote control the developed prototype device and to access the patient database.

As a result of this thesis study, a new segmentation algorithm is added to the literature for peripheral blood smear images. Classification of leukocyte cells was performed using machine learning algorithms and 350 sample leukocyte images, and the performances of the algorithms were compared. The designed electromechanical microscope system was combined with the developed algorithms to produce a prototype device named as Hemascope which can perform blood counting and classification processes.

Key Word : Peripheral blood smear, medical image processing, medical classification, blood counting, intelligent supervised systems.

Science Code : 924.1.160

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Kamil TURAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mekanik tasarım ve montaj sürecinde desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Nafiz YAŞAR'a ve Mücahit ÇOŞKUN kardeşime,

Tez çalışmalarım süresinde üzerimdeki iş yükünü paylaşak bana destek olan mesai arkadaşlarım Türker TOKU'ya ve Müh. Yusuf HAYIRSEVER'e,

Doktora sürecinde bilimsel ve akademik anlamda katkı sağlayan ve tecrübelerinden faydalandığım Ar-Ge ekibimizin mensupları olan Öğr.Gör. Hakan YILMAZ'a, Arş.Gör. Eftal ŞEHİRLİ'ye, Murat KORKMAZ'a ve Kemal Berk ŞAHİN kardeşime,

Bu günlere kadar gelmemde en büyük emeğe sahip olan ve hiçbir yardımı esirgemeden yanımda oldukları için aileme,

Bu çalışmayı ***KBÜ-BAP-15/2-DR-003*** numaralı Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) olarak destekleyen Karabük Üniversitesi'ne;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ii
ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xxi
EKLER DİZİNİ xxii

BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
1.1. LİTERATÜR İNCELEMESİ 3
1.1.1. Eşikleme ve Görüntü Segmentasyonu 3
1.1.2. Lökosit Hücrelerinin Sınıflandırılması 7
1.1.3. Motorize Mikroskop Sistemleri 12

BÖLÜM 2 17
KAN DOKU HİSTOLOJİSİ 17
2.1. LÖKOSTİLER 18
2.1.1. Granülositler 19
2.1.1.1. Nötrofil 20
2.1.1.2. Eozinofil 21
2.1.1.3. Bazofil 22
2.1.2. Agranülositler 22
2.1.2.1. Monosit 23
2.1.2.2. Lenfosit 24
2.2. KIRMIZI KAN HÜCRELERİ 25

Sayfa

2.3.1. Trombosit Granülleri 27
2.3.1.1. Lambda Granülleri 27
2.3.1.2. Delta Granülleri 27
2.3.1.3. Alfa Granülleri 27
2.4. NORMAL KAN DEĞERLERİ 28

BÖLÜM 3 29
PERİFERİK KAN YAYMA 29
3.1. PREPARAT HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ 29
3.1.1. Kama (Wedge) Tekniği 31
3.1.2. Kaydırma Tekniği 33
3.2. BOYAMA YÖNTEMLERİ 34
3.2.1. Giemsa Boyama Yöntemi 35
3.2.2. Wright Boyama Yöntemi 37

BÖLÜM 4 40
GÖRÜNTÜ İŞLEME 40
4.1. GİRİŞ 40
4.2. GÖRÜNTÜ İŞLEME YÖNTEMLERİ 41
4.2.1. Bağlı Bileşen Etiketleme 41
4.2.1.1. Örnek Uygulama 43
4.2.2. Convex Hull 44
4.2.2.1. Oryantasyon 45
4.2.2.2. Graham Scan Örneği 46
4.2.3. Watershed Transform 47
4.3. ÖZELLİK ÇIKARIMI 50
4.3.1. Geometrik Özellikler 52
4.3.2. Dokusal (İstatistiksel) Özellikler 54
4.3.3. Özellik Vektörü Fonksiyonu 56

BÖLÜM 5 57
MAKİNE ÖĞRENME ALGORİTMALARI 57

Sayfa

5.1. GİRİŞ 57
5.2. KARAR AĞACI ÖĞRENMESİ 57
5.2.1. ID3 Algoritması 58
5.2.2. C4.5 Algoritması 59
5.2.3. Twoing Algoritması 59
5.2.4. Gini Algoritması 60
5.3. RASTGELE ORMAN 61
5.4. K-EN YAKIN KOMŞU KENAR 62
5.5. DESTEK VEKTÖR MAKİNELERİ 63
5.5.1. Doğrusal Destek Vektör Makineleri 64
5.5.2. Doğrusal Olmayan Destek Vektör Makineleri 67
5.5.3. Çekirdek Düzenleme ve Fonksiyonları 68
5.5.4. Çok Sınıflı Destek Vektör Makineleri 69
5.6. NAIVE BAYES 70
5.7. MULTINOMIAL LOJİSTİK REGRESYON 72

BÖLÜM 6 75
MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME SİSTEMİ 75
6.1. MİKROSKOBUN TARİHSEL GELİŞİMİ 75
6.2. IŞIK MİKROSKOBU 76
6.2.1. Mikroskop Bileşenleri 76
6.2.1.1. Mekanik Bileşenler 77
6.2.1.2. Optik Bileşenler 78
6.2.1.3. Aydınlatma Bileşenleri 80
6.3. MİKROSKOP BÜYÜTMESİ 81
6.4. GELİŞTİRİLEN PROTOTİPLER 82
6.4.1. Prototip I 83
6.4.1.1. Tasarım 84
6.4.1.2. Mekanik Bileşenler 91
6.4.1.3. Elektronik ve Optik Bileşenler 92
6.4.1.4. Montaj 95
6.4.2. Prototip II 99

Sayfa

6.4.2.1. Tasarım 100
6.4.2.2. Mekanik Bileşenler 104
6.4.2.3. Elektronik ve Optik Bileşenler 104

BÖLÜM 7 105
GELİŞTİRİLEN YAZILIM UYGULAMALARI 105
7.1. HASTA VERİTABANI 105
7.2. KAN HÜCRE SEGMENTASYONU 107
7.2.1. Nükleus Taslak Fonksiyonu (NTF) 110
7.2.2. Sitoplazma Taslak Fonksiyonu (STF) 112
7.2.3. Lökosit ve Trombosit Çıkarımı 115
7.2.4. Eritrosit Taslak Fonksiyonu (NTF) ve Çıkarımı 116
7.3. LÖKOSİT HÜCRELERİNİN SINIFLANDIRILMASI 117
7.4. BİLGİSAYAR DESTEKLİ KONTROL 118
7.4.1. Seri Haberleşme 118
7.4.2. Otomatik Odaklama 120
7.5. UZAKTAN KONTROL 123
7.5.1. Sunucu Yazılımı 123
7.5.2. Uzaktan Kontrol İçin Web Uygulaması 123

BÖLÜM 8 128
DENEYSEL ÇALIŞMALAR 128
8.1. DONANIM TESTLERİ 128
8.2. SEGMENTASYON TESTLERİ 131
8.3. LÖKOSİT SINIFLANDIRMA TESTLERİ 137
8.3.1. Decision Tree (DT) Test Sonuçları 141
8.3.2. k-NN Test Sonuçları 142
8.3.3. MLR Test Sonuçları 143
8.3.4. Naive Bayes Test Sonuçları 144
8.3.5. Random Forest Test Sonuçları 145
8.3.6. SVM Test Sonuçları 146

Sayfa

BÖLÜM 9 148

SONUÇLAR 148

KAYNAKLAR 151

EK AÇIKLAMALAR A. SINIFLANDIRMA ALGORİTMALARININ
EĞİTİM VE TEST BAŞARI ORANLARI 164

ÖZGEÇMİŞ 175

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Ülkere göre tıbbi cihaz sektörü pazar payı. 2
Şekil 1.2. Tomari ve arkadaşlarının geliştirdiği mikroskobi sistemi. 13
Şekil 1.3. Campbell ve arkadaşlarının geliştirdiği motorize mikroskop. 14
Şekil 1.4. Amirunidzam'ın geliştirdiği motorize mikroskop sistemi. 14
Şekil 1.5. Varga ve Romero'nun geliştirdiği motorize mikroskop sistemi. 15
Şekil 1.6. Mohan ve Otto'nun geliştirdiği sistemin blok diyagramı..... 16
Şekil 2.1. Kanın bileşenleri 17
Şekil 2.2. Normal kandaki lökosit türleri ve göreceli yüzdeleri. 19
Şekil 2.3. Nötrofil (Neutrophil)..... 20
Şekil 2.4. Eozinofil (Eosinophil)..... 21
Şekil 2.5. Bazofil (Basophil)..... 22
Şekil 2.6. Monosit (Monocyte). 23
Şekil 2.7. Lenfosit (Lymphocyte). 24
Şekil 2.8. Eritrosit. 25
Şekil 2.9. Trombosit..... 26
Şekil 3.1. İyi hazırlanmış bir kan yayma örneği. 30
Şekil 3.2. Hatalı hazırlanan periferik kan filmleri..... 31
Şekil 3.3. Yayıcıyı doğru bir açıya ayarlama. 32
Şekil 3.4. Kan yayma genişliğinin ayarlanması. 32
Şekil 3.5. Kanın yayılması. 33
Şekil 3.6. Kaydırma tekniğinin işlem adımları. 34
Şekil 3.7. Giemsa boyama tekniğinin aşamaları. 37
Şekil 3.8. Wright boyama tekniğinin aşamaları. 38
Şekil 4.1. Komşu bağlanlatıların iki farklı tipi..... 42
Şekil 4.2. Örnek giriş görüntüsü. 43
Şekil 4.3. 4-bağlantılı uygulama örneği. 43
Şekil 4.4. 8-bağlantılı uygulama örneği. 44
Şekil 4.5. Sonuç görüntüleri..... 44
Şekil 4.6. Bir dizi noktanın polar açılarına göre sıralanması. 45

Sayfa

Şekil 4.7. Üç noktanın oryanyasyonu. 45
Şekil 4.8. Oryantasyon hesaplanmasında kullanılan parametreler. 46
Şekil 4.9. Noktaların bükeylik durumları. 46
Şekil 4.10. Graham scan yönteminin işlem adımları. 47
Şekil 4.11. Yağmursuyu havzası. 48
Şekil 4.12. Watershed dönüşümünün su baskını simülasyonu. 50
Şekil 5.1. Yeni bir örneğin ($k = 3$) değerine göre sınıflandırılması. 62
Şekil 5.2. Doğrusal DVM'lerde ayırma düzlemleri. 65
Şekil 5.3. Doğrusal olarak ayrılabilen veri setleri. 66
Şekil 5.4. Doğrusal olmayan DVM'lerde ayırma düzlemleri. 67
Şekil 5.5. Çekirdek fonksiyonu kullanarak veri setinin daha büyük bir boyuta dönüştürülmesi. 68
Şekil 6.1. Anton von Leeuwenhoek'un geliştirdiği mikroskop. 75
Şekil 6.2. Trinoküler ışık mikroskobunun bileşenleri. 77
Şekil 6.3. Objektif. 78
Şekil 6.4. Objektif büyütme kudretine göre renk kodları. 79
Şekil 6.5. Dijital mikroskop sistemi. 81
Şekil 6.6. Sistemin izometrik görünümü. 84
Şekil 6.7. X-Ekseni dış görüntüsü. 85
Şekil 6.8. X-Ekseni iç görüntüsü. 86
Şekil 6.9. Y-ekseni izometrik görüntüsü. 87
Şekil 6.10. Y-ekseninin alttan görünümü. 88
Şekil 6.11. Z-ekseni izometrik görüntüsü. 89
Şekil 6.12. Tasarlanan mekanik bağlantı parçaları. 90
Şekil 6.13. Mekanik bileşenler. 91
Şekil 6.14. Optik kontrol bileşenleri. 93
Şekil 6.15. Elektronik bileşenler. 94
Şekil 6.16. Mekanik montaj aşamaları I. 96
Şekil 6.17. Mekanik montaj aşamaları II. 96
Şekil 6.18. Elektronik montaj aşamaları I. 97
Şekil 6.19. Elektronik montaj aşamaları II. 97
Şekil 6.20. Elektronik montaj aşamaları III. 98
Şekil 6.21. Elektronik montaj aşamaları IV. 98
Şekil 6.22. Elektronik montaj aşamaları V. 99

Sayfa

Şekil 6.23. Prototip II: X-ekseninin izometrik görünümü. 100
Şekil 6.24. Prototip II: Y-ekseninin izometrik görünümü. 101
Şekil 6.25. Prototip II: montajlanmış X ve Y eksenlerinin izometrik görünümü. ... 102
Şekil 6.26. Prototip II: sistemin izometrik görünümü. 104
Şekil 7.1. Dijital kan görüntülerinin saklanması. 106
Şekil 7.2. Segmentasyon yönteminin genel akış diyagramı. 109
Şekil 7.3. Örnek bir kan görüntüsüne ait RGB renk bileşenleri. 110
Şekil 7.4. Nükleus taslak fonksiyonu işlem adımları. 112
Şekil 7.5. Sitoplazma taslak fonksiyonu işlem adımları. 114
Şekil 7.6. Lökosit ve trombosit çıkarımına ait işlem adımları. 115
Şekil 7.7. Eritrosit bölütleme işlem basamakları. 116
Şekil 7.8. Eritrosit çıkarımı. 117
Şekil 7.9. Arduino kart bağlantı şeması. 119
Şekil 7.10. Otomatik odaklama fonksiyonunun genel akış diyagramı. 121
Şekil 7.11. Otomatik odaklama grafiği. 122
Şekil 7.12. Odaklama değerine göre elde edilen görüntüler. 122
Şekil 7.13. Uzaktan kontrol sistemine giriş ekranı. 123
Şekil 7.14. Sisteme giriş yapan uzmana ait kullanıcı bilgi ekranı. 124
Şekil 7.15. Hasta kayıt listesi. 124
Şekil 7.16. Hastalara ait yapılan kan analizi ve inceleme listesi. 125
Şekil 7.17. Bir hastaya ait detaylı kan yayma sonuçları. 125
Şekil 7.18. Bir hastaya ait kan görüntülerinin haritalanması. 126
Şekil 7.19. Motorize mikroskop sisteminin gerçek zamanlı çalışabilen olarak uzaktan kontrol paneli. 127
Şekil 8.1. X ve Y eksenlerine göre konumlandırma grafiği. 129
Şekil 8.2. Mekanik dişli sistemindeki boşluk (backlash). 130
Şekil 8.3. Dataset-1. 131
Şekil 8.4. Dataset-2. 132
Şekil 8.5. Dataset sonuçlarının karşılaştırılması. 133
Şekil 8.6. Ayrıntılı segmentasyon örnekleri. 136
Şekil 8.7. Lökosit hücrelerinin sınıflandırmasında kullanılan özellikler. 137
Şekil 8.8. vs(25, 75)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı. 139
Şekil 8.9. vs(33, 67)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı. 139
Şekil 8.10. vs(50, 50)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı. 140

Sayfa

Şekil 8.11. vs(67, 33)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı. 140
Şekil 8.12. vs(75, 25)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı. 140
Şekil 8.13. DT'nin sınıflandırma başarı oranları. 141
Şekil 8.14. k-NN'nin sınıflandırma başarı oranları..... 142
Şekil 8.15. MLR'nin sınıflandırma başarı oranları. 143
Şekil 8.16. NB'nin sınıflandırma başarı oranları. 144
Şekil 8.17. RF'nin sınıflandırma başarı oranları. 145
Şekil 8.18. SVM'nin sınıflandırma başarı oranları. 146
Şekil 8.19. Makine öğrenme algoritmalarının karşılaştırılması. 147
Şekil Ek A.1. DT'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 165
Şekil Ek A.2. k-NN'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları..... 165
Şekil Ek A.3. MLR'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 165
Şekil Ek A.4. NB'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 166
Şekil Ek A.5. RF'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 166
Şekil Ek A.6. SVM'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 166
Şekil Ek A.7. DT'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 167
Şekil Ek A.8. k-NN'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları..... 167
Şekil Ek A.9. MLR'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 167
Şekil Ek A.10. NB'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 168
Şekil Ek A.11. RF'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 168
Şekil Ek A.12. SVM'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 168
Şekil Ek A.13. DT'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 169
Şekil Ek A.14. k-NN'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları..... 169
Şekil Ek A.15. MLR'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 169
Şekil Ek A.16. NB'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 170
Şekil Ek A.17. RF'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 170
Şekil Ek A.18. SVM'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları. 170
Şekil Ek A.19. DT'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 171
Şekil Ek A.20. k-NN'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları..... 171
Şekil Ek A.21. MLR'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 171
Şekil Ek A.22. NB'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 172
Şekil Ek A.23. RF'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 172
Şekil Ek A.24. SVM'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 172

Sayfa

Şekil Ek A.25. DT'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 173
Şekil Ek A.26. k-NN'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları..... 173
Şekil Ek A.27. MLR'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 173
Şekil Ek A.28. NB'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 174
Şekil Ek A.29. RF'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları..... 174
Şekil Ek A.30. SVM'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları. 174

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Kanın şekilli elemanlarının özeti. 18
Çizelge 2.2. Normal kan değerleri. 28
Çizelge 3.1. Giemsa boyasının hazırlanması. 36
Çizelge 5.1. Random Forest algoritması. 61
Çizelge 5.2. DVM'de kullanılan temel çekirdek fonksiyonları ve parametreleri. ... 69
Çizelge 6.1. X-Ekseni dış görüntüsüne ait parça ve malzeme listesi. 85
Çizelge 6.2. X-Ekseni iç görüntüsüne ait parça ve malzeme listesi. 86
Çizelge 6.3. Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi. 87
Çizelge 6.4. Y-ekseninin alttan görünümüne ait parça ve malzeme listesi. 88
Çizelge 6.5. Z-eksenine ait parça ve malzeme listesi. 89
Çizelge 6.6. Mekanik malzeme listesi. 91
Çizelge 6.7. Optik kontrol malzeme listesi. 92
Çizelge 6.8. Elektronik kontrol malzeme listesi. 92
Çizelge 6.9. Prototip II: X-eksenine ait parça ve malzeme listesi. 101
Çizelge 6.10. Prototip II: Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi. 102
Çizelge 6.11. Prototip II: X ve Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi. 103
Çizelge 6.12. Prototip II: izometrik görünüme ait parça ve malzeme listesi. 103
Çizelge 7.1. Dijital kamera özellikleri. 107
Çizelge 7.2. Komut durumları. 119
Çizelge 7.3. Seri haberleşmede kullanılan komut seti. 119
Çizelge 8.1. İstatistiksel ölçümler. 128
Çizelge 8.2. X ve Y eksenlerine göre konumladırma testleri. 129
Çizelge 8.3. Mekanik sisteme ait teknik özellikler. 130
Çizelge 8.4. Dataset-1 sonuçları. 131
Çizelge 8.5. Dataset-2 sonuçları. 132
Çizelge 8.6. Dataset-1 ve Dataset-2'nin ortalama değerleri. 133
Çizelge 8.7. Lökosit değerlerinin karşılaştırılması. 133
Çizelge 8.8. Eritrosit değerlerinin karşılaştırılması. 134
Çizelge 8.9. Trombosit değerlerinin karşılaştırılması. 135

Sayfa

Çizelge 8.10. Lökosit sınıflandırmasında kullanılan özelliklerin açıklamaları. 137
Çizelge 8.11. Oluşturulan veri setleri ve özellikleri..... 138
Çizelge 8.12. DT sınıflandırma başarısı istatistikleri..... 141
Çizelge 8.13. k-NN sınıflandırma başarısı istatistikleri..... 142
Çizelge 8.14. MLR sınıflandırma başarısı istatistikleri. 143
Çizelge 8.15. Naive Bayes sınıflandırma başarısı istatistikleri..... 144
Çizelge 8.16. Random Forest sınıflandırma başarısı istatistikleri..... 145
Çizelge 8.17. SVM sınıflandırma başarısı istatistikleri. 146

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

σ : standart sapma

μ : ortalama

KISALTMALAR

WBC : White Blood Cell (Beyaz Kan Hücresi, Akyuvar)

RBC : Red Blood Cell (Kırmızı Kan Hücresi, Alyuvar)

PLT : Platelet ya da Thrombocyte (Kan Pulcuğu)

PML : Polimorfonükleer Lökosit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

MCV : Mean Corpuscular Volume (Ortalama Eritosit Büyüklüğü)

MPV : Mean Platelet Volume (Ortalama Trombosit Büyüklüğü)

CCL : Connected Components Labeling (Bağlı Bileşen Etiketleme)

PCA : Principal Component Analysis (Temel Bileşen Analizi)

NTF : Nükleus Taslak Fonksiyonu

STF : Sitoplazma Taslak Fonksiyonu

ETF : Eritrosit Taslak Fonksiyonu

SVM : Support Vector Machine (Destek Vektör Makinesi)

MLR : Multinominal Logistic Regression (Multinominal Lojistik Regresyon)

DTL : Decision Tree Learning (Karar Ağacı Öğrenmesi)

MLP : Multi Layer Perceptron (Çok Katmanlı Perseptron)

K-NN : k-Nearest Neighbors (k-En Yakın Komşu Kenar)

FOW : Field of Wiev (Görüş Alanı)

3D : 3-Dimension (3-Boyutlu)

EKLER DİZİNİ

(Aşağıdaki ekler arka kapaktaki ceptedir.)

Ek I. Hasta veritabanı ER diyagramı.

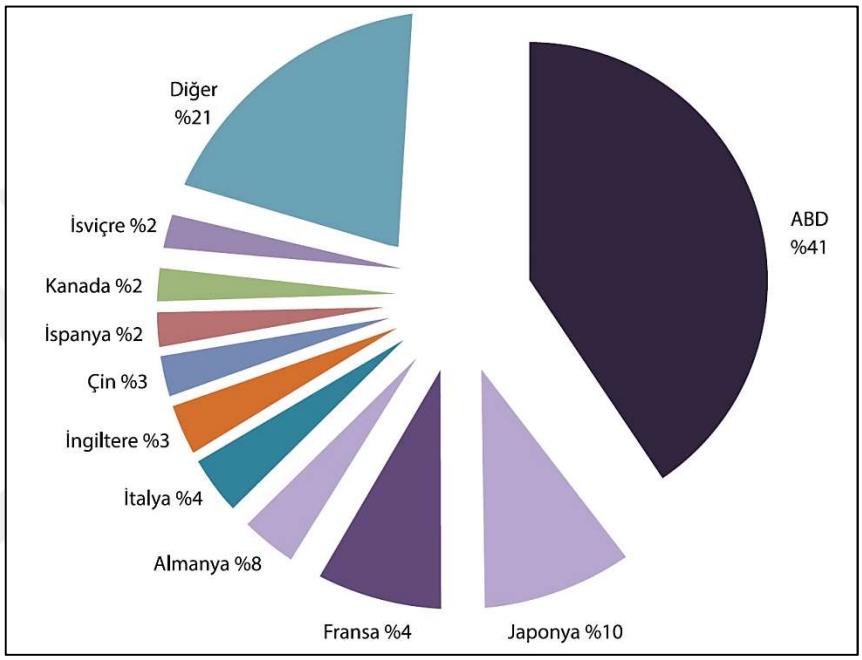
BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kan, vücutta kardiovasküler sistem dediğimiz kalp ve damarlardan oluşan "dolaşım" sistemi içerisinde dolaşan plazma ve kan hücrelerinden oluşan bir yapıdır. Kan ve bileşenleri, insan yaşamında önemli bir yere sahip olup birçok patolojik durumun tespitinde en iyi gösterge aracıdır. Hematoloji alanında periferik kan yayma sonuçlarının mikroskobik analizi, maliyetli ve zaman alıcı bir süreçtir [1-12]. Beyaz kan hücrelerinin (lökosit, WBC) doğası gereği sabit şekillerde bulunmaması nedeniyle çoğu zaman yanlış tanımlama yapılmasına ve sınıflandırılmasına yol açar [1-3,13]. Diğer yandan kırmızı kan hücrelerinin (eritrosit, RBC) sayımında, bazı hücrelerin üst üste yığılmış diskler şeklinde bitişik olmaları sebebiyle kesin bir sonuç elde etmek büyük bir sorundur. Bu sebeple, geleneksel yöntemlerle yapılan kan analizlerinde bu gibi sorunlarla karşılaşma olasılığı oldukça yüksektir. Aynı zamanda, analizi yapan uzmanın (hematolog) istatistiksel önyargı ve tutarsızlıklar [8-11] nedeniyle de hem sonuçların sübjektif değerlendirilmesine hem de sürecin yavaş ilerlemesine neden olur [14-16]. Bu nedenlerden dolayı, geleneksel yöntemlerin yerine bilgisayar destekli sistemlerin geliştirilmesi ve kullanılması, analiz sürecinin hız kazanmasına ve daha doğru sonuçlar elde edilebilmesine büyük ölçüde katkı sağlayacaktır [2-4].

Son yıllarda, medikal görüntülerin otomatik analizi için görüntü işleme, yapay zekâ ve diğer bilgisayar grafiği tekniklerinin bir araya getirilmesiyle çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir [9,15,17]. Yapılan bu çalışmalarda büyük ölçüde başarı sağlandığı görülmüştür. Ancak periferik kan yayma analizlerinde, kanın tüm şekilli elemanlarını (Eritrosit, Lökosit ve Trombosit) eş zamanlı olarak ve otomatikmen segmente edebilen ve sınıflandırma yapabilen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Tıbbi cihaz sektörü dünyada çok hızla büyümektedir. Sektörün büyümesinde, uzun süre önce bu sektöre teknolojik öncelik vermiş olan A.B.D., Japonya, Avrupa Birliği Ülkeleri ve Çin gibi ülkeler öncülük etmektedir. Öyle ki, söz konusu ülkeler ulaştıkları pazar payına göre dünya tıbbi cihaz pazarında yüksek oranlara sahiptir. Buna göre A.B.D. %41 oranında, Avrupa Birliği %23 oranında, Japonya ise %10 oranında dünya tıbbi

cihaz pazarında söz sahibi durumdadır [18]. Ülkemizde sağlık sektöründe faaliyet gösteren 450 civarında orta ve büyük ölçekli firmanın yaklaşık 100 tanesi tıbbi cihaz üretimi yapabilmektedir. Ayrıca dünyadaki toplam biyoteknoloji patentlerinden alınan pay ise %0,02 gibi çok düşük oranlarda seyretmektedir ve dünya tıbbi cihaz sanayi sektöründe yaratılan katma değer ise %0,74 oranındadır. Şekil 1.1'de ülkelere göre tıbbi cihaz sektörü pazar payları gösterilmektedir [19].



Şekil 1.1. Ülkere göre tıbbi cihaz sektörü pazar payı [19].

Tıbbi cihazlar kapsamındaki ürünlerin neredeyse tamamının ithal yoluyla karşılanması demek olan bu durum Türkiye'deki tıbbi cihazların üretiminin halen istenen düzeyde olmadığının göstergesidir. Sektör teknolojik olarak önemli ölçüde dışa bağımlıdır. Bu açıdan bakıldığında geliştirilmesi planlanan sistemin ülkemiz sağlık sektörü için bir katma değer oluşturacağı düşünülmektedir. Geliştrilen sistemin ülkemizde daha önce bilimsel olarak çalışılmamış olması da önem arz etmektedir. Özellikle Türkiye'de bulunan hematolog sayısının az sayıda olması nedeniyle Sağlık Bakanlığı tarafından nüfus yoğnluğunun düşük olduğu lokasyonlara uzman hematolog ataması yapılmadığı da göz önüne alındığında uzaktan kontrollü sistemler ve tam otomatik makineler maliyet ve efektiviteyi oldukça etkileyen faktörler olarak karşımıza çıkacaktır.

1.1. LİTERATÜR İNCELEMESİ

Literatür incelemesi daha anlaşılır kılmak için üç alt başlığa bölünmştür. Birinci kısımda eşikleme ve görüntü segmentayonyu metotları, ikinci kısımda lökosit hücrelerinin sınfılandırılması ve üçüncü kısımda ise motorize mikroskop sistemleri ve elektromekanik sistemerin incelenmesi yapılmıştır.

1.1.1. Eşikleme ve Görüntü Segmentasyonu

Eşikleme (thresholding), görüntü segmentasyonu için uygulanan en eski yöntemlerden biridir. Yöntemin sadeliği, sezgisel özellikleri, düşük hesaplama maliyeti ve hızlı olması nedeniyle görüntü işleme uygulamalarında merkezi bir konuma getirmiştir [20,21]. Hücre segmentasyonunda, eşikleme işlemenin ardından birçok çalışmada morfolojik yöntemler uygulanmıştır [22,23]. Bölge tabanlı yaklaşımda, bir piksel nesne olarak algılanır ve görüntünün yalnızca gri ölçekli değerine bakılarak işlem yapılır. Bu yöntem, bir görüntüdeki benzer özellikleri (renk, parlaklık vb.) [24,25] dikkate alarak görüntünün farklı bölgelere ayrılması prensibine dayanır [22]. Homojenlik kriterini karşılayan tüm pikseller bir arada gruplanır. Son yıllarda kan yayma görüntülerinin segmentasyonu için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar genelde lökosit veya eritrosit segmentasyonu üzerinedir [26].

Madhloom vd. [27], mikroskobik kan görüntüsü kullanarak, lenfoblast (lenfositlerin öncüsü olan ve kanserde görülen bir tip hücre) hücrelerini yüksek doğrulukta segmente edebilen bir yöntem geliştirmişlerdir. Lenfoblast hücrelerini diğer kan hücrelerinden ayırabilmek için hücrenin renk özellikleriyle morfolojik yeniden yapılandırma işlemini bir araya getirmişlerdir. Test ettikleri 180 adet kan görüntüsü ile 100% başarı elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Liu vd. [28], farklı aydınlatma ortamlarında periferik kan yayma ve kemik iliği yayma görüntülerindeki beyaz kan hücrelerinin segmentasyonu için mean shift clustering, renk uzayı dönüşümü ve nucleus mark watershed operation yöntemlerini kullanmışlardır.

Tareef vd. [29], renk ve doku iyileştirmesine dayalı beyaz kan hücrelerini beş ana sınıfa göre çekirdek ve sitoplazmalarını otomatik olarak segmente eden bir yöntem geliştirmişlerdir. Segmentasyon sürecinde sitoplazmayı daha belirgin hale getirmek ve hücre çekirdeğindeki ayrıntıları ortadan kaldırmak için discrete wavelet transform (DWT) ve morfolojik filtrelerden faydalanmışlardır. Buna göre diğer renk tabanlı yöntemlere nazaran daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir.

Jiang vd. [30], scale-space filtering ve watershed clustering yöntemlerini kullanarak yeni bir WBC segmentasyon tekniği geliştirmişlerdir. Lökosit çekirdeğini elde etmek için scale-space filtering yöntemini ve daha sonra sitoplazma bölgesini çıkarmak için 3D HSV histogramı üzerinde watershed clustering uygulamışlardır. Önerdikleri yöntem, daha önceki çalışmalara göre çok daha iyi performans sağladığını ifade etmişlerdir.

Salem [31], lökosit segmentasyonu için RGB formatındaki mikroskobik kan görüntülerini L*a*b renk uzayına dönüştürmüş ve daha sonra a ve b renk bileşenlerini K-means clustering tekniği için parametre olarak kullanmıştır.

Sadr vd. [32], Lökosit hücre çekirdeklerinin otomatik segmentasyonu için kan görüntülerini YCbCr renk uzayına dönüştürmüşler ve görüntüdeki her bir Cb (blue-difference, mavi farkı) renk bileşenini Y (aydınlık) renk bileşenine bölerek hücre çekirdeğini daha belirgin hale getirmişlerdir. Yöntemin performansını artırmak için Cb ve Y bileşenlerine maksimum ve minimum filtreleri uygulamışlardır.

Yang vd. [33], lökositlerin segmentasyonu için kan görüntülerini HSI (Hue-Saturation-Intensity) renk uzayına dönüştürerek, buradaki S (Satrasyon) bileşenini ve RGB renk uzayındaki B (Blue) bileşenini kullanmışlardır. Bu renk bileşenlerine göre, aynı resimden elde ettikleri iki farklı binary görüntüyü AND ve XOR mantıksal işlemlerine tabii tutarak lökosit çekirdeğini ve sitoplazma sınırlarını tespit etmeyi başarmışlardır.

Arslan vd. [7], lökosit segmentasyonu için renk ve şekil tabanlı algoritmalardan faydalanmışlardır. Çalışma transformasyon ve hücre segmentasyonu olmak üzere iki aşamadan oluşur. İlk aşamada kan görüntüsünün RGB uzayındaki B ve G renk

bileşenlerinin farkını alarak bir yoğunluk haritası elde etmişlerdir. Daha sonra binary'e dönüşümü ve distance transform yapılarak hücrelerin yerlerini işaretlemişlerdir. Elde ettikleri görüntüye watershed ve connected component labeling yöntemlerini uygulayarak beyaz kan hücrelerini başarılı bir şekilde segmente etmişlerdir.

Sadeghian vd. [34] lökosit ekstraksiyonu için gri tonlamaları kullanan bir yöntem önermektedirler. Lökosit çekirdeği Gradient Vector Flow (GVF) snake-model adı verilen bir kontur modelleme yöntemi kullanılarak çıkarılır. Önerilen bu yöntemin lökositlerin segmentasyonunda %92 ve sitoplazmanın segmentasyonunda %78 doğruluk oranı bulduklarını bildirmişlerdir.

Kontur izlemeyi kullanan bir diğer çalışma grubu Vromen vd. [35], önerdikleri yöntem tek renkli görüntüler kullanır ve bireysel piksellerin gradyan vektörlerini kullanarak kontur izlerini belirler. 800 SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) görüntüsü kullanarak, geliştirdikleri yöntemin konturları algılamada %85-%95 aralığında başarı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Mahmood ve Mansor [36], mikroskopik kan hücresi görüntüsünde RBC'leri algılamak ve saymak için morfolojik filtreleri ve Hough dönüşüm tekniğini kullanmışlardır. 10 görüntü üzerinde yaptıkları testlerde %96'ya yakın başarı sağlamışlardır.

Gao vd. [37], lökosit hücrelerinin segmentasyonu için bir çalışma yapmışlardır. Non-decimated Complex Wavelet Transform (NDXWT) yöntemini kullanarak sitoplazmanın dokusal bir gradyanını çıkardılar. Çıkarma için Watershed algoritması kullanmışlar ve sonuçta görüntü zenginleştirme teknikleri kullanılarak rafine edilmiştir. İki boyutlu hale getirmek için adaptif bir eşikleme yöntemi kullanmışlardır.

Abd Halim vd. [38], HSV (Hue Saturated Value) renk uzayında Saturated (doygunluk) bileşenini incelediler. Lökositler bu bileşende yüksek kontrast gösterdiği için doygunluk bileşeni üzerinden renk tabanlı segmentasyon yöntemini uyguladılar.

Sharif vd. [39], orijinal görüntüyü RGB'den YCbCr renk uzayına dönüştürdüler ve YCbCr'nin ikinci bileşenini seçtiler. Cb seçiminde lökositlerin sınıflandırılmasına ilişkin birçok bilgi bulunduğunu ve görüntünün kalitesini etkileyen aydınlatmanın normalleştirilmesinde daha etkili olduğu ifade etmişlerdir.

Mohapatra vd. [40], insan lenfosit görüntülerinin segmentasyonu için Kernel Induced Rough C-means (KIRCM) kümeleme algoritmasını kullanmışlardır. Rough C–means clustering (RCM) ile daha yüksek oranda bölümleme doğruluğu ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) algılamayı kolaylaştırmak için daha büyük boyutlu özellik alanları elde etmek istemişlerdir. Yaptıkları analiz sonucunda, lökosit bölünmesi için çekirdek alanı kümelenmesinde önerdikleri metodun mevcut yöntemlere göre daha iyi bir avantaj sağladığını ifade etmişlerdir.

Abbas vd. [41], Lökosit segmentasyonu için RGB görüntüsündeki yeşil kanalın düşük yoğunluklu değerleri artırmak ve yine bu kanaldaki yüksek değerleri bastırmak için dinamik konvolüsyon filtresi tasarlayarak, doğruluk ve verimlilik açısından daha iyi bir yöntem önerdiklerini ifade etmişlerdir. Önerdikleri yöntem, %95,89'luk bir genel doğruluğa ulaşan 365 görüntü üzerinde test edilmiştir.

Lim vd. [42], lökosit hücrelerini segmente etmek için HSI renk uzayında morfolojik yöntemleri kullanmışlardır. Hücre çekirdeği segmentasyonunda, gri tonlamalı görüntüde kontrast düzeltme teknikleri kullanılarak gürültü giderme işlemi yapılmıştır. Bu yöntemin basit olmasına rağmen, akut miyelositik lösemi kan görüntülerinde çekirdeğin gri değeri sitoplazmaya yakın olduğunda, doğru bir şekilde bölütleme yapılamadığını bildirmişlerdir.

Rezatofighi vd. [43], periferik kandaki beş tip lökosit çekirdeğini bölütlemek için Gram-Schmidt ortogonalizasyonuna dayanan bir teknik denemişlerdir. Bu yöntemde hücre çekirdeğinin sınırları, lökositlerin sınırlarını belirlemede başlangıç konturu olarak kullanılmıştır.

Ko vd. [44], mean shift clustering ve gradient vector flow snake yöntemlerini bir araya getirerek sınır çıkarımı yapabilen bir lökosit bölütleme algoritması

önermişlerdir. Bu algoritmalar hücrelerin ayırt edilmesinde son derece etkili olmasına rağmen zaman maliyetinin yüksek olduğunu ve üst üste binen lökositlerde başarılı olmadığını bildirmişlerdir.

1.1.2. Lökosit Hücrelerinin Sınıflandırılması

Su vd. [45], yapmış oldukları çalışmaya göre, beş çeşit lökosit hücresini sınıflandırılması için HSI renk uzayında lökostilerin ayırdedici özelliklerini çıkarttılar. Bu bölgede bulunan eliptik alanlar lökosit çekirdeği ve sitoplazması olarak kabul edilip, daha sonra morfolojik işlemlerle segmente etmeyi amaçladılar. Bu görüntü segmentlerinden geometrik özellikler, renk özellikleri ve LDP (Local Directional Pattern) tabanlı olarak doku özellikleri çıkartılarak, üç farklı sinir ağında eğittiler. Sınıflandırma testlerinde 450 lökosit görüntüsü kullandılar ve en yüksek doğru tanımlama oranı %99,11 olarak bulmuşlardır.

Nazlıbilek vd. [46], kan yayma görüntüleri kullandılar. Geliştirdikleri yöntem, otomatik olarak lökosit sayar, boyutlarını doğru olarak belirler ve bunları beş alt sınıfına ayırır. Sınıflandırma aracı olarak çok katmanlı sinir ağı kullandılar. Yapılan testlerde, PCA (Principal Component Analysis) kullanmadan sınıflandırma sonucu %65, PCA sonrası ise bu oran %95'e kadar yükseldiğini belirtmişlerdir.

Sanei ve Lee [47] yaptıkları çalışmada, Turk ve Pentland'nin tek renkli (monokrom) görüntülerden özvektör seçimi çalışmalarını geliştirmeyi amaçladılar. Buna göre, monokrom görüntü yerine renkli görüntüdeki üç bileşeni kullandılar. Bayes sınıflandırıcısı ile görüntünün fiziksel veya geometrik özelliklerini değil, öz hücreleri (Eigen cells) sınıflandırdılar. Karar verme sürecinde parametre olarak, yoğunluk ve renk bilgisini kullandılar. İlk olarak giriş görüntülerini yeniden ölçekleme yaptılar ve sonra segmentlere ayırıp döndürme (Rotation) işlemi yapılmış ve sonunda yoğunluk ve renk bilgisini temsil eden 3 vektör tanımlamışlardır.

Sarrafzadeh vd. [48], 10 hastaya ait 149 lökosit görüntüsünü kullandılar. Sınıflandırıcı olarak, SVM için 6 geometrik özelliği, 6 renk özelliği, 6 istatistiksel özellik ve 7 moment değişmezliği (invaryantı) parametre olarak kullandılar.

Sınıflandırıcı %93'ün üzerinde başarı sağladıklarını bildirmişlerdir. Görüntülerdeki lökosit sınırları segmentasyon hatalarının etkilerini azaltmak için elle belirlenmiştir. Lökositlerin çekirdeği ve sitoplazması otomatik olarak fuzzy C-means kümeleme yöntemi ile ayrılmıştır. Sonra, çekirdeğin, sitoplazmanın ve hücrenin tümünden uygun özellikler çıkarılır. SVM ile bu özellikler sınıflandırılır.

Gomez-Gil vd. [49,50], Lökositlerdeki benzer özellikleri ve yapay görüntülerin çıkarılması için morfolojik operatörler kullandılar. Özellik olarak; vektör tabanlı doku spektrumu (Pecstrum), normalleştirilmiş alan ve hücre çekirdeği, sitoplazma yarıçapını seçmişlerdir. Sınıflandırma için Euclidean distance, k-NN, Back Propagation NN ve SVM yöntemleri kullanmışlardır. 36 doku örneği eğitim için, 18 taneside test için kullanılmış ve %87 başarı sağladıklarını bildirmişlerdir. En iyi sonuç olarak, 19 gizli katmanı olan bir FF-NN ile %87,6 oranında doğru sınıflandırma yapılmıştır.

Stadelmann vd. [51], HSV renk uzayında lökosit çekirdeğini ve sitoplazmasını segmente etmişlerdir. Sınıflandırmada 12 kan yayma örneği için AdaBoost metodunu tercih etmişlerdir. Ancak bazofil nadir bulunduğu için sınıflamaya dahil edilmemiştir. Geliştirdikleri sistem %90 oranında başarı sağlamıştır. Ancak monosit ve eozinofil sınıflandırma başarısı daha düşük sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Hiremath vd. [52], Sadece lenfosit, monosit ve nötrofil hücreleri için; histogram eşitleme, kenar çıkarma ve eşikleme gibi renk tabanlı otomatik segmentasyonu yapmışlardır. Sınıflandırma işlemi için imgelerin geometrik özelliklerinden faydalanılmış ve deneylerde 100 farklı kan yayma görüntüsü kullanılmışlardır.

Xie vd. [53], yapmış oldukları çalışmada, makine mühendisliği ve teorik fizikte yaygın olarak kullanılan Poisson kısmi diferansiyel denklemini, lökosit çekirdeklerinin şekil özelliklerini çıkarmak için önermişlerdir. Segmentasyon sonucunda elde edilen özelliklere göre yapılan sınıflandırmada lenfosit hücresi için %98 civarında en yüksek başarı elde edilirken, Monosit hücresi için bu skor %75 civarında olduğu görülmektedir.

Ko vd. [54], 240 kan yayma görüntüsünün yarısını eğitim için, diğer yarısını da test için kullanmışlardır. Sınıflandırmada sürecinde Random Forest yöntemini tercih etmişler ve Multi-layer SVM'e göre daha yüksek başarı elde ettiklerini iddia etmişlerdir. Bir önceki çalışmalarında GVF Snake algoritması ile lökosit segmentasyonu önermişlerdir. Sınıflandırma parametresi olarak görüntünün şekil, renk ve doku özelliklerinden faydalanmışlardır. Öznitelik çıkarımı işleminden sonra her bir özellik vektörünü Gauss normalizasyonu ile 0-1 arası normalize etmişlerdir.

Habibzadeh vd. [55], Mikroskobik kan görüntülerinin şekil, yoğunluk ve doku özelliklerini kullanarak lökositlerin 5 ayrı kategoriye göre sınıflandırma ve sayım işlemlerini yapmayı amaçlamışlardır. Sınıflandırma işlemi için Dual-Tree Complex Wavelet Transform(DT-CWT) yöntemi ile elde ettikleri dalgacık özelliklerini SVM sınıflandırıcısının parametreleri olarak kullanılmıştır.

Ramesh vd. [56], renk bilgisi ve morfolojik özellikleri kullanarak basit bir sınıflandırma yöntemi önermişlerdir. İki aşamalı bir sınıflandırma sürecinin ilk adımı olarak, lökosit hücre çekirdeklerini ve lökosit sınırlarını segmente edilmiş halleriyle geniş sınıflandırma yapmışlardır. İkinci adımda ise Lineer Discriminant Analysis yöntemi ile lökosit sitoplazma ve çekirdeğinden elde ettikleri özellikleri kullanmışlardır.

Ferri vd. [57] yapmış oldukları çalışmada, lökosit hücrelerinin otomatik sınıflandırma işlemi için imgelerin morfolojik özelliklerini kullanarak boyut fonksiyonları kullanmışlardır.

Ramoser vd. [58], otomatik lökosit sınıflandırma işlemi için SVM kullanmışlar. 13 farklı sınıftan oluşan 1166 görüntü kümesinde yapılan değerlendirmede %95 oranında doğru segmentasyon ve %75-99 arasında ise doğru sınıflandırma yapmışlardır.

Piuri ve Scotti [59], önerdikleri sistem için öncelikle kan görüntüsündeki lökositleri diğer kan hücrelerinden ayırır ve ardından morfolojik indeksleri çıkarır.

Sınıflandırma sürecinde ise Nearest Neighbor classifier, Radial Basis function neural networks, feed-forward neural networks algoritmalarını kullanmışlardır.
Theera-Umpon ve Dhompongsa [60], yalnızca lökosit çekirdeğinden elde edilen bilgilerle lökosit sınıfladırmak için yeterli olup olmadığını araştırmışlardır. Deneylerde segmentasyon hatalarını önlemek için hücre çekirdeklerini el yordamıyla çıkarmışlardır. Sınıflandırma için Bayes sınıflandırıcı ve yapay sinir ağlarını kullanmışlar. Elde ettikleri %77'lik sınıflandırma başarısına göre hücre çekirdeğinden alınan bilgilerin yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Adjouadi vd. [61] yaptıkları çalışamada, akış sitometride (flow cytometry) beyaz kan hücrelerinin tip tanımlaması için yöntem önermişlerdir. Elde ettikleri çok boyutlu bir aralıktaki parametrik veri kümelerinin davranışını Destek Vektör Makineleri (SVM) kullanılarak analiz etmişlerdir.

Pergad ve Hamde [62], hastalık tanısı için kemik iliğindeki lökosit hücrelerini Radon ve dalgacık dönüşümü tabanlı diferansiyel sınıflandırma çözümü sunmuşlardır. Dönüşüm temelli özellikleri için iki seviyeli yatay, düşey ve köşegen faktörlerinin ayrışma katsayısı değerlerini kullanmışlardır. Sınıflandırma yöntemi olarak Levenberg-Marguardt (LM) geri yayılım algoritması uygulamışlardır.

Rodrigues vd. [63], beyaz kan hücrelerinin sınıflandırılmasında iki aşamadan oluşan yapay sinir ağı kullanmışlardır. İlk aşamada geri yayılım algoritmasını (BPNN) uygulayarak ön sınıfladırma işlemi, ikinci adımda ise tespit edilen sorunları azaltmak için destek vektör makinesi (SVM) ve Puls-Coupled sinir ağı (PCNN) kullanılarak melez bir model sunmuşlardır. Böylece ortaya çıkan olumsuz yönleri en aza indirmeyi amaçlamışlardır.

Bikhet vd. [64], algoritmayı seçilen özelliklere göre test etmişler ve %90'dan daha yüksek bir doğru sınıflandırma oranı elde etmişlerdir. Seçilen özellikleri; hücrenin alanı, çekirdeğin alanı, sitoplazma alanı, çekirdeğin hücre alanına oranı, sitoplazmanın ortalama rengi, çekirdek alanının çevreye oranı, hücre daireselliği, çekirdek daireselliği ve çekirdek sayısı olarak belirlemişlerdir.

Ravikumar ve Shanmugam [65], beyaz kan hücrelerinin bölümlenmesinde Standard Modified Fuzzy Possibilistic C Means yöntemini, sınıflandırma işlemi için ise Relevance Vector Machine (RVM) isimli yeni bir yöntem sunmuşlardır. Özellik vektörü olarak alan, uzunluk ve çevre bilgileri esas alınmıştır. Elde ettikleri sonuçlarda; mevcut yöntemlere göre %91'lik bir başarı elde etmişlerdir.

Yampri vd. [66], lökosit segmentasyonu ön işlemi olarak, çekirdek ve sitoplazma arasındaki yüksek kontrasttan dolayı yeşil renk bileşenini kullanmaya karar vermişlerdir. Daha sonra otomatik eşikleme kullanılarak çekirdek ayrılmıştır. Parçalı görüntüde kalan gürültüleri gidermek için erozyon ve genişleme olan temel morfolojik metotları kullanmışlardır. Daha fazla öznitelik çıkarımı için uyarlamalı kontur (Adaptive Contour) kullanarak segmente etmişlerdir. Lökosit sınıflandırma yöntemi olarak Eigen Cell yönteminden faydalanmışlardır.

Joshi vd. [67], kan hücrelerini bölütlemede Otsu'nun otomatik eşikleme algoritmasını ve lökosit bölümlemesi için görüntü zenginleştirme ve aritmetik yöntemini önermişlerdir. Normal lenfosit hücrelerinden gelen blast hücreleri sınıflandırmak için k-NN sınıflandırıcısı kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre %93 doğruluk oranı elde etmişlerdir.

Theerapattanakul vd. [68], lökosit segmentasyonu için aktif kontur (Active Contour) şeması önermişlerdir.

Tantikitti vd. [69], yaptıkları çalışmada, renk transformasyonu, görüntü parçalama, kenar algılama özelliği çıkarımı ve beyaz kan hücreleri sınıflaması gibi görüntü işleme tekniklerini kullanmışlardır. Karar ağacı yöntemi ile hastaların dang (dengue) virüsü enfeksiyonlarını sınıflandırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, 167 hücre görüntüsünün lökosit sınıflandırmada %92,2, 264 kan hücresi görüntüsünün dang sınıflandırmada %72,3 doğrulukta başarı gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rawat vd. [13], yaptıkları araştırmada şu sonuca varmışlardır; sınıflandırma sistemi genellikle lökosit kan görüntülerinin dokusu, renkleri, geometrisi ve istatistiksel özelliklerini kullanarak ve bunlarda incelenen değişikliklerle oluşturulmuştur.

Mircic ve Jorgovanovic [70,71], yaptıkları çalışmada, sinir ağları ve temel görüntü işleme yöntemlerini kullanarak, lökositlerin otomatik olarak sınıflandırılması için yeni bir yöntem önermişlerdir. Yapay sinir ağı olarak, 19 girdi nöronu, 5 çıktı nöronu ve 120 ve 70 nöronlu iki gizli katmanı olan ileri beslemeli bir perceptron kullanmışlardır. Test sonuçlarında, lökosit bölütlemede yüksek duyarlılığının yanı sıra %86'lık sınıflandırma doğruluk oranını göstermiştir.

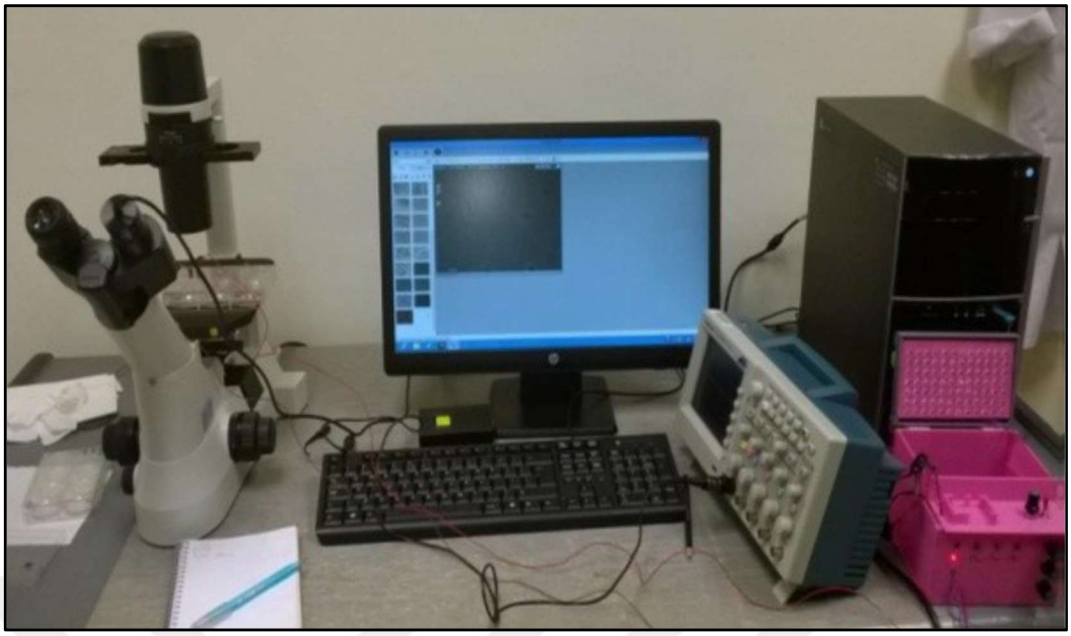
Theera-Umpon [72] yapmış olduğu çalışmada, kemik iliği beyaz kan hücrelerinin çekirdeğini ve sitoplazmasını segemnte eden bir teknik önermiştir. Hücreleri fazla parçalara ayırmak için Fuzzy C-Means (FCM) kullanmıştır. Otomatik segmentasyon tekniğinin çıktılarını, beş katlı çarpraz doğrulama ile sinir ağları kullanarak hücre sınıflandırma problemine uygulamıştır. Hücrenin alanına, çekirdeğinin şekline ve boyutuna göre her görüntüden dört özellik çıkartmıştır.

Saraswat ve Arya [73], 40X büyütmeyle elde edilen kan yayma görüntülerinden lökosit hücrelerini, mono-nükleer ve polimorfo-nükleer hücreler olarak sınıflandırmak için Random Forests yöntemini kullanmışlardır.

1.1.3. Motorize Mikroskop Sistemleri

Lökosit diferansiyel sayımını otomatikleştirmeye yönelik girişimler 1960'lı yıllarda bilgisayar tabanlı algoritmalar kullanılarak yapılan görüntü analizi ile başlamıştır [74,75]. Morfolojik analiz yapabilen otomatik mikroskop sistemleri, manuel diferansiyel sayımı yerini almak için cazip bir çözüm olarak görülmektedir [76]. Günümüzde motorize mikroskop sistemleri, mikroskopinin farklı alanlarında rutin olarak kullanılan araçlardır. Ancak yüksek maliyeti nedeniyle (35000 ile 70000 ABD Doları arasında) gelişmekte olan ülkeler için temin edilmesi zor olmaktadır [79].

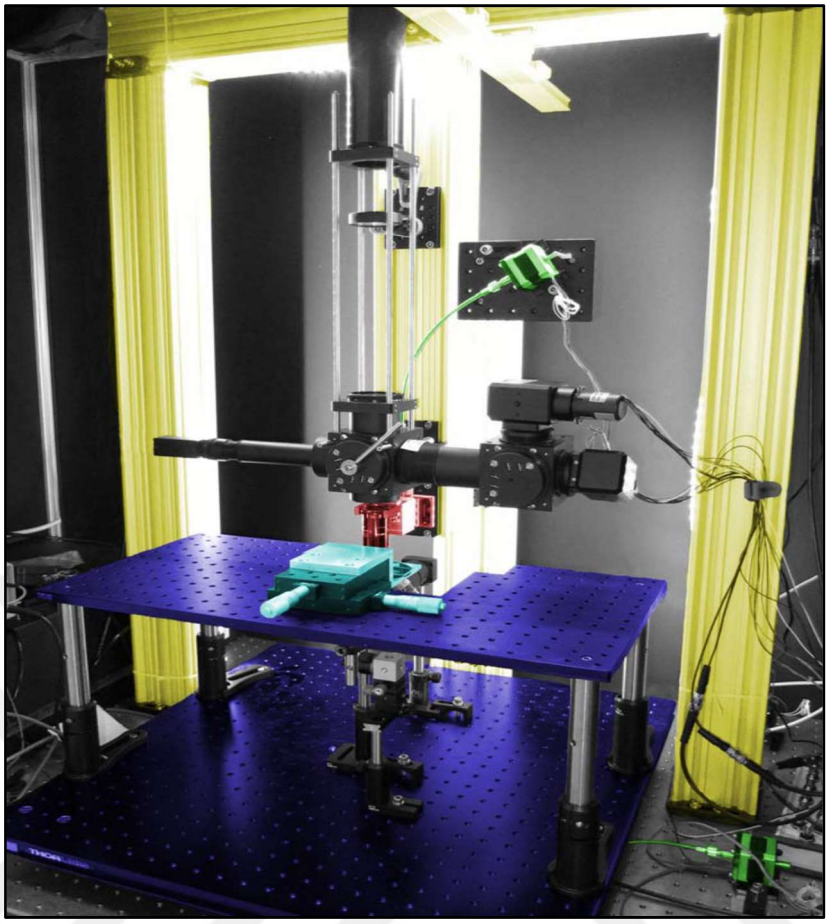
Tomari vd. [15], kan yayma görüntülerinden Eritrosit bulma ve tanıma sürecini otomatikleştirmek için bilgisayar destekli bir motorize ışık mikroskobu sistemi (40X'lik DinoEye mercekli kamera ile) geliştirmişlerdir. Şekil 1.2'de geliştirilen mikroskobi sistemi gösterilmektedir.



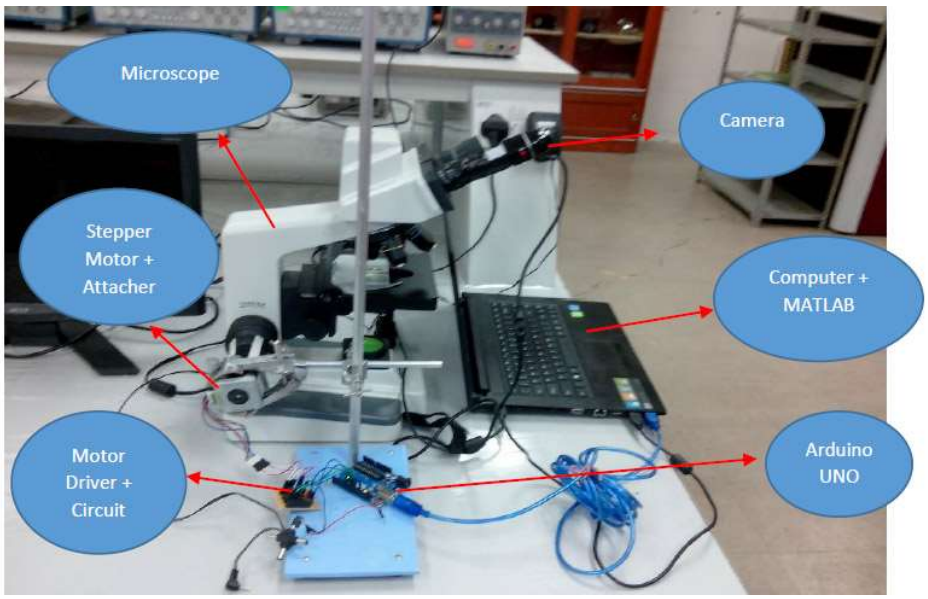
Şekil 1.2. Tomari ve arkadaşlarının geliştirdiği mikroskobi sistemi.

Campbell vd. [77], ışık mikroskobu kullanarak birer metrelik hareket kabiliyeti olan ve üç eksende hareket edebilen bir sistem tasarlamışlardır. Hareketli parça kontrolü için step motor kullanmışlardır. Bilgisayar haberleşme arabirimi olarak seri port ve kullanıcı arayüzü tasarımında ise Matlab ile Phyton kullanmışlardır. Kontrol devreleri ve motorizasyon sisteminin donanım maliyeti 1.000$'ın altında olduğunu ifade etmişlerdir. Şekil 1.3'te geliştirdikleri motorize mikroskop sistemi gösterilmektedir.

Amirunidzam [78] yaptığı çalışmada, otomatik odaklama yapabilen bir motorize mikroskop sistemi tasarlamıştır. Çalışmada tercih ettikleri "B1 Advanced Series" ışık mikroskobu ve sistemin kontrolü için Arduino UNO geliştirme kartı kullanılmıştır. Motor olarak Tek kutuplu (Unipolar) Step Motor (Minibea MO-STEP-17PM-J3X) tercih edilmiştir. Kamera olarak ise "Veho VMS-001" 3-mega piksel ve 200X büyütme yapabilen bir cihaz kullanılmıştır. Şekil 1.4'te Amirunidzam tarafından geliştirilen motorize mikroskop sistemi gösterilmektedir.

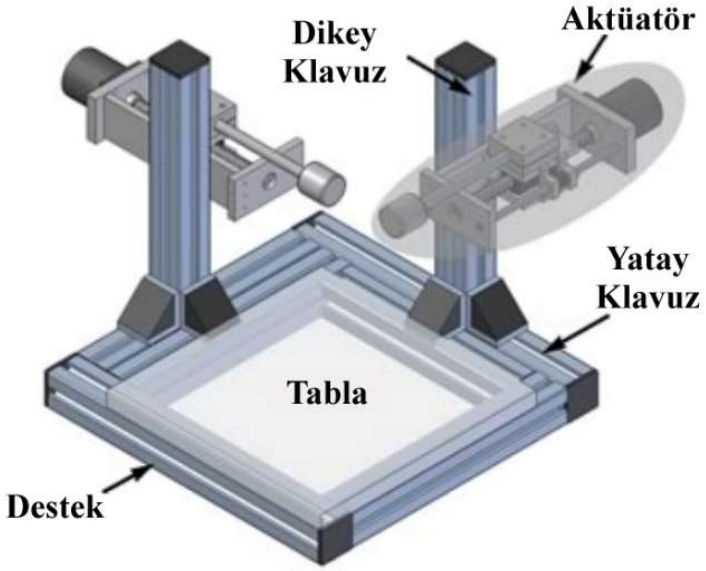


Şekil 1.3. Campbell ve arkadaşlarının geliştirdiği motorize mikroskop.



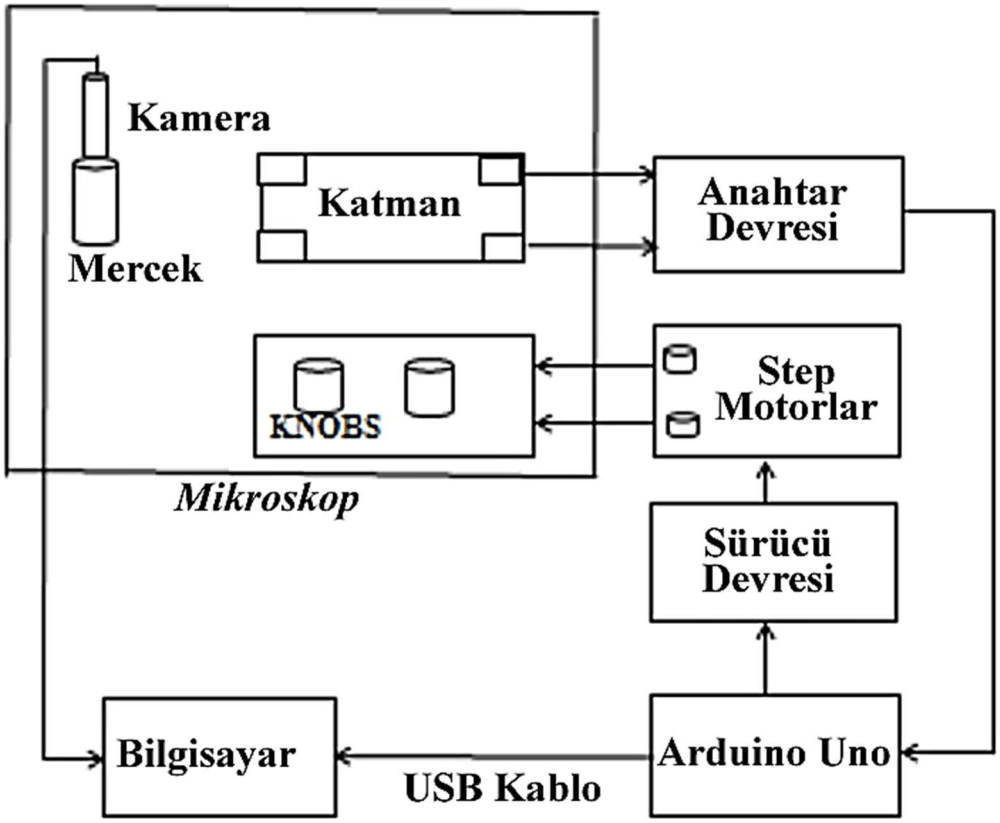
Şekil 1.4. Amirunidzam'ın geliştirdiği motorize mikroskop sistemi.

Vargas ve Romero [79], modüler yapıya sahip ve düşük maliyetli bir motorize mikroskop sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen mekatronik sistem, bir destek yapısı ve iki mekanik aktüatörden (X ve Y ekseni) oluşmaktadır. Bu aktüatörler 200 adımlı bir step motor tarafından tahriklenir. Aktüatörlerin uç kısımlarında, mikroskop bağlantısı yapabilmek için elektromıknatıs mekanizması bulunmaktadır. Herhangi bir mikroskop bağlandıktan sonra, mekanik aktüatörler standart bir 20 mm bristol vida ile dikey kılavuzlara sabitlenmektedir. Şekil 1.5'te geliştirdikleri motorize mikroskop sistemi gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Varga ve Romero'nun geliştirdiği motorize mikroskop sistemi.

Mohan ve Otto [80], bir ışık mikroskobunu motorize ederek, X ve Y eksenlerini step motor vasıtasıyla kontrol etmişlerdir. Ancak systemin dikey yönlü hareketi (Z-ekseni) el yordamıyla (manuel) kontrol edilmektedir. Şekil 1.6'da geliştirdikleri sistemin blok diyagramı gösterilmektedir.

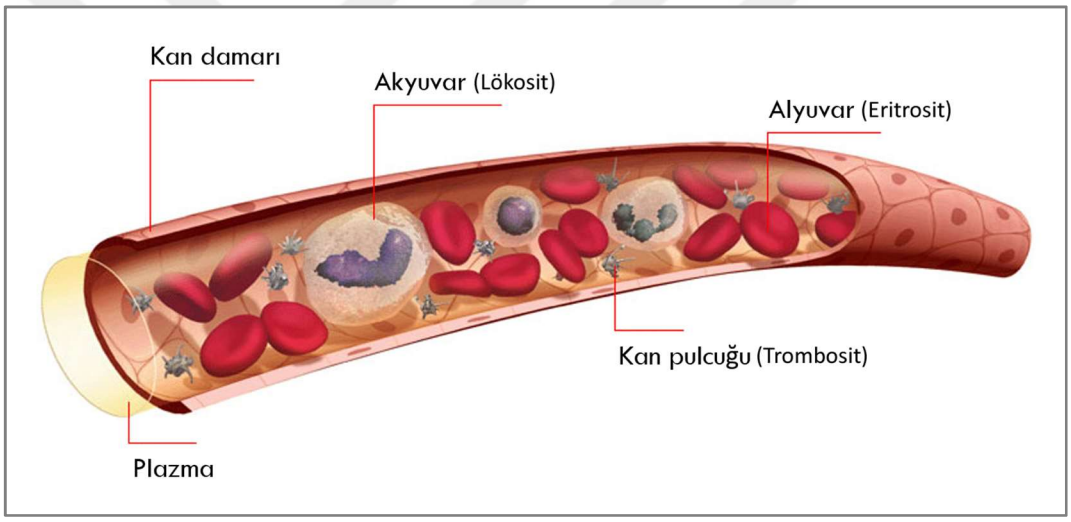


Şekil 1.6. Mohan ve Otto'nun geliştirdiği sistemin blok diyagramı.

BÖLÜM 2

KAN DOKU HİSTOLOJİSİ

Kan, kan hücreleri (şekilli elemanlar) ile bu hücrelerin içerisinde yüzdüğü plazma adı verilen sıvı olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır [6,81-83]. Kan hücreleri; akyuvarlar (lökositler), alyuvarlar (eritrositler) ve kan pulcukları (trombositler)'dır. Şekil 2.1'de kan damarı ve kanın bileşenleri gösterilmektedir.

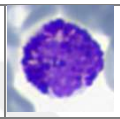
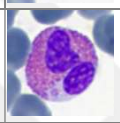
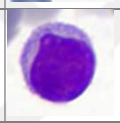
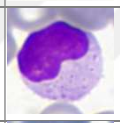
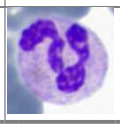


Şekil 2.1. Kanın bileşenleri.

Kan, dolaşım sistemi dışına çıktığında pıhtılaşır ve şekilli elemanları içerir. Sarı renkli şeffaf bir sıvı pıhtıdan ayrılır. Bu sıvıya serum denir. Kan, dolaşım sistemi dışına çıktığında pıhtılaşmasını önleyici maddeler (heparin, sitrat vb.) eklendikten sonra santrifüj edildiğinde tabakalaşma gösterir. Bu özellik kanın heterojen özelliğinden gelir. Her bir birim hacimdeki kan içerisindeki kümelenmiş eritrositlerin hacim değerine hematokrit denir. Tüm kan santrifüj edildiğinde, hematokrit tüpünün üstünde kalan şeffaf, sarımsı renkte ve hafifçe kıvamlı sıvıya plazma denir. Tüpün altında biriken kan hücreleri iki farklı tabaka oluşturur. Tüpün en dip kısmında yerleşen hücreler kanın yaklaşık %45'ini oluşturur.

Bu tabakada eritrositler bulunduğundan kırmızı renklidir. Bu tabakanın üstünde oluşan ikinci tabaka çok ince olup tüpteki kanın %1 ini oluşturur. İkinci tabakada ise, lökositler bulunur. Akyuvar tabakasının üstünde görülmeyecek kadar ince üçüncü tabaka bulunur. Bu tabakada trombositler yer alır. Kanın bu şekilde tabakalaşma göstermesi farklı yapılar içermesinden kaynaklanır. Çizelge 2.1'de kanın şekilli elemanlarının [84] detaylı bir listesi verilmiştir.

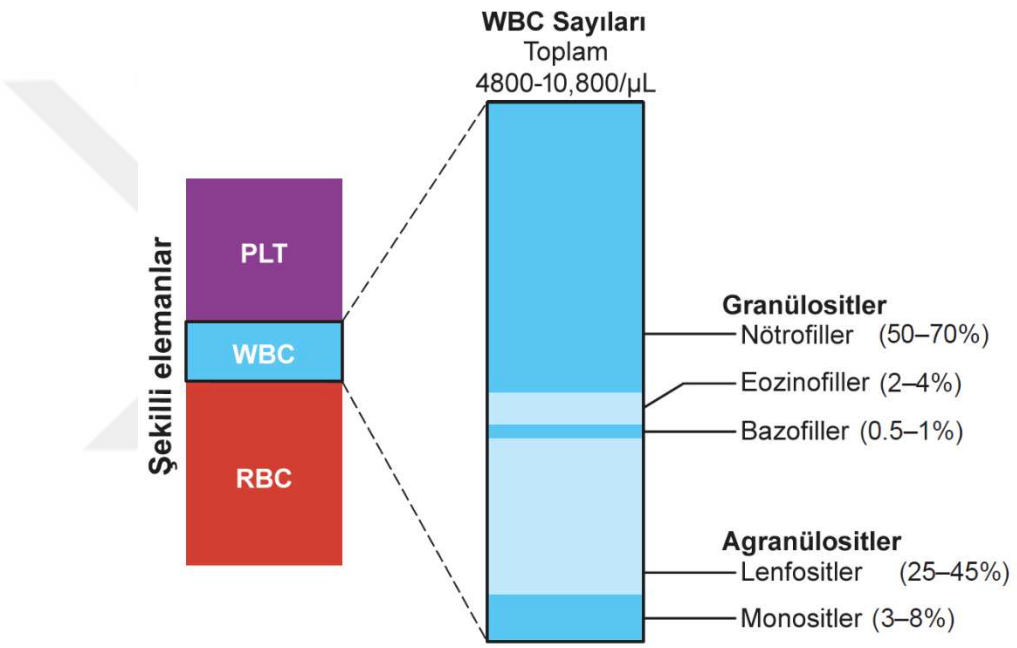
Çizelge 2.1. Kanın şekilli elemanlarının özeti.

Hücre Tipi	İmge	Çap (µm)	Miktar (µL'de)	Nükleus	Sitoplazma	Granüller
Bazofil		10-14	0.5-1% / WBC, 20-50	İki veya üç loblu	Soluk mavi	Büyük morumsu-siyah sitoplazmik
Eozinofil		10-14	2-4% / WBC 100-400	İki loblu	Granüller dolu	Turuncu-kırmızı
Lenfosit		5-17	25-40% / WBC 1500-3000	Küresel veya girintili	Berrak, Soluk mavi	-
Monosit		14-24	3-8% / WBC 100-700	U veya fasulye şeklinde	Gri-mavi	Kızılımsı (azurofil)
Nötrofil		10-12	50-70% / WBC 3000-7000	3-5 parçalı veya loblu	Soluk mavi-pembe	Göze çarpmayan sitoplazmik
Eritrosit		7-8	4-6 milyon	Bikonkav, anükleat disk; somon renkli		
Trombosit		2-4	150-450 bin	Granüller içeren stoplazmik parçalar, koyu mor lekeli		

2.1. LÖKOSTİLER

Lökosit ya da akyuvar olarak da adlandırılan beyaz kan hücresi, kemik iliğinde üretilir. Lökosit hücreleri çekirdek ve sitoplazmadan oluşur. Sitoplazma, protein sentezi ve diğer hücresel işlevlerin bulunduğu yerdir. Çekirdek, genetik mesajları taşıyan, ağırlıklı olarak deoksiribonükleik asit (DNA) olan kromatin'den oluşur [85]. Vücudu bulaşıcı hastalıklara ve yabancı maddelere karşı koruyan lökositler, bağışıklık dizgesinin önemli bir bölümünü oluştururlar. Sağlıklı bir yetişkin insanın

bir litre kanında $4x10^9$-$11x10^9$ adet, bir başka tanımla, bir damla kanda yaklaşık 7000 ila 25000 arası lökosit bulunur. Bu nicelik lösemi hastalarında 50000'e kadar çıkar. Lökositler kanın dışında lenf sistemi, dalak ve diğer vücut dokularında da bulunur. Lökosit daha büyük ama sayıca daha az olan hücrelerdir. Sitoplazmik spesifik granül varlığına bağlı olarak, Granülositler ve Agranülositler olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Ayrıca nükleus yapılarına göre de mononükleer ya da polimorfonükleer olarak sınıflandırılır. Şekil 2.2'de normal kandaki lökosit türleri ve göreceli yüzdeleri [84] gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Normal kandaki lökosit türleri ve göreceli yüzdeleri.

Lökositlerde, spesifik ve azürofilik olmak üzere iki tip sitoplazmik granül bulunur. Spesifik granüller, sadece granülositlerde bulunur ve boyanma özelliklerine göre; Nötrofilik, Eosinofilik ve Bazofilik. Azürofilik granüller azür grupları ile kırmızı-mor renkli boyanma gösterirler.

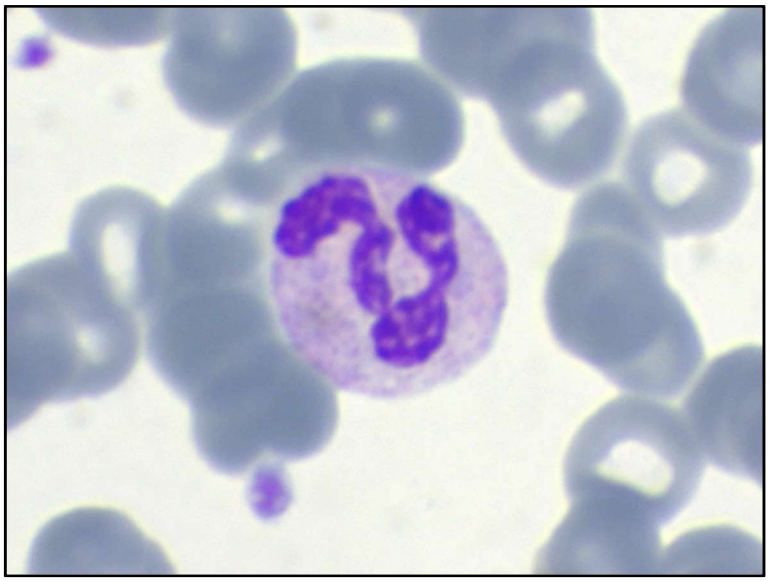
2.1.1. Granülositler

Granülosit, lökositlerin (akyuvarların) bir bölümünü oluşturan çeşitli hücre tiplerine verilen isimdir. Bu ismi almalarının nedeni granülosit hücre tiplerinin sitoplazmalarında bulunan farklı boyama özelliklerine sahip granüllerdir. Bu

hücrelere farklı şekillere sahip, çoğunlukla üç loba ayrılmış biçimdeki, hücre çekirdekleri nedeniyle "polimorfonükleer lökosit" (PMN veya PML) de denir. Segmente nükleusları vardır. Hücre tipine bağlı olarak lob sayısı 2 ile 7 arasında olabilir. Yaygın kullanımda polimorfonükleer lökosit tanımı çoğu kez nötrofil granülositini tanımlamak için kullanılır. Nötrofil granülositi, granülosit tiplerinin içinde en çok bulunanıdır. Granülositlerin; Nötrofil granülositi (Nötrofil), Eozinofil granülositi (Eozinofil) ve Bazofil granülositi (Bazofil) olmak üzere 3 tipi vardır. Granülosit tipleri, granüllerinin farklı boylara gösterdiği afiniteye göre isimlendirilir.

2.1.1.1. Nötrofil

Nötrofil, nötrofil granülosit olarak da bilinen lökosit hücresi olan Granülosittir. Lökositlerin sık bulunan tipidir. İnsan kanında en fazla bulunan lökositlerdir. Çekirdekleri 3-5 lobdan oluşur. Polimorfonükler hücrelerin 99%'unu oluştururken, polimorfonükler hücreler de toplam lökosit sayısının %70 civarında bir kısmını oluştururlar. Sahip olduğu granüller, boyalara özel bir afinite (bağlanma eğilimi) göstermediği için "nötrofil" olarak adlandırılmıştır. Nötrofillerin dışındaki granülositler, eozinofil ve bazofillerdir. Yaşam süreleri çok kısa olan nötrofiller (ortalama olarak bir günden az) kemik iliğinde üretilirler. Şekil 2.3'de bir nötrofil örneği gösterilmektedir.

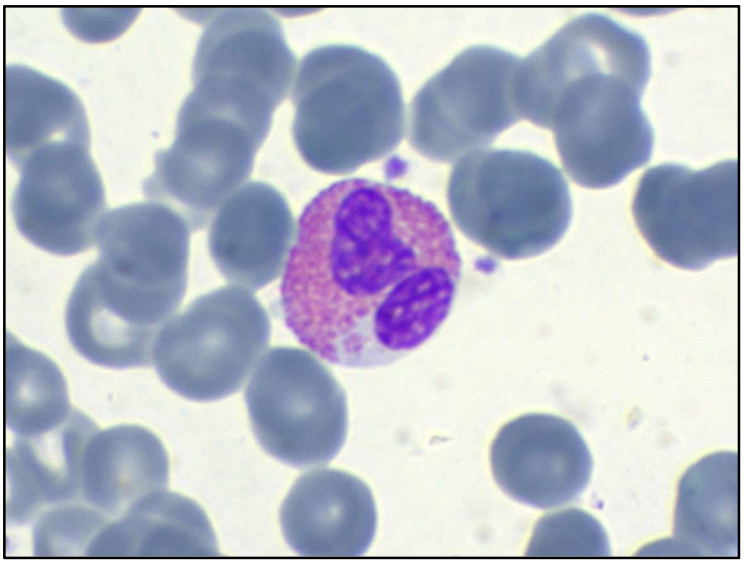


Şekil 2.3. Nötrofil (Neutrophil).

Özellikle organizmayı mikroorganizmaların istilasından korurlar. Bazen küçük partikülleri de fagosite ederler. Bu yüzden büyük partikülleri fagosite eden makrofajlardan ayırmak için mikrofajlar da denir (Pseudopod, fagozom). Ölmüş nötrofiller, bakteriler, yarı yarıya sindirilmiş yapılar iltihaplı bölgede kıvamlı ve sarı renkte "cerahat-irin" birikmesine sebep olur. Nötrofil sayısının azalmasına nötropeni, artmasına ise nötrofili denir. Kalıtsal bozukluklardan (konjenital) olabileceği gibi çeşitli sebeplerden de ortaya çıkabilmektedir. Kemoterapi gibi tedavilerin yan etkisi olarak da oluşabilir. Sistemik bir infeksiyon ya da yangı sonucu kandaki miktarları artar. Genel olarak viral infeksiyonlarda nötrofil sayısı artmaz.

2.1.1.2. Eozinofil

Eozinofil granülosit veya asidofil olarak da adlandırılan bir lökosit hücresidir. Parazitlerce oluşturulan enfeksiyonlarla savaşırlar. Sahip oldukları granüller, "eozin" isimli asidik boyayı tuttuğu için eozinofil olarak adlandırılmışlardır. Ömürleri 1-2 haftadır ve tüm lökositlerin %2-3'ünü oluştururlar. Çapları ortalama 10-12 µm büyüklüğündedirler. Çekirdekleri iki lobludur spesifik granüller Major Basic Protein (MBC) adlı protein içerir. Bu protein granüllerin eozinofilik olmasının başlıca sebebidir. Bu proteinin parazitlere karşı etkili olduğu düşünülmektedir. Şekil 2.4'de bir eozinofil örneği gösterilmektedir.

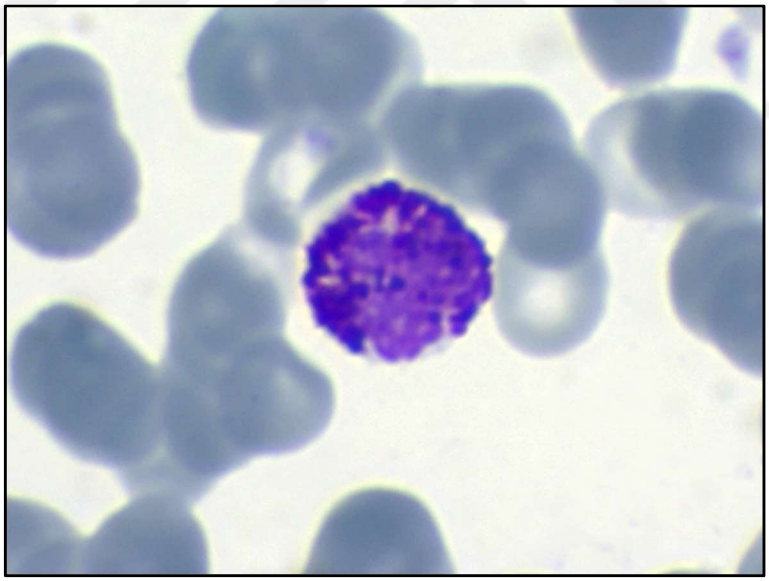


Şekil 2.4. Eozinofil (Eosinophil).

Kandaki değerlerinin sayıca artmasına “Eozinofili” denir. Eozinofili, alerjik reaksiyonlarda ve paraziter enfeksiyonlarda kendini gösterir. Antikor-antijen birliklerini tanır. Parazitik ve alerjik durumlarda sayısı artar. Alerjik hastalıklara duyarlıdır. Bu gibi durumlarda sayıları artar.

2.1.1.3. Bazofil

Bazofil bir tür lökosit hücresi. Bazofilik lökosit olarak da adlandırılırlar. Lökositlerin bir grubu olan granülositlerden olan bazofil, (sitoplazmik) granülleri bazik boyaları tuttuğu için böyle adlandırılmıştır. Çok nadir bulunurlar. Çekirdek düzensizdir ve iyi ayırdedilemeyen iki lobdan oluşur. Lökositlerin içinde en az miktarda bulunan tiptir, kandaki lökositlerin %0,5-3'ünü oluştururlar. Bazofiller damar genişletici (histamin) ve pıhtılaşmayı önleyici (heparin) ihtiva eder. Şekil 2.5’te bir bazofil örneği gösterilmektedir.



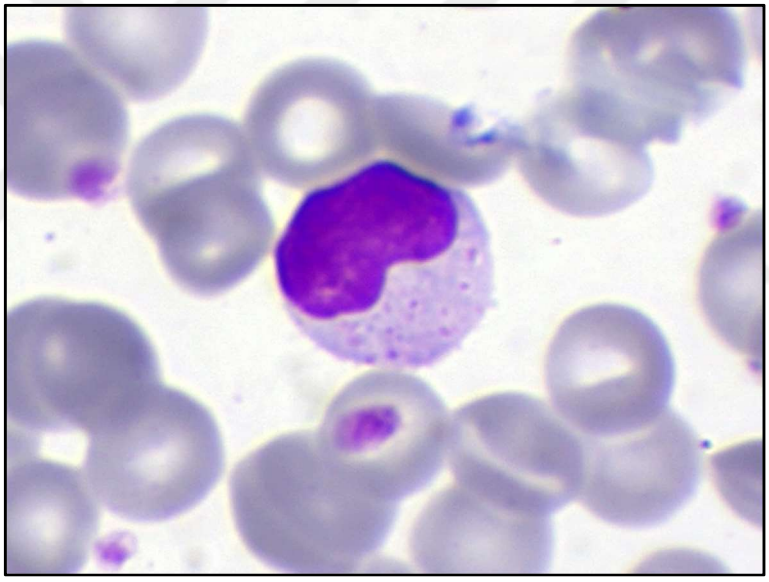
Şekil 2.5. Bazofil (Basophil).

2.1.2. Agranülositler

Beyaz kan hücrelerinin, sitoplazmalarının granül içermemesiyle karakterize alt birimleridir. Monosit ve lenfosit olmak üzere iki çeşittir.

2.1.2.1. Monosit

Monositler çevresel kanın en büyük hücreleridir (15–22 µm). Türlü biçimlerde (yuvarlak, lobüllü, böbrek, fasulye ya da at nalı) olabilen çekirdekte katlanma ya da kıvrımlanmalar görülebilir. Kromatin yapısı oldukça gevşektir. Kromatin iplikçikleri arasında açık kısımların bulunması gevşek bırakılmış bir yün çilesini anımsatır. Soluk mavi ya da kül renginde boyanan sitoplazmada ince azürofil granüller ve vaküoller görülebilir. Özellikle EDTA (Etilen Diamin Tetra-asetik Asit)'lı kandan hazırlanan yaymalarda vaküolleşme daha belirgindir. Kan örneğinin yayılmadan önce bekletilmiş olması vaküolleşmeyi artırır. Şekil 2.6'da bir monosit örneği gösterilmektedir.



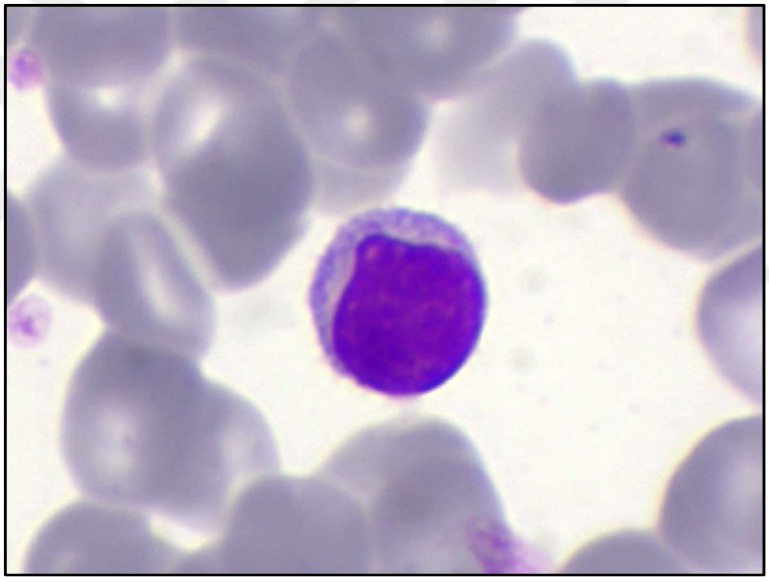
Şekil 2.6. Monosit (Monocyte).

Kemik iliğinden çevresel kana geçen monositler, nötrofil parçalılara göre dolaşımda biraz daha uzun kalırlar. Ardından dokulara geçerek makrofaj'lara dönüşürler. Doku makrofajları organizmaya yaygın bir biçimde dağılmıştır: Akciğerlerde alveol makrofajları, karaciğerde Kupffer hücreleri, kemik iliği, dalak ve lenf düğümlerinde sinüzoidleri döşeyen makrofajlar, plevra, periton ve sinovya gibi seröz zarlarda bulunan makrofajlar, deri, bağdokusu makrofajları, beyindeki mikroglia hücreleri, böbrek mezangium hücreleri gibi. Granülomlarda bulunan çok çekirdekli dev hücreler (örneğin, tüberküloz granülomundaki Langhans hücresi) doku

makrofajlarından türer. Kemik yıkımında görev alan osteoklastlar da monosit-makrofaj kökenlidir. Histiosit makrofaj ile eş anlamda kullanılan eski bir terimdir.

2.1.2.2. Lenfosit

Lenfositlerin en önemli özelliği; eritrosit, granülosit, trombositler gibi birer son (uç) hücre olmamalarıdır. Lenfositler, bölünebilen ve yeni lenfositler verebilen hücrelerdir. İmmünojenik (antijenik) uyarı ile karşılaştıklarında; morfolojik dönüşüm (transformasyon) gösterir, farklılaşır ve çoğalırlar. Dönüşüm sırasında ortaya blast tipinde daha büyük hücreler çıkar (immünoblast). Şekil 2.7'de bir lenfosit örneği gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Lenfosit (Lymphocyte).

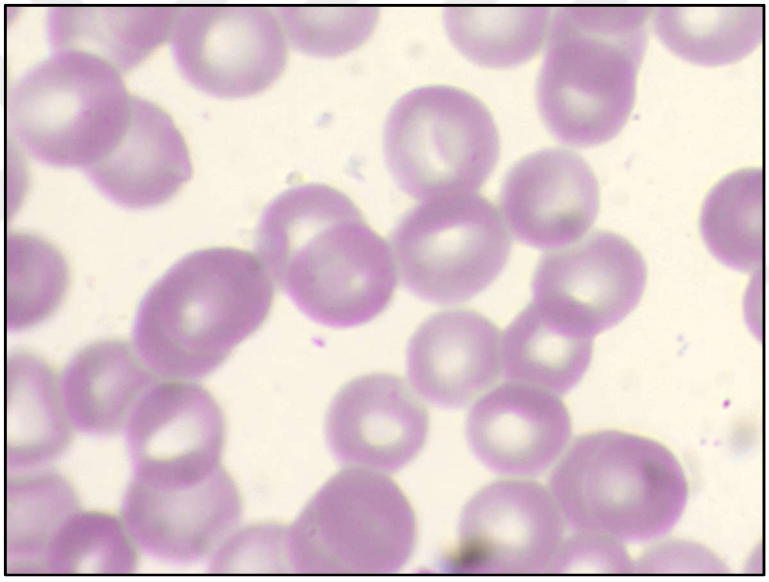
Morfolojik açıdan lenfositler üç gruba ayrılır:

1. Dar sitoplazmalı küçük lenfositler
2. Geniş sitoplazmalı büyük lenfositler
3. Sitoplazmaları granüllü büyük lenfositler.

İşlevsel açıdan farklı olan lenfositleri (B lenfositler, T lenfositler, NK hücreleri) ve bunların alt gruplarını mikroskopta tanımak olanaklı değildir.

2.2. KIRMIZI KAN HÜCRELERİ

Alyuvar, kırmızı kan hücresi veya eritrosit (RBC), kanda en çok sayıda bulunan hücre türüdür ve omurgalı hayvanlarda akciğer veya solungaçlardan vücut dokularına oksijen taşınmasında [1] başlıca araçtır. Alyuvarın tıbbi ismi olan eritrosit sözcüğü Yunanca erythros (kırmızı) ve kytos (oyuk) sözcüklerinden türemiştir. RBC'leri ilk tanımlayan kişi 1658 yılında Hollandalı bir biyolog Jan Swammerdam olmuştur ve 1674 yılında Anton van Leeuwenhoek, eritrositleri daha ayrıntılı olarak açıklamıştır. Tipik bir insan alyuvarının çapı 6-8 µm ve kalınlığı 2 µm'dir. Eritrositler kemik iliğinde olgunlaşır ve ortalama ömürleri yaklaşık 120 gündür.Şekil 2.8'de eritrosit örneği verilmektedir.



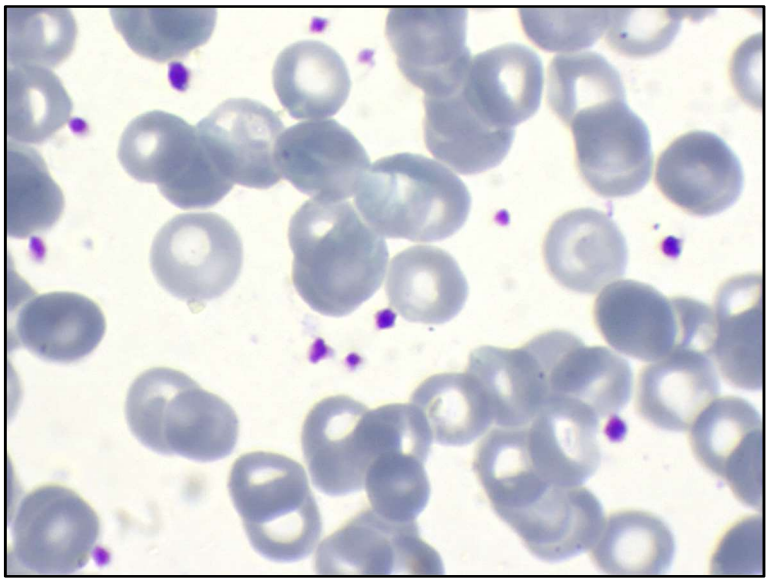
Şekil 2.8. Eritrosit.

Hayatlarının sonuna geldiğinde, dalak tarafından tutulurlar ve burada makrofajlar tarafından fagositlenirler. Alyuvarları olan çoğu canlıda oksijen taşımakta kullanılan molekül hemoglobin iken yumuşakçalar gibi bazı canlılarda bakır içeren hemosiyanin bulunur. Hemoglobin yapısı 1959'da Dr. Max Perutz tarafından X-ışını kristalografisi ile keşfedilmiştir. Tek bir insan alyuvarı yaklaşık 270 milyon hemoglobin molekülü ve her bir hemoglobin molekülü ise dört "hem" grubu içerir. Oksijeni bağlayan ise hem grubudur: her hem grubu bir oksijen molekülü bağlar, yani her hemoglobin molekülü dört adet oksijen molekülü bağlayabilir. Dört tane

oksijen molekülü bağlayan hemoglobin bütünüyle doymuş ve oksihemoglobin olarak adlandırılır. Oksihemoglobin parlak kırmızı renktedir. Oksihemoglobin bağladığı dört oksijen molekülünden bir veya daha fazlasını yitirirse, deoksihemoglobin olarak adlandırılır ve koyu kırmızı renktedir. Toplardamarlardaki kanda (venöz kan) daha çok deoksihemoglobin bulunur. Bu nedenle toplardamarlardaki kan, atardamarlardaki kandan (arteryel kan) daha koyu renktedir.

2.3. TROMBOSİTLER

Trombosit veya kan pulcukları (PLT) kan pıhtılarının oluşumunda görev alan hücre parçalarına verilen isimdir. Platelet olarak da adlandırılır. Düşük trombosit seviyeleri veya fonksiyon anormallikleri (disfonksiyon) kanamayı yatkınlaştırırken, yüksek trombosit seviyeleri çoğunlukla asemptomatik- tromboz (damarda kanın pıhtılaşması) riskini yükseltir. Nukleusları yoktur. 2-4 µm çapında, disk biçimli partiküllerdir. Periferik kanda mm^3'te 150 000 – 400 000 arasında trombosit bulunur. Trombositler, megakaryositlerden köken alırlar. Şekil 2.9'da trombosit örneği gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Trombosit.

Kanın pıhtılaşmasını uyarıp, kan damarlarındaki çatlakların onarılmasını sağlar ve kanın damar dışına çıkışını engellerler. Dolaşımda 14 günden az yaşarlar. Kan

pulcukları, çok sayıda granül ihtiva eden renksiz hücre parçalarıdır. Çapları 1,5-3,0 µm arasında değişir. İnsanlarda eritrositler gibi, anükleer (çekirdeksiz) ve disk şeklindedirler (diskoid). Hücre zarının sitoplazma içine doğru parmak şeklinde girmesi sonucu oluşan ve yüzeye açılan bir kanal sistemine sahiptirler. Bu kanal sistemine kanaliküler sistem adı verilir. Ayrıca RNA ve birkaç farklı granül tipi içerirler. Trombositler oldukça küçük olduklarından sub tipleme ışık miktoskobi ile yapılması oldukça zordur. Bu nedenle bu çalışmada tek tip olarak alınmıştır.

2.3.1. Trombosit Granülleri

Granülomerde alfa, delta ve lambda granülleri; glikojen, az miktarda mitokondri ve peroksizomlar yer alır. Granülomerde ayrıca glikojeni katabolize ederek oksijen ve ATP oluşturan enzimler de bulunur.

2.3.1.1. Lambda Granülleri

Kan pulcukları lizozomları olarakta bilinir. Lizozomal enzimleri içerir. Bunlar, pıhtı rezorbsiyonunu sağlayan enzimlerdir. Asit hidrolazlar içeren, 175-200 nm çapındaki granüller.

2.3.1.2. Delta Granülleri

ADP, ATP, kalsiyum iyonları, pirofosfat ve serotonin (plazmadaki serotonini alarak depolarlar) içeren, 250-300 nm çapındaki granüller.

2.3.1.3. Alfa Granülleri

Fibrinojen, faktör V, vitronektin, trombospondin ve von Willebrand faktörü içeren, en çok rastlanan 300-500 nm çapındaki granüller.

2.4. NORMAL KAN DEĞERLERİ

Tam kan sayımı sonuç belgelerinde kan değerlerinin düşük veya yüksek diye belirtilmesi erişkin değerlere göredir, çocuklarda eritrosit ve lökosit değerleri yaşla ve cinsiyetle değişkenlik gösterdiğinden hekim tarafından ayrıca değerlendirilmesi gerekmektedir [86,87]. Trombosit değerleri ise yaşla fazla değişkenlik göstermeyip 150-400 bin/mm^3 aralığındadır [88]. Çizelge 2.2'de yaş gruplarına göre normal kan değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. Normal kan değerleri.

	Yetişkin		7-12 Yaş		0-6 Yaş		Yeni Doğan	
	Alt	Üst	Alt	Üst	Alt	Üst	Alt	Üst
RBC (10^6/mm^3)	4.0	6.2	–	–	–	–	–	–
MCV (µm^3)	80	100	75	95	75	87	98	118
PLT (10^3/mm^3)	150	400	150	400	150	400	150	400
MPV (µm^3)	6	10	–	–	–	–	–	–
WBC (10^3/mm^3)	4.0	11.0	4.5	13.5	6.0	15.0	5.0	20.0
Nötrofil (%)	50	80	55	–	45	–	40	–
Lenfosit (%)	25	50	38	–	48	–	48	–
Monosit (%)	2.0	10	5	–	5	–	9	–
Eozinofil (%)	0.0	5.0	2	–	2	–	3	–
Bazofil (%)	0.0	2.0	–	–	–	–	–	–

MCV: Vücuttaki kırmızı kan hücrelerinin ortalama hacmi, femtoliterlerde (litrenin dörtte birinde) ölçülür. Hücre sayma makineleri MCV'yi bir kan örneğinden hesaplar. Laboratuvarlar arasında normal değer değişebilir, ancak genellikle 80 ila 96 femtolitre arasında değişebilir.

MPV: Ortalama trombosit hacmi anlamına gelen İngilizce kelimelerin (Mean Platelet Volume) baş harflerinden oluşturulmuş bir kısaltma ile isimlendirilen bir parametredir. Kan örneğinde bir trombositin ortalama büyüklüğü hakkında bilgi verir. Yetişkinlerde 7,4-10,4 femtolitre (fL) arasında bulunan MPV, farklı laboratuvar ve cihazlarda değişik referans aralığa sahip olabilir. Bu yüzden, tahlilin yapıldığı laboratuvarın normal referans aralığının bilinmesi önemlidir.

BÖLÜM 3

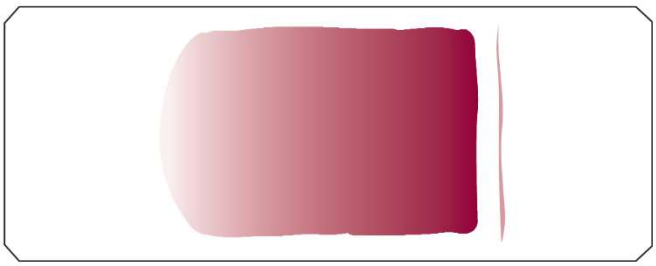
PERİFERİK KAN YAYMA

Periferik kan yayma, dünyada en yaygın ve sıkça kullanılan klinik test yöntemlerinden birisidir. Bu yöntem, 1800'li yılların sonlarında klinik bir tanı aracı olarak kullanıma sunulmasından bu yana az sayıda değişiklik yaşanmıştır [76]. Antonie van Leeuwenhoek, onyedinci yüzyılda kan hücrelerini tanımlayan ilk kişi olmuştur. İlk zamanlarda kan örneği gözlemleri için kan yayma preparatları henüz keşfedilmediğinden dolayı tüm kan yayılarak inceleniyordu. Periferik kan mikroskopisini sağlayan ikinci teknolojik yenilik, XIX. yüzyılın ikinci yarısında anilin (aniline) boyalarının uygulanmasıydı. Bu yöntem, az miktarda kan örneği yerleştirildikten ve cam slaytlara bulaştırıldıktan sonra, kurutulmuş, sabitlenmiş ve daha sonra boyanarak, bireysel kan hücrelerini ışık mikroskobunda incelemeyi mümkün kılmıştır. Paul Ehrlich, 1856'da kan preparatlarını boyamak için eosin'i kullanırken bunu 1865'te hematoksilen ve metakromatik Romanowsky boyaları izlemiştir [89]. Daha sonraki süreçlerde, boya kalitesinin artırılması, boyama prosedürlerinin iyileştirilmesi, otomatik olarak kan yayma preparatlarının hazırlanması ve boyanması gibi gelişmeler yaşanmıştır. Ancak kan yayma preparatlarının hazırlanması ve analizi ile ilgili temel unsurlar yüzyılı aşkın bir süredir değişmemiştir [76].

3.1. PREPARAT HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Periferik yayma süreci, hastadan alınan kan örneği ile başlar. Antikoagülanlı kanla periferik yayma yapılabilir. Ancak parmak ucundan alınan kanla daha kaliteli bir yayma yapma imkânı vardır [90]. Yayma işleminde lam ve lamel metodu ile yapılır. Kullanılacak olan malzemenin kuru ve temiz olması önemlidir [91].

Ayrıca yayma işlemi esnasında kan örneğinin lam üzerinde mümkün olduğunca homojen olarak dağılabilmesi için kullanılan lamın kenar bölgelerinin kusursuz olması gerekir. Şekil 3.1'de ideal bir kan yayma örneği [92] verilmiştir.

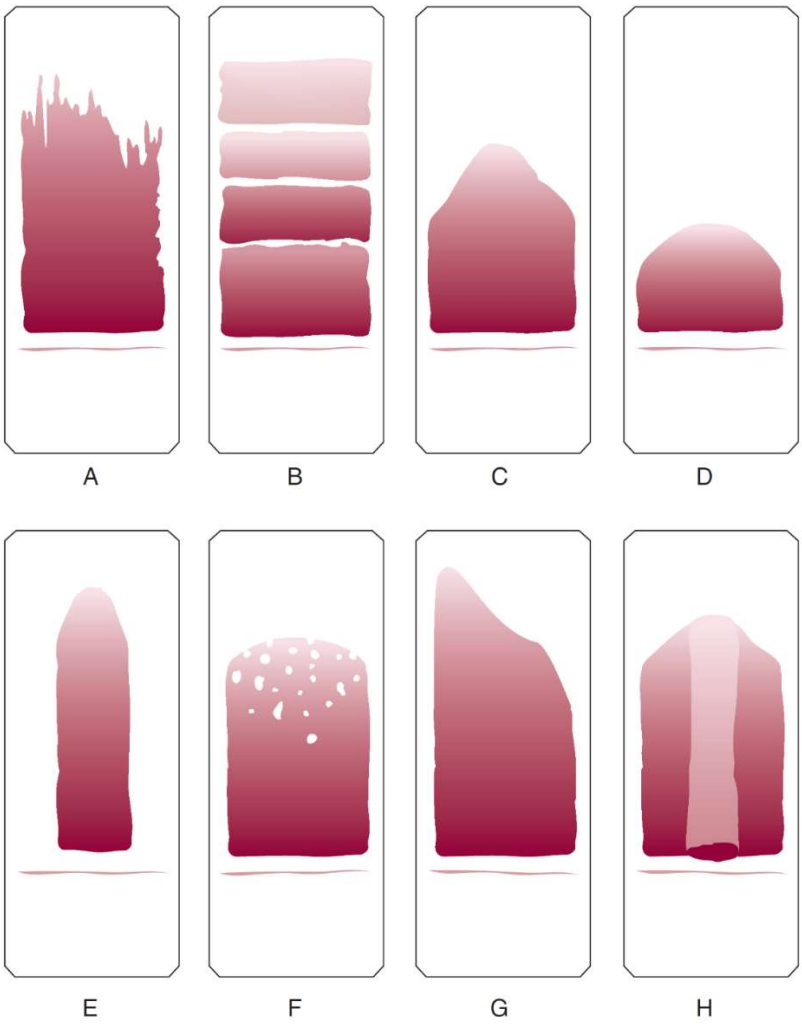


Şekil 3.1. İyi hazırlanmış bir kan yayma örneği [92].

Periferik kan yayma işlemleri otomatik tekniklerle de yapılabilir. Santrifüj metoduyla, serebrospinal sıvı gibi az miktarda hücre ihtiva eden sıvılarla yapılır. Mekanik yayıcılar ise elle yapılan metodun taklididir. Kalitesi elle yapılanlara göre daha düşüktür [90]. Yayma işlemi yapılacak numunenin ideal miktarda alınması önemlidir. Gereğinden fazla miktarda kullanılması durumunda yayma kalın olur ve hücrelerin morfolojik incelenmesini zorlaştırır ya da imkânsız hale getirebilir. Daha az miktarda kullanılması durumunda yayma gereğinden fazla ince olur. Yayma işlemi sırasında kan hücrelerin parçalanmasını (artefakt oluşumu) engellemek için lam üzerinde çok baskı yapılmamalıdır.

Mikroskopi için en iyi alan, kırmızı kan hücrelerinin birbirine zar zor dokunduğu noktadır [89]. Periferik yaymada zaman önemlidir. Zaman gecikmesi nedeniyle kan örneği kurumaya başlar ve hücrelerin dağılımı değişir. Bunun sonucu olarak; büyük lökositler yaymanın kenarında toplanır, eritrositlerde şekil bozukluğu (rulo biçimli vb.) ve trombositlerde kümeleşme görülür. Ayrıca yayma işlemi yapılırken el titretilmemelidir. Titreşim kan hücrelerinin düzgün dağılımını engeller ve sayımda hatalı sonuçlara neden olur.

Hazırlanan kan yaymaları Giemsa veya Wright boyaları ile boyanır. Ancak periferik yayma kurumadan boyama yapılmaması gerekir. Şekil 3.2'de [92] hatalı hazırlanan periferik kan yayma örnekleri verilmiştir.



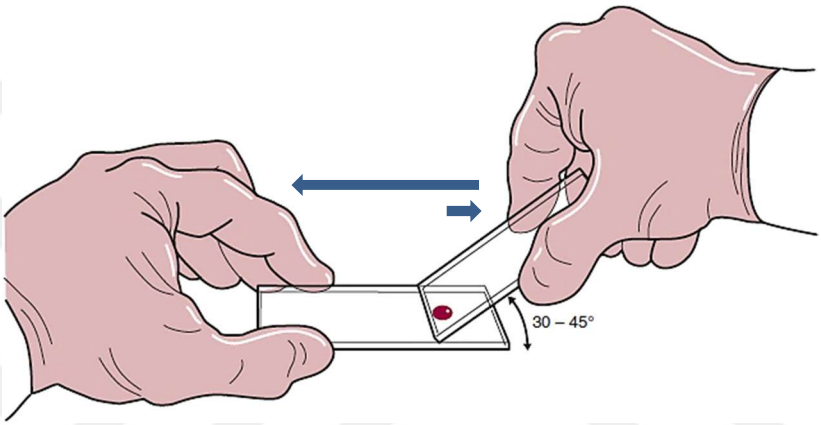
Şekil 3.2. Hatalı hazırlanan periferik kan filmleri; a) yayıcının kenarları kaba ya da yontulmuş, b) yayma slaytının ileri hareketinde çekingenlik, c) yayıcının çok hızlı sürüklenmesi, d) yetersiz kan damlası, e) yeterince geniş yayılmamış kan, f) kirli veya yağlı yüzey, g) yayıcı üzerinde dengesiz basınç uygulanması, h) zaman gecikmesi nedeniyle kan örneğinin kurumaya başlaması.

Herhangi bir klinik örnek üzerinde çalışırken laboratuar güvenlik önlemleri alınmalıdır. Her kan örneği potansiyel olarak yüksek risk altında kabul edilmelidir. Yaygın olarak kullanılan boyalar mikropları yok eden interkatlayıcı ajanlar olmasına rağmen HIV ve HBV'ye karşı koruma sağlamazlar [93].

3.1.1. Kama (Wedge) Tekniği

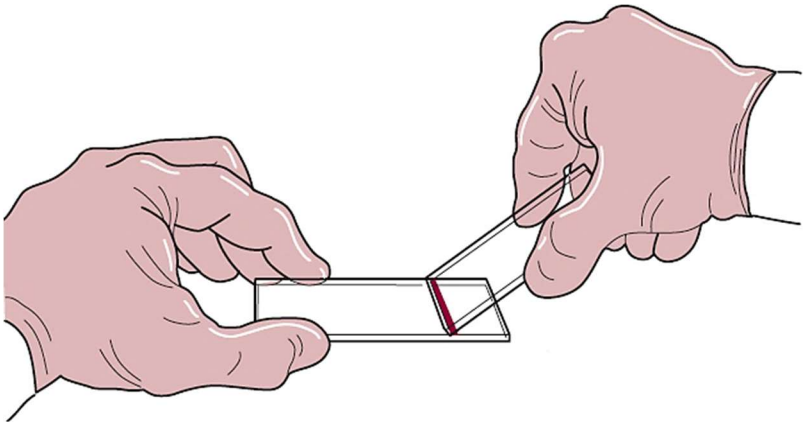
Klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Literatürde baskı (push), kama (wedge) ve kapak kaydırma (cover-slip) olarak farklı isimlerde geçer.

Bu tekniği uygulamak için pipet ve yayıcı (lam) gereklidir [93]. Pipet aracılığıyla alınan kan örneği, lâmın bir ucundan 1 cm kadar içeride olacak şekilde ve göz kararı orta çizgi üzerine konulur. Lâmın yan kenarından kan damlası üstte gelecek şekilde ve damlanın olmadığı köşeden sol el baş parmağı ve işaret parmağı ile tutulur. Ardından yayıcı (diğer lâm veya aynı ölçülerde ucu düz bir cam) 30-45°'lik açıyla (Şekil 3.3) damlanın önüne getirilir ve geriye doğru damlayla temas ettirilerek (sağa bakan ok yönünde), kanın lamın uç kısmına dağılması sağlanır [92]. Daha sonra elin düzgün ve hızlı hareketiyle ileriye doğru (sola bakan ok yönünde) sürülür.



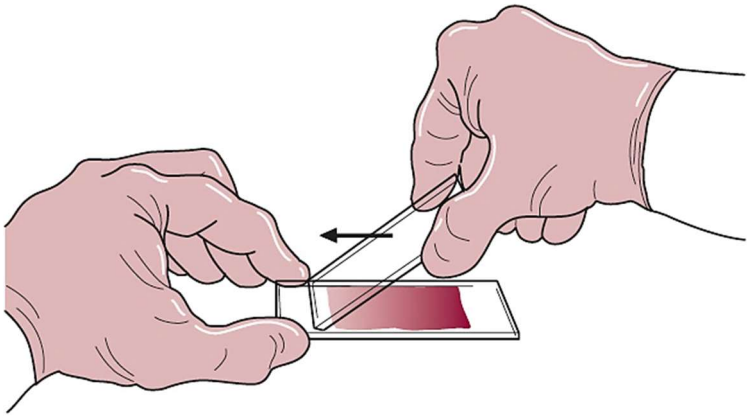
Şekil 3.3. Yayıcıyı doğru bir açıya ayarlama.

Kan damlası sonuna kadar yayılmadan yayıcı yukarıya kaldırılmamalıdır (
Şekil 3.4) [92]. Yaymanın uç kısmı düz olmayıp ince uzun tüylü görünümdedir. Kan damlasının büyüklüğüne, 30°'lik açının azalıp çoğalmasına göre yaymanın kalınlığı değişir.



Şekil 3.4. Kan yayma genişliğinin ayarlanması.

İdeal bir yayma yaklaşık 3 cm uzunluğunda olmalı ve lamın diğer ucuna 1 cm kala sonlanmalıdır [91]. Şekil 3.5'de kan örneğinin yayılması gösterilmektedir.



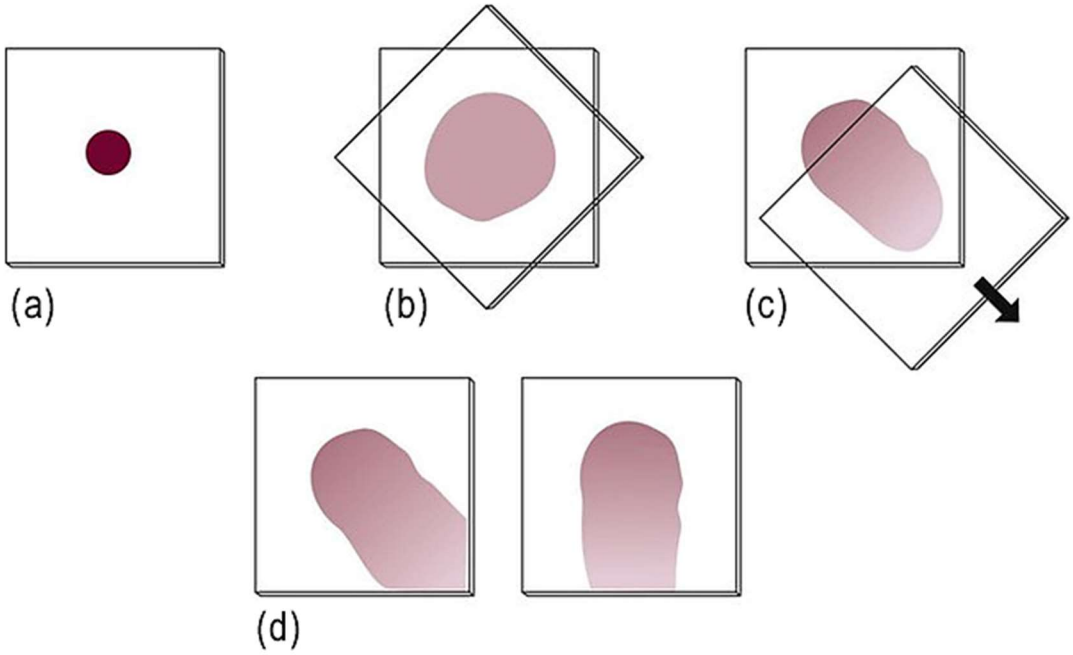
Şekil 3.5. Kanın yayılması.

3.1.2. Kaydırma Tekniği

Kaydırma tekniği, periferik kan yaymada nadiren kullanılan eski bir yöntemdir. Ancak yinede bazı kemik iliği aspirat yayma işlemlerinde kullanılmaktadır [92]. Bu yöntemin tek avantajı, diferansiyel sayımların daha doğru bilerlenmesine imkân tanıyan mükemmel bir lökosit dağılımı sağlar.

Bu tekniğin uygulanması şu şekildedir; Lâmel (22x22 mm) üzerine bir damla kan konulur. Kapiller kan kullanılacaksa cilde temas ettirmemeye dikkat edilir. Sağ elle ikinci bir lâmel alınır, işaret ve başparmağı ile köşelerinden tutulur. İkinci lâmel, kan damlasının üzerine gelecek şekilde lâmelin üzerine çapraz (sekiz köşe olacak şekilde) konur ve kanın, iki lamel arasında yayılması sağlanır.

İki lâmel baskı yapmadan ve pıhtılaşma olmadan birbiri üzerinden kaydırılarak çekilir ve birbirinden ayrılır. Lâmeller, yayma yapılan tarafları yukarıya gelecek şekilde temiz bir kâğıt üzerine konur ve kurumaya bırakılır. Şekil 3.6'da kaydırma tekniğinin işlem basamları [92] gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Kaydırma tekniğinin işlem adımları; a) kan örneğinin lamel üzerine konulması, b) çapraz birleştirme işlemi, c) kaydırma işlemi, d) kurutulmaya hazır olan preparatlar.

3.2. BOYAMA YÖNTEMLERİ

Periferik kan ve kemik iliği yayma preparatları Wright veya Giemsa boyaları ile boyanır. Her iki boyada Romanowsky işleminin modifikasyonudur. Romanowsky boyaları, bazik (metilen mavisi ya da azür B) ve asidik (eozin Y) olmak üzere başlıca iki bileşene dayanır.

Hem eosin hem de metilen mavisi içerdikleri için bunlar polikrom boya olarak kabul edilir [92]. Bu boyalar, hücrenin nükleik asit ve protein gibi asidik komponentleriyle birleşir. Morumsu mavi bir renk meydana getirir. Eozin hücrelerin bazik komponentleriyle birleşir. Kırmızımsı bir renk meydana getirir [90].

Periferik boyama işlemleri basit prosedürler olarak gözüksede formülasyona yeterince bağlı kalınmadığı taktirde mikroskop altında inceleme sürecinde bu durum açıkça göze çarpar. İyi kalitede boyanmamış preparatlar özellikle otomatik kan analizi esnasında daha düşük verimli sonuçlar üretmektedir.

3.2.1. Giemsa Boyama Yöntemi

Kan ve kemik iliği yaymalarının klasik boyası olan Giemsa, vücut sıvılarından ya da dokulardan hazırlanan yaymalarda en başarılı boyalardan biridir. Özellikle lökositlerin, eritrositlerin, trombosit ve parazitlerin nükleus ve sitoplazma morfolojilerini ayırt etmek için kullanılır.

Bir eosin ve metilen mavisi karışımı olan azure B içeriyor olması nedeniyle Giemsa, özellikle kan parazitleri için en güvenilir boyadır [94]. Eosin parazit kromatinini kırmızı; metilen mavisi ise parazit sitoplazmasını maviye boyar. Beyaz kan hücreleri de genel olarak sitoplazmaları mavi ve nükleusları eflatundan siyaha değişen koyu renklerde ayırt edilirler. Eritrositler ise soluk kırmızı-gri görünürler. Dolayısı ile - canlı pembe-kırmızı boyanmış parazit kromatinleri özellikle eritrositlerde küçük noktalanmalar şeklinde (Schüffner granülleri) kolayca ayırt edilebildiklerinden- Plasmodium spp enfeksiyonlarında Giemsa boya ile tanı duyarlılığı en yüksek sonuçlar elde edilir.

Boyama işleminin yapılması aşağıdaki işlem adımları gibidir. Çizelge 3.1'deki formüller kullanılarak [95];

1. Bir boyama şalesine koymak üzere 40 mL Giemsa çalışma solüsyonu (%2,5'luk) hazırlanır. Standart bir şale 40 mL boya alır. Farklı büyüklükte bir şale kullanılacaksa, volüm ve oranlar aynı kalacak şekilde ayarlanmalıdır.
2. İkinci bir şalenin içine de 40 mL tamponlu su konur; 20 µL Triton X100 eklenir (mikroflarya incelemesinde 200 µL Triton X-100 eklenir).
3. Yaymalar Giemsa çalışma solüsyonu içeren şalenin içine konulur ve 45-60 dakika tutulur.
4. Lamlar, daha yüksek yoğunlukta (örn. %10'luk) Giemsa çalışma boyası kullanılarak daha kısa sürede (10 dk) boyanabilir. Ancak daha fazla boya harcanmasına karşın sonuç kalitesi yeterince iyi olmayabilir.
5. İnce yayma lamı şaleden çıkarılır ve tamponlu su içine batırılır; 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkanır. Kalın damla preparatı ise tampon içinde 5 dk. kadar tutulmalıdır. Aşırı yıkama yaymaların fazla renksizleşmesine neden

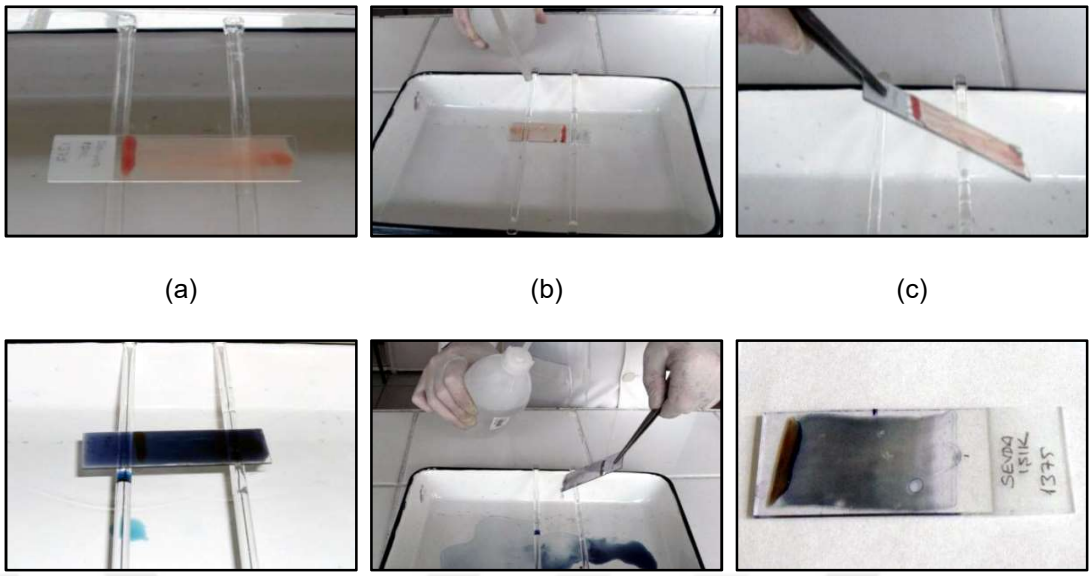
olabilir. Bu sebeple verilen süreler aşılmamalıdır. Eğer ince yayma ve kalın damla aynı lamın üzerinde ise önce ince yayma kısmı tamponlu su içine 3-4 kez batırıp çıkarılarak yıkanır. Sonra lamın sadece kalın damla kısmı tampon solüsyona girecek şekilde şaleye yerleştirilir ve 5 dk. tutulur. Bu işlem sırasında kalın damlanın tamamen tampon içinde olduğundan, ancak ince yaymanın hiçbir parçasının kesinlikle tampon içinde olmadığından emin olunmalıdır.

6. Lamlar düşey pozisyonda dizilir ve havada kurutulur. Eğer ince yayma ve kalın damla aynı lamın üzerinde ise kurutulurken kalın damla kısmı aşağıda tutulmalıdır.
7. Mikroskopta incelenir.

Çizelge 3.1. Giemsa boyasının hazırlanması.

100x Stok Tampon 0.67 M		
Na_2HPO_4	59,24 g	Karıştırılır ve 121°C'de 15 dk. otoklavlanır ya da filtrasyon ile (por çapı 0.2 µm) sterilize edilir.
$Na_2HPO_4 H_2O$	36,38 g	
Deiyonize su	1000 mL	
Çalışma Tamponu (0.0067M, pH 7.2)		
Stok Tampon	10 mL	Kullanmadan önce pH kontrol edilir. pH7.2 olmalıdır.
Deiyonize su	990 mL	
Triton X-100 (%5'lik)		
Deiyonize su (56°C)	95 mL	Deiyonize su önceden ısıtılır ve Triton X-100 yavaşça eklenir; yavaş çevrilerek karıştırılır.
Triton X-100	5 mL	
Giemsa Stok Boya		
Cam boncuklar (3 mm)	30 mL	500 mL'lik bir kahverengi cam şişe alınır; listedeki maddeler veriliş sırasına göre şişeye eklenir. Şişe bir çalkalayıcının üzerine bir açıyla yerleştirilir; orta hızda, en az 14 gün ve günde 30-60 dk. olacak şekilde çalkalanır.
Metanol (saf ve asetonsuz)	270 mL	
Giemsa Toz Boya (sertifiye)	3 g	
Gliserol	140 mL	
Giemsa Çalışma Boyası (%2,5'luk)		
Çalışma tamponu	40 mL	Günlük olarak, testten hemen önce hazırlanır. İdeal olarak, çalışma boyası 1 saat içinde kullanılması gerekir.
Giemsa stok boya	1 mL	
%5 Triton X-100	20 µL	

Şekil 3.7'de Giemsa boyama tekniğinin işlem adımları gösterilmektedir.



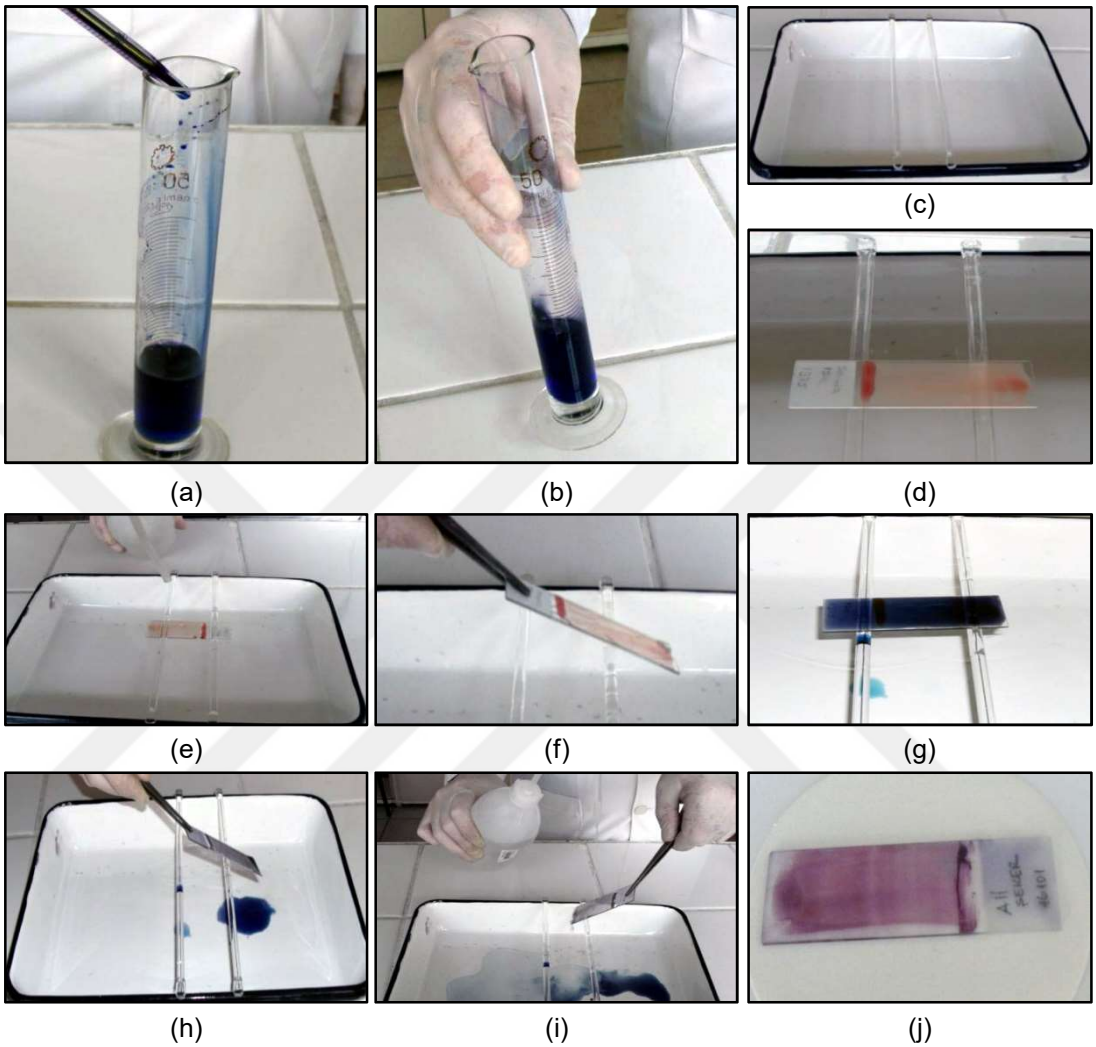
Şekil 3.7. Giemsa boyama tekniğinin aşamaları; a) yayma preparatının boyama sehpasına yerleştirilmesi, b) preparat üzerine metil alkol koyma, c) preparat üzerindeki metil alkolün dökülmesi, d) preparatın boyada bekletilmesi, e) yayma preparatının destile su ile yıkanması, f) preparatın kurumaya bırakılması.

3.2.2. Wright Boyama Yöntemi

Hematolojide kullanılan bir boya olan Wright boyası (Wright-Giemsa) kan parazitleri için yeterince uygun değildir. Wright rutin laboratuvarlarda yaygın, görece kolay hazırlanabilen bir boyadır ve eğer hızlı sonuç elde etmek isteniyorsa kullanılabilir. Ancak Schüffner granülleri bu boya ile gösterilemeyeceğinden dolayı daha sonra mümkün olduğunda Giemsa boyama ile doğrulama yapılmalıdır.

Wright boyası, kullanılmadan önce filtrelenebilir veya doğrudan süzgeçten bir filtre vasıtasıyla şişeden dökülebilir. Preparatı tamamen boyamak önemlidir. Hücreleri cama sabitlemek için boya lamel üzerinde en az birkaç dakika kalmalıdır. Daha sonra yaklaşık olarak eşit miktarda tampon slayda eklenir. Yüzey gerilimi tamponun çok az çalışmasına izin verir. Laboratuvar uzmanı, akıcı tamponu ve alkol lekesini karıştırmak için slayt üzerine hafifçe üfleyebilir. Karıştırma doğruysa, metalik bir parlaklık (veya yeşil "köpük") slaytta görünmelidir. Gerekirse daha fazla tampon eklenebilir. Karışım, slaytta üç dakika [89] veya daha fazla kalmasına izin verilir

(kemik iliği yaymaları, periferik kan filmlerinden daha uzun sürer). Şekil 3.8'de Wright boyama yönteminin işlem adımları gösterilmektedir.



Şekil 3.8. Wright boyama tekniğinin aşamaları; a) destile suya boya ilavesi, b) boya ile destile suyu karıştırma, c) boyama sehpası, d) yayma preparatının boyama sehpasına yerleştirilmesi, e) yayma preparatının tespit edilmesi, f) preparat üzerindeki metil alkolün dökülmesi, g) preparat üzerine boya koyma, h) preparat üzerindeki boyanın dökülmesi, i) preparatın destile su ile yıkanması, j) boyalı preparat.

Zamanlama en iyi boyama özelliklerini üretmek için ayarlanabilir. Boyama tamamlandığında, slayt, nötr pH suyu akışı ile durulanır, slaytın arkası herhangi bir boya kalıntısını temizlemek için yıkanır ve slayt dikey bir konumda bırakılarak hava ile kurutulur. Coverslip tipi kan filmleri manuel yöntemle boyanmalıdır. Bu filmler boşaltılmış test tüpü kauçuk tıpaları üzerine yerleştirilir.

Manuel Wright boyama tekniğinin kullanımı, lösemi hastalarından gelen filmler gibi çok yüksek lökosit sayımı içeren periferik kan filmlerinin boyanması için arzu edilir. Kemik iliği bulgularında olduğu gibi, artan sayıdaki hücrenin gerektirdiği boyayı arttırmak için zaman kolaylıkla uzatılabilir. Manuel tekniğin başlıca dezavantajları boyanın dökülme riskinin artması ve işlemin tamamlanması için daha uzun zaman gerektirmesidir. Bu teknik, düşük hacimli laboratuarlar için en uygun yöntemdir [92].

BÖLÜM 4

GÖRÜNTÜ İŞLEME

4.1. GİRİŞ

Görüntü işleme, ölçülmüş veya kaydedilmiş olan sayısal görüntü verilerini, elektronik ortamda amaca uygun biçimde yapılan çalışmaların genel adı olarak söylenebilir. Görüntü işleme temel olarak şu işlem adımlarını içerir; Görüntünün optik tarayıcı ile veya dijital görüntüleme sistemleri kullanılarak saklanması, veri sıkıştırma ve görüntü iyileştirme, sonuçların görüntü analizine dayalı olarak değiştirilmesi ve kullanıma hazır hale getirilmesidir. Sonuç olarak, yapılan işlemler sonucunda elde edilen görüntü genelde ilk görüntüye benzerdir. Renkli görüntüler, genelde üç renk (Kırmızı, Yeşil, Mavi) kanalı içerir ve her rengin ayrı bir sayısal değeri vardır. Piksel değerlerinin sayısal aralığı, görüntüdeki derinliğinin bit sayısına bağlıdır. Örneğin 8-Bit bir görüntünün maksimum piksel değeri 2^8-1'dir yani 255'tir.Minimum değer ise 0'dır. Bu değerler görüntüdeki renk tonlarının oluşmasını sağlar. Bu yöntemle görüntüler matematiksel olarak ifade edilebilir. Böylece matematiksel fonksiyonlar bu görüntüler üzerine uygulanabilir.

Bölütleme, görüntünün her biri kendi içerisinde anlamlı ve benzer özellikleri (gri seviye, renk, doku, parlaklık, zıtlık vb.) barındıran alt kümelerine ayrılması şeklinde tanımlanabilir. Sayısal görüntü işleme sürecinin en önemli [96] ve zor aşamalarından [97] birisidir. Literatürde çok sayıda yöntem ve yaklaşımlar önerilmesine rağmen, halen tüm görüntü tipleri üzerinde uygulanabilen ve mükemmel sonuçlar üreten mutlak bir çözüm mevcut değildir [96,98]. Bu nedenle görüntü işleme ve bilgisayarla görme (Computer Vision) alanlarında tam çözülememiş bir sorun olarak devam etmektedir [98]. Genel amaçlı görüntülerin yanı sıra tıbbi görüntülerin bölütlenmesi de oldukça önemli bir çalışma alanıdır [99].

Tıbbi görüntü bölütleme, özellikle yüksek çözünürlüklü iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) görüntüleri büyük miktarda üretme yeteneğine sahip, karmaşık tıbbi görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte çok önemli hale gelmiştir [100]. Tıbbi görüntü bölütleme, iki veya üç boyutlu görüntülerin biyolojik yapılara karşılık gelen kümelere ayrılması anlamına gelmektedir. Genel amaçlı görüntülerde olduğu gibi, tıbbi görüntülerin bölütlenmesinde de evrensel bir yöntem ya da algoritma bulunmamaktadır [101]. Tıbbi görüntü analizlerinde manuel yöntemlerin kullanılması [27] hem zaman maliyeti açısından yüksek [46,102] hem de hesaplama hatalarına neden olabilecek birçok olumsuzlukları beraberinde getirmektedir. Bu sorunları ortadan kaldırmak için son yıllarda önemli sayıda çalışmalar yapılmıştır.

4.2. GÖRÜNTÜ İŞLEME YÖNTEMLERİ

Bu bölümde, çalışmada kullanılan kan hücrelerinin segmentasyonu için bazı önemli fonksiyonların açıklamalarına yer verilmiştir.

4.2.1. Bağlı Bileşen Etiketleme

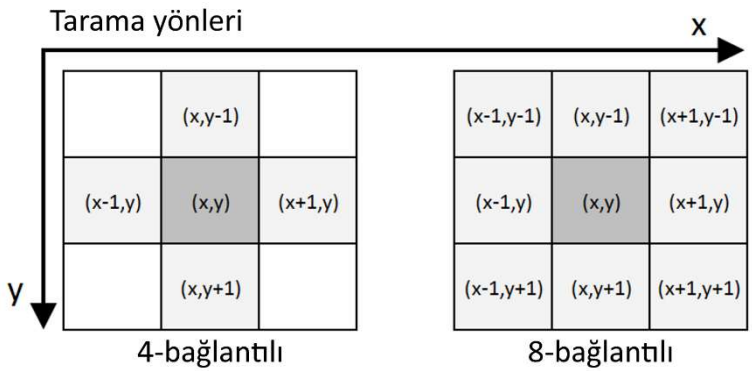
Bağlı Bileşen Etiketleme, literatürde Connected-Components Labeling (CCL) olarak bilinir ve bir görüntüdeki her bir öğenin (piksel) komşuluk ilişkilerine bakılarak tabii oldukları bileşeni (piksel grubu) belirlemek ve her birini ayrı bir etiketle işaretlemek için kullanılır [103]. Bu yöntem genellikle otomatik denetleme [22] yapılan işlerde tercih edilir. Bu algoritma, çoğu zaman yakından ilişkili bir yöntem olan segmentasyon ile karıştırılır [104]. Ancak segmentasyon daha öncede belirtildiği gibi görüntünün her biri kendi içerisinde anlamlı ve benzer özellikleri barındıran alt kümelerine ayrılmasını sağlar. Bu nedenle iki yöntem birbirinden farklıdır.

Görüntüdeki bileşen, komşu piksellerin belli bir derecede yakınlığı veya renklerinin aynı olmasına göre ölçülür ve benzersiz yapıda bir numara ile etiketlendirilir. Komşulukları göz önüne alındığında yaygın olarak kullanılan 4-bağlantılı ve 8-bağlantılı tipleri vardır (Şekil 4.1). 4-bağlantılı modeli, ana yönler olan kuzey, güney, doğu ve batı komşularıdır. 8-bağlantılı modelinde ara yönlerdeki (kuzeydoğu, kuzeybatı, güneydoğu, güneybatı) bağlantılar da hesaba katılır. Bunlardan 8-

bağlantılı olan daha iyi sonuçlar vermektedir. Ancak 4-bağlantılı türüne göre daha fazla işlem yapılacağından, görüntü tarama işlemini daha geç tamamlayacaktır. Görüntü, m sütun ve n satır içeren bir $R[x, y]$ dizisi ile temsil edilsin. Burada $\forall x \in \{0,1, \dots, m-1\}$ ve $\forall y \in \{0,1, \dots, n-1\}$ olmak üzere sütun ve satır indislerini temsil etmektedir. Görüntüdeki her bir pikselin potansiyel bir ayrık bölge olduğunu düşünürsek, bağlı bileşen etiketlerini tutmak için $R[x, y]$ dizisi ile aynı boyutta bir $l[x, y]$ dizisi tanımlamak gerekir. Segmente edilmiş R görüntüsünü S ayrık bölgeden meydana geldiğini düşünürsek, $\forall S \in R$;

$$R_f = R_b^C = \bigcup_{x=1,\, x \neq b}^{S} R_i \tag{4.1}$$

Eşitlik 5.1'de R_f görüntüdeki nesneleri, R^C kümenin tümleyenini, R_b görüntünün arka planını temsil etmektedir. Literatürde bağlı bileşen etiketleme ile ilgili birkaç farklı yaklaşım yöntemi bulunmaktadır. Bu çalışmada iki-geçişli (*two-pass*) algoritma kullanılmıştır. Birinci geçişte; R görüntüsünü satır satır tarayarak, sıfır olmayan her bir $R[x, y]$ pikseli için yine sıfırdan farklı bir l değeri (etiket) ataması yapar. Burada l değeri, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi piksel komşuluk tipine bakılarak belirlenir. Tüm komşu piksel değerleri sıfır (arka plan) ise $R[x, y]$ pikseli için yeni bir etiket numarası atanır. Sıfırdan farklı bir komşu piksel varsa aktif etiket numarası $R[x, y]$ pikseli için atanır.



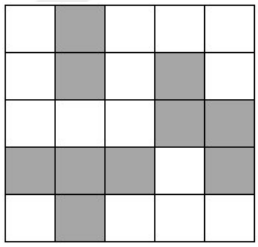
Şekil 4.1. Komşu bağlanlatıların iki farklı tipi.

Komşular arasında birden fazla sıfırdan farklı piksel varsa; "U" şeklindeki ya da ters "E" şeklindeki bileşenlerin bazı piksellerinde komşuluğa bakıldığında birden fazla

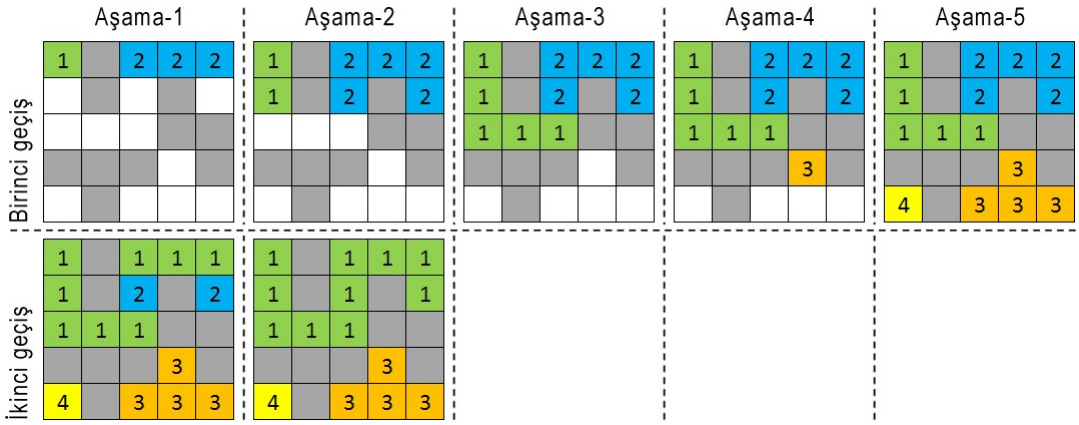
sayıda etiket numarası görülür. Bu durumda bölgedeki herhangi bir etiketlenmiş pikselin etiket numarası atanır. Komşulardan herhangi birinin etiket değeri farklı ise (etiket çakışması), etiket çifti eşdeğer olarak saklanır. Eşdeğerlik çiftleri ayrı bir veri yapısında tutulmalıdır. İkinci geçişte; görüntüdeki tüm bölge pikselleri birinci geçişte etiketlenmiş olmasına rağmen, bazı bölgelerde etiket çakışması nedeniyle farklı etiket numarasına sahip pikseller bulunabilir. Bu nedenle tüm görüntü tekrar taranır ve pikseller eşdeğerlik olarak veri yapısında tutulan etiket numaraları, küçük olanın numarasıyla değiştirilir. Böylece bütün komşu pikseller aynı numara ile etiketlenmiş olur.

4.2.1.1. Örnek Uygulama

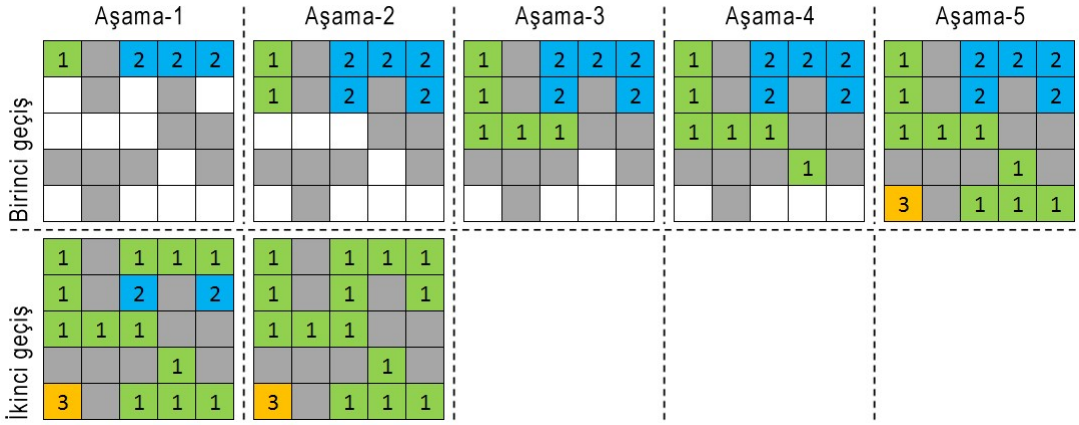
CCL örneği için giriş görüntüsü Şekil 4.2'de verilmiştir. Buna göre 4-bağlantılı çözümü ve işlem adımları Şekil 4.3'te, 8-bağlantılı çözümü ve işlem adımları Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Burada beyaz renkli pikseller nesneleri, gri renkli pikseller ise arkaplanı temsil etmektedir.



Şekil 4.2. Örnek giriş görüntüsü.

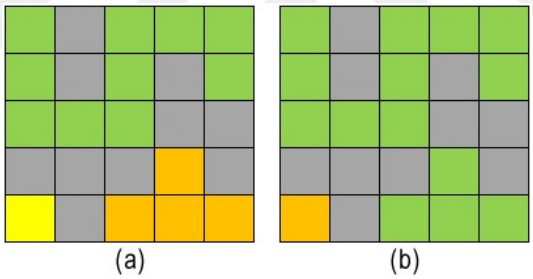


Şekil 4.3. 4-bağlantılı uygulama örneği.



Şekil 4.4. 8-bağlantılı uygulama örneği.

Örnek görüntü desenine göre her iki modelin sonuçları
Şekil 4.5'te verilmiştir. Buradan anlaşılacağı üzere, farklı değerlerdeki bağlantı komşulukları ile aynı görüntüde tespit edilen bileşen ya da nesne sayısında da farklı değerler görülebilmektedir.

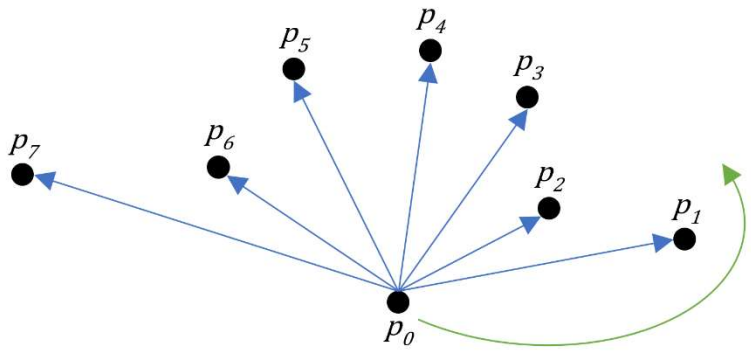


Şekil 4.5. Sonuç görüntüleri; a) 4-bağlantılı, b) 8-bağlantılı.

4.2.2. Convex Hull

Convex hull en genel tanımıyla, öklidyen düzlemde bir dizi $S = \{p_0, p_1, \dots, p_N\}$ noktasını kapsayan en küçük dışbükey kümesidir. Bu çalışmada convex hull algoritması olarak Graham Scan [105] metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde ilk olarak y eksenine göre en küçük değere sahip olan nokta $p(x_0, y_0)$ tespit edilir ve bu nokta esas alınarak geriye kalan tüm noktalar polar açılarına göre $\tan^{-1}(y - y_0/x - x_0)$ küçükten büyüğe doğru sıralanır (Şekil 4.6). Dış kabuğu oluşturacak her bir nokta p_h için önceki p_{h-1} ve sonraki p_{h+1} noktalarıyla birlikte oryantasyonu hesaplanır. Eğer seçilen noktada yön değiştirme varsa bu nokta elenir. Yön değiştirme yoksa, bu

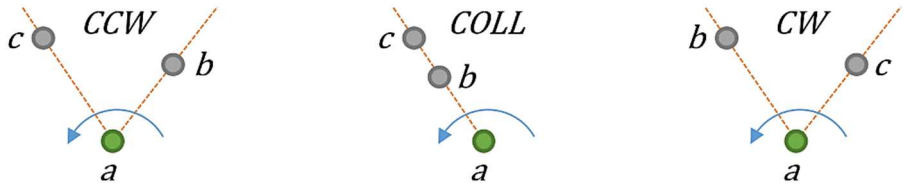
nokta dış kabuğun bir koordinatı olarak belirlenir. Bu şekilde düzlemde bulunan tüm noktalar taranır. Algoritma analiz edildiğinde; Y-eksenindeki en küçük değerlikli noktanın bulunması $O(n)$, noktaların küçükten büyüğe doğru sıralanması $O(n \log n)$, dış kabuğu oluşturacak noktanın belirlenmesi veya çıkartılması $O(n)$ olup, buna göre algoritmanın çalışma zamanı $O(n \log n)$'dir.



Şekil 4.6. Bir dizi noktanın polar açılarına göre sıralanması.

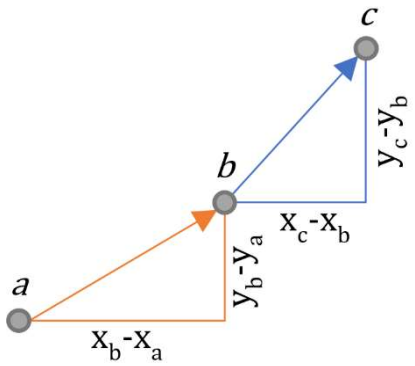
4.2.2.1. Oryantasyon

Aynı düzlemde bulunan üç noktanın (a, b ve c) Şekil 4.7'de gösterildiği gibi karakteristik özellikleri; saat yönünün tersinde (CCW), saat yönünde (CW) ve aynı doğru üzerinde (COLL, *Collinear*) olmak üzere üç farklı şekilde sıralanabilir. Bu noktaların oryantasyonu, determinantının $\Delta(a, b, c)$ işaretine göre karakterize edilir.



Şekil 4.7. Üç noktanın oryanyasyonu.

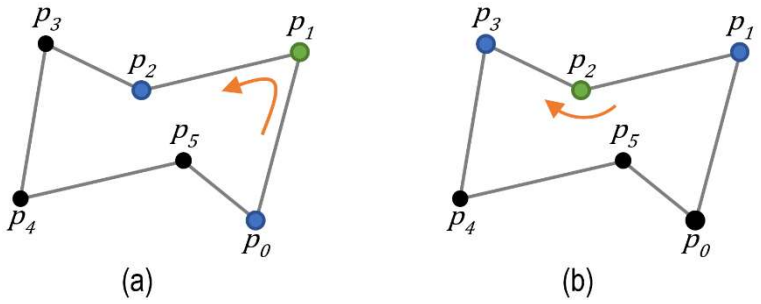
Bu düzlemdeki üç noktanın (a, b, c) oryantasyonu COLL ise bunun simetriği olan (c, b, a)'nın da oryantasyonu yine COLL olur. Ancak bu noktaların oryantasyonu CCW ise simetriği CW olur. Aynı şekilde bunun tersi de geçerlidir. Oryantasyon hesaplaması, bu noktaların öklidiyen düzlemdeki dikey ve yatay eksen değerlerinin (Şekil 4.8) determinantı bulunarak yapılır (Eşitlik 4.2).



Şekil 4.8. Oryantasyon hesaplanmasında kullanılan parametreler.

$$\Delta(a,b,c)=\begin{vmatrix} x_a & y_a & 1 \\ x_b & y_b & 1 \\ x_c & y_c & 1 \end{vmatrix} = x_a\begin{vmatrix} y_b & 1 \\ y_c & 1 \end{vmatrix} - y_a\begin{vmatrix} x_b & 1 \\ x_c & 1 \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} x_b & y_b \\ x_c & y_c \end{vmatrix} \tag{4.2}$$

Oryantasyon işleminin sonucuna göre; $\Delta(a,b,c) < 0$ ise saat yönünün tersinde (CCW), $\Delta(a,b,c) > 0$ ise saat yönünde (CW) ve $\Delta(a,b,c) = 0$ ise aynı doğru üzerindedir (*Collinear*). Bu durumda, elde edilen sonuçlara bakarak, seçili noktanın dışbükey olup olmadığına karar verilir (Şekil 4.9) ve dışbükeylilik göstermeyen noktalar listeden kaldırılır.

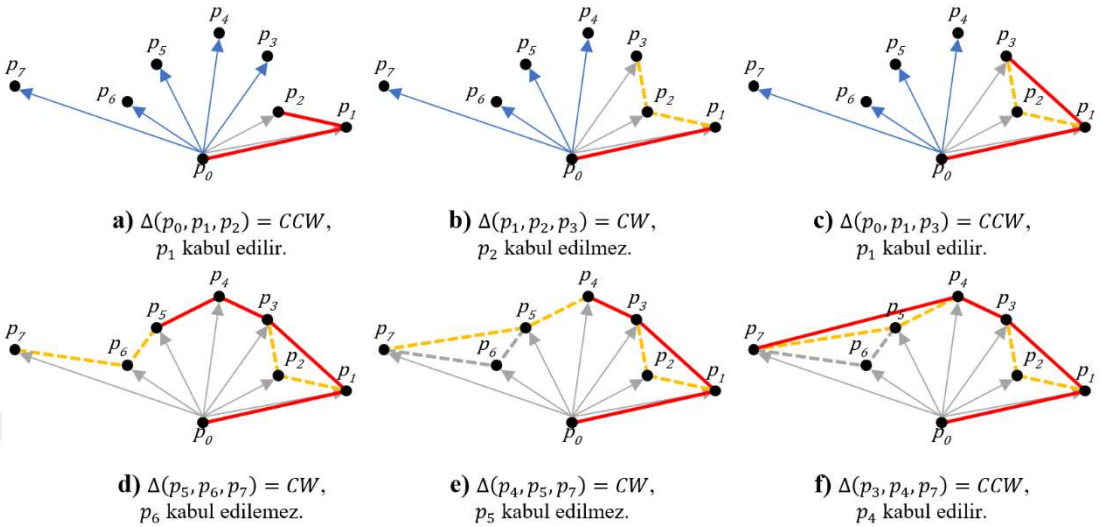


Şekil 4.9. Noktaların bükeylik durumları; a) dışbükey nokta, b) içbükey nokta.

4.2.2.2. Graham Scan Örneği

Bir noktanın dışbükey olarak kabul edilebilmesi için karakteristik özelliği saat yönünün tersinde (CCW) olmalıdır. Şekil 4.6'da verilen $S = \{p_0, p_1, \dots, p_7\}$ sıralanmış nokta dizisinin Graham scan yöntemine göre detaylı işlem adımları Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Burada p_2, p_5 ve p_6 noktaları dışbükeylilik göstermediği

için elenmiştir. Son durumda oluşturulan dış kabuğun noktaları $H = \{p_0, p_1, p_3, p_4, p_7\}$ olarak belirlenmiştir.



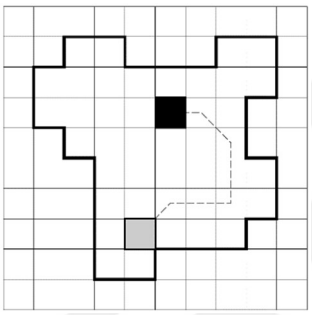
Şekil 4.10. Graham scan yönteminin işlem adımları.

4.2.3. Watershed Transform

Watershed dönüşümü, matematiksel morfoloji alanında görüntü segmentasyonu için kullanılan bir metottur. İlk olarak 1979 yılında Beucher [106] ve Lantuéjoul tarafından gri tonlamalı görüntülerin segmentasyonu için önerilmiştir [107,108]. Vincent ve Soille [109], hızlı uygulama yöntemlerini geliştirmişlerdir. Ayrıca Arslan vd. [7], havza dönüşümünün performansını iyileştirmek için işaretleyici (marker) fonksiyonları kullanmışlardır.

Jeolojik bir fikir olan Watershed; topografik yapının sonucu olarak, yağmur sularının yüzeysel akışa geçerek belirli bir mecrada toplandığı ve bunların etkisi altında kalan sahaların tamamıdır. Aynı şekilde bir görüntünün eğimi de topografik bir yüzeye benzemektedir. Burada yükseltiler görüntüdeki piksellerin gri değerlerine göre belirlenir [107]. Gri değeri düşük pikseller vadileri, yüksek olan pikseller ise tepeleri oluşturmaktadır. Bir görüntüdeki havza hesaplama işleminde, yağış ve su baskını olmak üzere iki temel algoritmik yaklaşım vardır.

Yağış yaklaşımında; görüntü boyunca yerel minimumlar (belli bir pencere boyutunda) bulunur. Her yerel minimuma benzersiz bir etiket verilir. Bitişik yerel minimumlar benzersiz bir etiketle birleştirilir. Daha sonra, etiketleme yapılmamış her piksel için kavramsal bir su damlası yerleştirilir. Su damlası, etiketlenmiş bir piksele ulaşana kadar kendinden daha küçük gri değere sahip komşusuna geçer ve bu değer etiket değerini alır. Şekil 4.11'de yerel bir minimum noktası siyah olan ve kesikli çizgi ile su damlası yolunun yerel minimuma düştüğünü temsil eden bir havzayı [110] göstermektedir.



Şekil 4.11. Yağmursuyu havzası.

Su baskını yaklaşımında, gri tonlamalı bir f görüntüsünde; piksel değeri en yüksek olan h_{max} ve piksel değeri en düşük olan h_{min} olarak gösterilsin. Görüntünün minimumlarıyla ilişkili havzaları belirlemek için, h_{min}'den h_{max}'a kadar bir özyineleme tanımlanır ve değişen h gri seviyesine göre havzalar kademeli olarak genişletilir. Buna göre her bir h minimumu ile ilişkili havza $H(M)$ ile gösterilirse, bu havzadaki yüksekliği h ya da daha küçük olanların kümesi ise (Eşitlik 4.3);

$$H_h(M) = \{p \in H(M) | f(p) \leq h\} \tag{4.3}$$

$$H_h(M) = H(M) \cap T_h(f) \tag{4.4}$$

Eşitlik 4.4'de, T_h, f görüntüsünün h seviyesindeki eşik kümesini temsil etmektedir. X_h ile gri seviyesi h'ye kadar olan küçük havzalar kümesi olarak gösterilirse (Eşitlik 4.5);

$$X_h = \bigcup_{i=1} H_h(M_i) \tag{4.5}$$

Ayrıca h seviyesindeki yerel minimumlarda bulunan tüm noktaların kümesi $RMIN_h(f)$ olarak gösterilsin. Her bir yerel minimum bölgesine bir piksel boyutunda delik açılır ve tüm topografyaya alt bölgelerinde açılan deliklerden su verilir ve her bir toplama havzasını doldurmaya devam eder. Suyun ilk ulaştığı noktalar, görüntü üzerinde en düşük değere sahip olan yerlerdir. Bu noktalar, h_{min} seviyesindeki yerel minimuma ait noktaları temsil eder (Eşitlik 4.6).

$$X_{h_{\min}} = T_{h_{\min}}(f) = RMIN_{h_{\min}}(f) \tag{4.6}$$

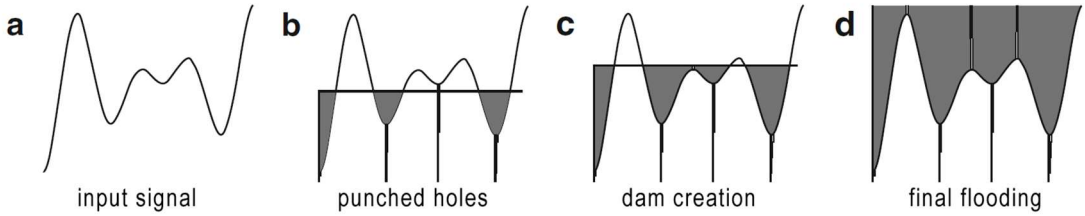
Suyun yükselişiyle beraber havzanın genişlemesi veya suyun bir sonraki havzaya geçişi gibi durumlar meydana gelir; Buna göre h_{min+1} seviyesindeki noktaların kümesi, $X_{h_{min+1}}$ olarak tanımlanır ve $T_{h_{min+1}}(f)$'deki herhangi bir bağlantılı bileşen Y ile X arasındaki ilişkiler aşağıdaki gibi olabilir;

1. $Y \cap X_{h_{\min}} = \varnothing$
2. $Y \cap X_{h_{\min}} \neq \varnothing$
3. $Y \cap X_{h_{\min}} \neq \varnothing$ ve bağlantısız

Böylece Eşitlik 4.7'deki özyinelemeli (recursive) eşitlik hesaplanarak görüntüdeki tüm havzalar hesaplanabilir.

$$X_{h_{\min+1}} = RMIN_{h_{\min+1}}(f) \cup EA_{T_h}\left(X_{h_{\min}}\right) \tag{4.7}$$

Bu esnada havzalardaki su taşmak üzereyken, diğer havzalarla birleşmesini önlemek amacıyla en yüksek rakımlı sırt noktasına eşit olacak bir yüksekliğe kadar su seti (baraj) inşa edilir. Bu baraj sınırları, setlerin bölme çizgilerini belirtir. Şekil 4.12'de, Watershed dönüşümünün bir toplama havzasındaki su baskını simülasyonu [111] gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Watershed dönüşümünün su baskını simülasyonu.

4.3. ÖZELLİK ÇIKARIMI

Görüntü işlemedeki öznitelik çıkarımı, büyük orandaki gereksiz verilerin azaltılmış bir veri gösterimine dönüştürülmesinin bir yöntemidir. Giriş verilerinin, özellik veri setine dönüştürülmesi, özellik çıkarımı olarak adlandırılır [112]. Özellik çıkarım yöntemleri, çeşitli nesne sınıflarını temsil eden en belirgin özellikleri çıkarmak için nesneleri ve görüntüleri analiz eder. Özellik vektörleri, temsil edildikleri sınıfa atanan sınıflandırıcılara giriş parametresi olarak kullanılır. Özellik çıkarımının amacı, bir girdi kümesini başka bir kümeden ayıran belirli özellikleri veya özellikleri ölçekleyerek orijinal veriyi azaltmaktır. Çıkarılan özellik, görüntünün ilgili özelliklerin tanımını özellik vektörlerine dönüştürerek sınıflandırıcıya girdi türünün özelliklerini sağlamalıdır.

Nesnelerin belirgin özellikleri (özellik vektörleri) genellikle sınıflandırmada kullanılır [73]. Lökosit hücrelerinin sınıflandırması için mikroskobik görüntülerde yapılan araştırmaların çoğu geometrik ve doku tabanlı özellikler üzerine olmuştur [113]. Hücrelerin ayırt edilmesi için kullanılan geometrik özellikler, lökositlerin yapısını ve büyüklüğünü tanımladıkları için önemli bir rol oynamaktadır. Lökositlerin alanı, çevresi; hücre boyutunu temsil etmek için kullanılan özelliklerden, şekil özellikleri bölge ve sınır temelli özelliklere gruplanabilir. Geometrik özellikleri çıkarmak için, hücre görüntüsü, hücre pikselleri sıfır olmayan bir değerle temsil edilen ikili görüntüye dönüştürülür. Doku özellikleri, piksel yoğunluğundaki mekânsal varyasyonun bir fonksiyonu olarak tanımlanır [114].

Günümüzde tıbbi görüntü işleme alanında, büyük ölçekli görüntü serilerinden önemli meta-verilerinin (örneğin hücre çekirdeği renk yoğunluğu, homojente, çap gibi ayırt

edici özellikllerin hemen tamamı) bulunması ve özellik çıkarılmasını sağlayan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu büyük ölçekli görüntü serilerinden önemli özelliklerin çıkarılması işlemi, hesaplama süresi, depolama kapasitesi ve veri transferinin yapılması bakımından son derece zorlayıcıdır [115].

Özellik çıkarımı, beyaz kan hücrelerinin otomatik olarak sınıflandırmasında önemli bir işlemdir [13,66] ve seçilen özellikler sınıflandırıcıların performansını etkiler. Sınıflandırmanın doğruluk oranı, öznitelik özelliklerinin yanısıra çıkarılan özellik sayısına da bağlıdır. Beyaz kan hücresi özellikleri; geometrik özellik, renk özelliği ve doku özelliği olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Geometrik özellik; çekirdeğin şekli ve boyutu, beyaz kan hücresinin şekli ve boyutu, çekirdek lob sayısı, hücre daireselliği ve çekirdek dikdörtgenliği bilgilerini içerir [116]. Renk özelliği; her bir beyaz kan hücresinin kan yaymasına benzersiz ve ayırıcı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Çekirdeğin renk bilgisi önemli bir özellik olarak sunulmaktadır. Doku, çekirdeğin içindeki belirli granül ve kromatin kaynaklı özellikleridir. Doku özelliği, ortalama (mean), standart sapma (standard deviation), çarpıklık (skewness), kurtosis ve parlaklığın entropisi gibi istatistiksel bilgileri içerir.

Saraswat ve Arya [73], özellik çıkarımında, geometrik ve doku özellikleri olmak üzere 25 özellik vektörü kullanmışlardır. Bu özellikler; hücre çekirdeğinin alanı, sitoplazmanın alanı, sitoplazmanın çekirdeğe oranı, çekirdeğin dışbükey alanı, sitoplazmanın dışbükey alanı, çekirdeğin katılık derecesi, sitoplazmanın katılık derecesi, çekirdek eksantrikliği, sitoplazmanın eksantrikliği, lob sayısı, çekirdeğin kırmızı bileşeninin ortalama değeri, çekirdeğin yeşil bileşeninin ortalama değeri, çekirdeğin mavi bileşeninin ortalama değeri, kırmızı bileşeninin ortalama değeri, sitoplazmanın yeşil bileşeninin ortalama değeri, sitoplazmanın mavi bileşeninin ortalama değeri, çekirdeğin kırmızı bileşeninin standart sapması, çekirdeğin yeşil bileşeninin standart sapması, çekirdeğin mavi bileşeninin standart sapması, sitoplazmada kırmızı bileşeninin standart sapması, sitoplazmanın yeşil bileşeninin standart sapması, sitoplazmanın mavi bileşeninin standart sapması, lökosit entropisi, çekirdeğin çevresi, çekirdeğin yoğunluğu şeklindedir. Ele alınan bu özellikler, çeşitli araştırmacılar tarafından doku görüntülerinde lökositler sınıflandırması için kullanılmaktadır ve etkili sonuçlar üretmek için yeterlidir [12,117,118].

Sarrafzadeh vd. [48], lökosit hücleri için özellik çıkarımında, geometrik özellikler, doku özellikleri ve renk özellikleri olmak üzere 25 özellik vektörü elde etmişlerdir. Bu özelliklerden 6 renk özelliği hem sitoplazma hem de çekirdek çıkarımında, 6 geometrik özelliği sadece çekirdek çıkarımında, 6 istatistiksel özellik ve 7 moment değişmezliği sitoplazma çıkarımı içindir.

Çıkarılan özellikler, her biri aşağıda tanıtılan geometrik özellikler ve doku özelliklerine göre kategorize edilir.

4.3.1. Geometrik Özellikler

Geometrik özelliklere örnek olarak; alan (area), çevre (perimeter), kompaktlık (compactness), eksantriklik (eccentricity) veya dairesellik (circularity), majör ve minör eksenler (major and minor axis) olarak söylenebilir.

Alan (area): hemen hemen tüm tıbbi görüntü sınıflandırma uygulamalarında, görüntüdeki nesnelerin boyutunun ölçmesi gerekir. Bunun için kullanılan temel özellik nesnenin alanıdır. Görüntü işlemede, bir nesnenin alanı genellikle nesnenin içindeki piksel sayısı ile ölçülür. Nesnelerin bölümlenmesinden sonra, her kapalı bölgenin (nesne) içindeki piksellerin sayısı, bölgenin boyutunu veya alanını belirtir [119].

Çevre (perimeter): Bir cismin çevresinin değerlendirilmesi, genellikle biyomedikal görüntü işleme için tasarlanmış herhangi bir algoritmanın önemli bir parçasıdır. Çevre gibi kontur özellikleri, aynı alana ancak farklı çevreye sahip nesneler arasında ayırt edilmesine izin verir. Örneğin, aynı alana sahip iki hücre çekirdeğinin çok farklı bir kontur şekli olabilir; biri dairesel konture, diğeri çok uzun ve dar oval bir şekle sahip olabilir. Bu nedenle çevre değerinin bilgilendirici bir görüntü işleme özelliği olarak kullanılabilir [119].

Kompaktlık (compactness): Hem alan hem de çevre, görüntü işlemede önemli birer özellik olmasına rağmen, genellikle birleşik boyut ölçüsü oluşturmak için bu iki ölçümün bir araya getirilmesi arzu edilir. Bu yöntem Eşitlik 4.8'deki gibi tanımlanır:

$$C = \frac{P^2}{A} \tag{4.8}$$

Bu iki ölçüyü (P çevre, A alan) bölerek yoğunluk belirli bir alan birimi için çevre boyutunu tanımlayan bir özellik sağlar. Kompaktlık, geniş kompaktlık değerlerine sahip uzun ve dar oval şekilli nesneleri ve küçük kompaktlık değerlerine sahip dairesel nesneleri kolayca ayırt edebilir. Biyomedikal görüntülerdeki birçok nesne oval ve dairesel şekillere (ör. Hücreler, çekirdekler ve tümörler) sahip olduğundan, kompaktlık gibi özellikler genellikle sınıflandırma işlemi sırasında ana geometrik ölçümler olarak düşünülür [119].

Major ve Minör Eksenler (major and minor axis): Nesnelerin boyutunu ifade etmek için, nesnenin ana eksenini hesaplamak yaygın bir uygulamadır. Büyük eksen, nesnenin konturunda bulunan ve birbirinden en uzak mesafedeki iki noktayı birbirine bağlayan çizgi olarak tanımlanır. Başka bir deyişle, ana ekseni bulmak için kontur üzerindeki iki nokta bulunur; bu iki nokta birbirinden en uzak olan iki nokta olmalıdır. Tüm kontur elemanları sırası ile eşleştirip tüm uzaklıklar bulunmak suretiyle bu iki nokta çifti rahat olarak hesaplanabilir. Bu iki noktayı birleştiren çizgi ana eksendir. Bir elipsin ana ekseninin her iki odak noktasından geçen çizgi olduğu kolaylıkla görülebilir. Uzun eksenin uzunluğu, nesnenin fiziksel ve biyolojik önemi olan en büyük boyutudur. Ana eksene dik olan eksene alt eksen denir. Elipsin minör ekseni, kontur üzerindeki iki noktayı birleştiren en kısa çizgidir. Bir daire içerisinde, merkezden geçen herhangi bir çizgi hem büyük hem de küçük bir eksendir. Büyük ve küçük eksenler, hücre görüntülerinin sınıflandırılmasında önemli teşhis özelliklerindendir [119].

Eksantriklik (eccentricty): Bir nesnenin şeklinin simetrik bir dairesel şekilden sapmasını değerlendirmek için tanımlanır ve Eşitlik 4.9'daki gibi formülüze edilir:

$$E = \frac{L_{Major}}{L_{Minor}} \tag{4.9}$$

Görüldüğü gibi, bir dairenin eksantrisitesi 1 ise elipsin (oval) daima birden fazladır. Buna ek olarak, bu ölçüm ne kadar büyük olursa, nesnenin daha az dairesel şekli (ve daha doğrusal) olması gerekir [119].

Dairesellik (Circularity) ölçüsü; $P = 2\pi r$ ve $A = \pi r^2$ olduğuna göre, daire için bu değer 1'dir. Eşitlik 4.10'daki gibi hesaplanır.

$$C = \frac{4\pi A}{P^2} \tag{4.10}$$

4.3.2. Dokusal (İstatistiksel) Özellikler

Bir görüntüdeki yoğunluk seviyelerine karşılık gelen değişkeni b_i olarak alalım ve bu görüntüdeki olası yoğunluk değerlerinin $(i = 0,1,2,\dots,L-1)$ sayısını da L olarak belirleyelim. Buna göre aşağıda verilen bazı istatistiksel özellikleri hesaplayabiliriz.

Ortalama (mean): Görüntü histogramındaki koyuluk değerlerinin veya giriş verisinin aritmetik ortalamasıdır. Eşitlik 4.11'de gösterilmektedir.

$$m = \sum_{i=0}^{L-1} b_i \times p(b_i) \tag{4.11}$$

Varyans (variance): verilerin aritmetik ortalamadan sapmalarının karelerinin toplamını ifade eder. Eşitlik 4.12'de gösterilmektedir.

$$\sigma^2 = \sum_{i=0}^{L-1} (b_i - m)^2 \, p(b_i) \tag{4.12}$$

Standart sapma (standard deviation): bir veri setindeki (örn: histogram) değerlerin ne kadar dağılım gösterdeğini ölçer ve varyansın kareköküdür. Yani, σ'dır.

Enerji (energy): Açısal ikinci moment (angular second moment) ile elde edilir ve gri seviyelerin yerel tekdüzeliğini (uniformity) ölçer. Görüntüdeki piksel değerleri çok benzer olduğu zaman enerji değeri büyük olacaktır. Eşitlik 4.13'te gösterilmektedir.

$$E = \sum_{i=0}^{L-1} \left[p\left(b_i\right) \right]^2 \tag{4.13}$$

Entropi (entropy): bir veri kümesindeki ya da görüntü histogramındaki düzensizliği ölçen istatistiksel bir yöntemdir. Entropi, düzensizlik ile doğru orantılı olarak değişir. Eşitlik 4.14'te gösterilmektedir.

$$H = -\sum_{i=0}^{L-1} p\left(b_i\right) \log_2\left(b_i\right) \tag{4.14}$$

Çarpıklık (skewness): veri dağılımının normalden uzaklaşarak sağa veya sola meğilli olarak yamuk bir şekil almasını ifade eden bir kavramdır. Normal bir dağılımda çarpıklık katsayısı "sıfır" olacaktır. Çarpıklık arttıkça mod ve ortalama birbirinden uzaklaşır. Çarpıklık katsayısı $-\infty$ ile $+\infty$ arasında değerler alabilir ve bu durumda pozitif ile negatif olmak üzere iki tip çarpıklıktan söz edilebilir. Eğer ortalama medyandan küçük ise dağılım sola (negatif) çarpık olur. Eğer ortalama medyandan büyük ise dağılım sağa (pozitif) çarpık olur. Eşitlik 4.15'te gösterilmektedir.

$$Skewness = \frac{1}{\sigma^3} \sum_{i=0}^{L-1} \left(b_i - m\right)^3 p\left(b_i\right) \tag{4.15}$$

Basıklık (kurtosis): normal dağılım eğrisinin ne kadar dik veya basık olduğunu gösterir. Tam çan eğrisinin basıklık katsayısı "sıfır"dır. Basıklık katsayısı pozitif ise, eğri normale göre daha diktir. Negatif ise normale göre daha basıktır. Eşitlik 4.16'da gösterilmektedir.

$$Kurtosis = \frac{1}{\sigma^4} \sum_{i=0}^{L-1} \left(b_i - m\right)^4 p\left(b_i\right) \tag{4.16}$$

Pürüzsüzlük (Smoothness): bir bölgedeki yoğunluğun göreli olarak yumuşaklığını ölçer. Eğer bölge sabit bir yoğunluğa sahipse, R değeri "0" olur. Bölgede yoğunluk seviyesi değerlerinde büyük sapmalar varsa, bu sefer R değeri 1'e yaklaşacaktır. Eşitlik 4.17'de gösterilmektedir.

$$R = 1 - \frac{1}{\left(1 + \sigma^2\right)} \tag{4.17}$$

4.3.3. Özellik Vektörü Fonksiyonu

Yukarıda bahsedilen özellik çıkarma yöntemleri kullanılarak, Eşitlik 4.18'deki gibi istatistiksel ve Eşitlik 4.19'daki gibi geometrik özellik vektörleri oluşturulur.

$$f_D = \{mean, stdDev, Skewness, ...\} \tag{4.18}$$

$$f_G = \{area, perimeter, eccentricity, ...\} \tag{4.19}$$

Daha sonra bu özellik vektörleri bir araya getirilerek, Eşitlik 4.20'deki gibi sınıflandırma algoritmasının parametrelerini oluşturan özellik vektörü belirlenmiş olacaktır.

$$FV = \{f_G, f_D\} \tag{4.20}$$

Bu çalışmada lökosit hücrelerinin sınıflandırılmasında kullanılmak üzere 32 adet istatistiksel ve geometrik özellik çıkarılmıştır. İstatistiksel özelliklerin belirlenmesinde RGB renk uzayındaki her bir kanal için ayrı ayrı hesaplama işlemleri yapılmıştır. Özellik vektörleri için detaylı bilgi Bölüm 8.3'te çizelge olarak verilmiştir.

BÖLÜM 5

MAKİNE ÖĞRENME ALGORİTMALARI

5.1. GİRİŞ

Makine Öğrenmesi (Machine Learning), matematiksel ve istatistiksel yöntemler kullanarak mevcut verilerden çıkarımlar yapan, bu çıkarımlarla bilinmeyene dair tahminlerde bulunan yöntem paradigmasıdır. Makine öğrenmesi, geniş kapsamlı uygulamalarla birlikte bilgisayar biliminin en hızlı gelişen alanlarından birisidir.

Geçmişte yapılan bazı akademik araştırmalar, makinelerin belirli bir aşamadan sonra verileri öğrenmek zorunda olduğunu göstermiştir. Bunun sonucu olarak araştırmacılar, bu konu üzerinde ortaya çıkan problemlere çeşitli sembolik yöntemlerle yaklaşımda bulunabilmek amacıyla çalışmalarını gerçekleştirdiler [120]. Bu yaklaşımların önemli bir kısmı tahmin (prediction), kestirim (estimation) ve sınıflandırma (classification) yapabilme becerilerine sahiptir. Bu bölümde, WBC'lerin sınıflandırılmasında yayın olarak kullanılan makine öğrenme algoritmalarından bazıları açıklanmaktadır.

5.2. KARAR AĞACI ÖĞRENMESİ

Karar ağacı öğrenmesi (Decision Tree Learning), belirli bir kritere göre veri setinin sürekli olarak bölünmesiyle verileri sınıflandırabilen danışmanlı bir makine öğrenme algoritmasıdır. Karar ağacı öğrenmesi esnasında, öğrenilen her bilgi ağaç üzerinde modellenir. Bu ağaç yapılarında yapraklar sınıf etiketlerini, iç düğümleri (interior nodes) birer girdiyi ve dalları ise sınıf etiketleriyle iç düğümleri arasındaki ilişkiyi temsil eder. Bu yöntem veri madenciliği ve istatistik alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde birçok karar ağacı öğrenme algoritması mevcuttur. Bunlardan yaygın olarak kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir. Bu tez çalışmasında ise C4.5 algoritması tercih edilmiştir.

5.2.1. ID3 Algoritması

ID3 (Iterative Dichotomiser 3) algoritması, J. Ross Quinlan [121] tarafından 1986 yılında geliştirilmiştir. Entropiye dayalı bir yöntem olup sadece kategorik veriler üzerinde çalışabilir ve açgözlü arama (greedy search) yöntemini kullanılır. Bu algoritmada amaç, ağaç oluşturulurken öğrenme kümesindeki veriler mümkün olduğunca birbirine benzer hale getirilir ve böylece ağaç derinliği minimum seviyede tutulmuş olur. Bu yöntemin işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

C bir eğitim kümesini temsil etsin;

1. Eğer C'deki tüm örnekler aynı sınıfın üyesi durumda ise, bu sınıf adında bir düğüm oluşturularak algoritma sonlandırılır. Aksi taktirde, $v_1, v_2, \dots, v_n$ değerleriyle bir özellik (F) seçilir ve karar düğümü oluşturulur.
2. C'deki eğitim örnekleri, karar düğümüne (V) göre $C_1, C_2, \dots, C_n$ olarak alt kümelere ayrılır.
3. Algoritma her bir C_i kümesi için özyinelemeli olarak uygulanır.

Karar ağaçlarında bölümlemeye hangi düğümden başlanacağı çok önemlidir. Uygun düğümden başlanmazsa ağacın içerisindeki düğümlerin ve yaprakların sayısı çok fazla olacaktır. Bu işlem için öncelikle sınıf niteliğinin entropisi hesaplanır (Eşitlik 5.1).

$$H(S) = -\sum_{i=1}^{n} p_i \log_2(p_i) \tag{5.1}$$

Bir sonraki aşamada, Eşitlik 5.2 ve Eşitlik 5.3'te gösterildiği gibi özellik vektörlerinin sınıfa bağımlı entropileri hesaplanır.

$$H(X_k) = -\sum_{i=1}^{n} \frac{|S_i|}{|X_k|} \log \frac{|S_i|}{|X_k|} \tag{5.2}$$

$$H(X,S) = -\sum_{k=1}^{n} \frac{|X_k|}{|X|} H(X_k) \tag{5.3}$$

Son olarak, sınıf niteliğinin entropisinden tüm özellik vektörlerinin entropisi çıkartılarak, her bir özellik için kazanç ölçütü hesaplanır. Karar ağaçlarında kazanç ölçütü olarak; bilgi kazancı (information gain), kazanç oranı (gain ratio) ve istatistikte sıklık dağılımının eşitsizlik miktarının ölçülmesinde kullanılan Gini katsayısından yararlanılabilir. Bu çalışmada kazanç ölçütü için "bilgi kazancı" yöntemi kullanılmıştır (Eşitlik 5.4).

$$IG(X,S) = H(S) - H(X,S) \tag{5.4}$$

En yüksek bilgi kazancına sahip özellik vektörü, ilgili iterasyon için dallanma düğümü olarak seçilir.

5.2.2. C4.5 Algoritması

C4.5 algoritması, Quinlan tarafından sayısal değerlere sahip nitelikler için karar ağacı oluşturma yöntemi olarak geliştirilmiştir. ID3 algoritmasından tek farkı nümerik değerlerin kategorik değerler haline dönüştürülmesidir. En büyük bilgi kazancını sağlayacak biçimde bir eşik değer belirlenir. Eşik değeri belirlemek için tüm değerler sıralanır ve ikiye bölünür. Eşik değer için $[v_i, v_{i+1}]$ aralığının orta noktası alınabilir (Eşitlik 5.5).

$$t_i = \frac{v_i + v_{i+1}}{2} \tag{5.5}$$

Böylece, nitelikteki değerler eşik değere göre iki kategoriye ayrılmış olur.

5.2.3. Twoing Algoritması

Twoing algoritmasında, eğitim veri seti her bir işlem adımında iki parçaya ayrılarak bölümleme yapılır. Bu yöntem Gini algoritmasına göre daha dengeli ağaçlar olmasına rağmen daha yavaş çalışır. Aday bölünmelerin sağ ve sol kısımlarının her biri için nitelik değerinin ilgili sütundaki tekrar sayıları alınır. Aday bölünmelerin sağ

ve sol kısımlarındaki her bir nitelik değeri için sınıf değerlerinin olma olasılığı hesaplanır. Son aşamada ise her bölünme için uygunluk değeri en yüksek olan alınır.

$$\Phi\left(B|d\right) = 2 \cdot \left|\frac{B_L}{T}\right| \cdot \left|\frac{B_R}{T}\right| \sum_{j=1}^{n} \left\| \left|\frac{Tc_j}{B_L}\right| - \left|\frac{Tc_j}{B_R}\right| \right\| \tag{5.6}$$

Burada, T eğitim verisindeki girdi sayısını, B sağ ve sol olarak aday bölünmeyi, d düğümü, Tc_j ise j. sınıf değerini temsil etmektedir.

5.2.4. Gini Algoritması

Gini algoritması ya da Gini indeksi en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu algoritmada nitelik değerleri iki parçaya ayrılarak bölümleme yapılır. Her bölünme için Eşitlik 5.7 ve Eşitlik 5.8'deki gibi $Gini_L$ ve $Gini_R$ değerleri hesaplanır.

$$Gini_L = 1 - \sum_{i=1}^{k} \left(\frac{Tc_i}{B_L}\right)^2 \tag{5.7}$$

Burada, Tc_i soldaki bölümdeki her bir sınıf değerini, B_L sol bölümdeki tüm değer sayısını ifade etmektedir.

$$Gini_R = 1 - \sum_{i=1}^{k} \left(\frac{Tc_i}{B_R}\right)^2 \tag{5.8}$$

Burada, Tc_i sağdaki bölümdeki her bir sınıf değerini, B_R sağ bölümdeki tüm değer sayısını ifade etmektedir. Her bölümlemeden sonra kategorilere göre Gini değerleri hesapanır (Eşitlik 5.9) ve bunlardan en küçük olan seçilir.

$$Gini_j = \frac{1}{n}\left[\left(|B_L| \cdot Gini_L\right) + \left(|B_R| \cdot Gini_R\right)\right] \tag{5.9}$$

Burada, j veri setindeki kategori indisini, n ise veri setindeki toplam girdi sayısını temsil etmektedir.

5.3. RASTGELE ORMAN

Rastgele Orman (Random Forest) algoritması 2001 yılında Breiman [122] tarafından tasarlanmıştır. Bu yöntemde, tek bir karar ağacı üretmek yerine her biri farklı eğitim kümelerinde eğitilmiş olan çok sayıda çok değişkenli ağacın kararlarını birleştirir. Bunun sonucu olarak, sınıflandırma problemlerinin çözümünde yüksek seviyelerde başarı oranı yakalayan bir algoritmadır. Rastgele Orman algoritmasında, diğer karar ağacı yöntemlerinde olduğu gibi dallanma kriterlerinin belirlenmesi ve uygun bir budama yönteminin seçilmesi önemli bir konudur. Dallanma kriterlerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan kazanç ölçümleme tekniği olarak kazanç oranı (gain ratio) ve Gini indeksidir. Bu algoritmanın işletilmesinde, geliştirilecek olan ağaç sayısı ve her bir düğüm için kullanılan örnek sayısı olmak üzere iki farklı parametre esas alınır. Sınıflandırma sürecinde, öncelikli olarak kullanıcı tarafından belirlenen K adet ağaç oluşturulur. Yeni bir örnek sınıflandırılacağı zaman bu K adet karar ağacı tarafından işleme tabi tutulur ve bu ağaçlardan elde edilen en yüksek orana göre yeni örneğin sınıfı belirlenir [123]. Çizelge 5.1'de Random Forest algoritması verilmiştir.

Çizelge 5.1. Random Forest algoritması.

Önkoşul: $S = (x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ bir eğitim setini, F özellikleri ve B ormandaki ağaç sayısını temsil eder.

function RandomForest(S, F)
    $H \leftarrow \emptyset$
    for $i \in 1,2, \dots, B$ **do**
        $S^i \leftarrow$ eğitim setinin bir bootstrap örneği
        $h_i \leftarrow$ RandomizedTreeLearn(S^i, F)
        $H \leftarrow H \cup \{h_i\}$
    end for
    return H
end function

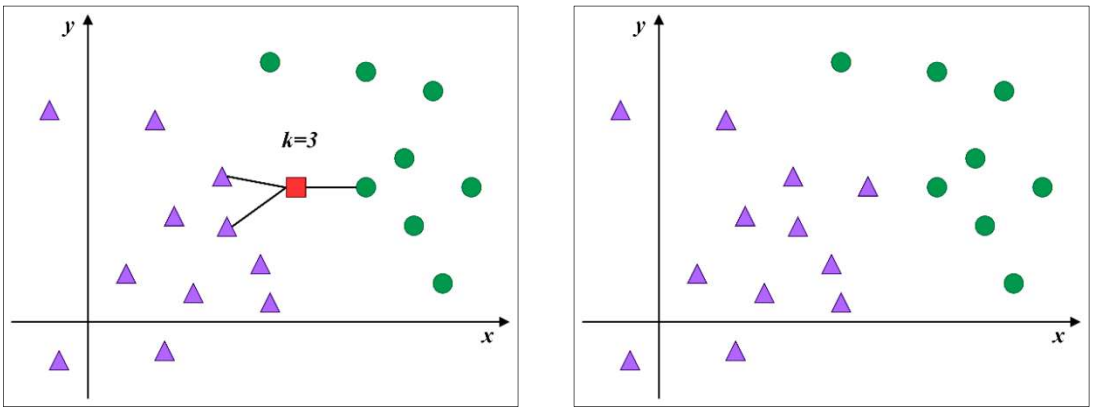
function RandomizedTreeLearn(S, F)
    Her düğüm noktasında:
        $f \leftarrow F$'in çok küçük bir alt kümesi
        f'nin en iyi özelliğini bölümle
    return Öğrenmiş ağaç
end function

5.4. K-EN YAKIN KOMŞU KENAR

k-En Yakın Komşu (k-NN) algoritması, 1967 yılında Cover ve Hart [124] tarafından önerilmiştir. k-NN, öznitelik uzayındaki en yakın eğitim örneklerine bağlı olarak nesneleri sınıflandıran, en temel örüntü tanıma ve sınıflandırma yöntemlerinden birisidir. Buradaki amaç, "k" değeri kadar en yakın komşunun ait olduğu sınıfına göre yeni örneğin hangi sınıfa ait olacağına karar vermektir. Yeni bir vektörün sınıfını belirlemek için, eğitim verisinden daha önce sınıflandırılmış olan en yakın k-adet örnek seçilir. Buna göre yeni vektör, seçilen örneklerin ait olduğu sınıflara bakılarak çoğunlukta olan sınıf hangisi ise ona atanır. Yeni bir örneğin, sınıflandırılmış olan örneklere göre mesafelerinin hesaplanması için farklı yöntemler (Öklid, Manhattan, Minkowski vb.) vardır. Bunlardan en yaygın olanı ise Öklid uzaklık hesaplama yöntemidir (Eşitlik 5.10).

$$d(i,j)=\sqrt{\sum_{p=1}^{n}\left(X_{ip}-X_{jp}\right)^2} \tag{5.10}$$

Burada n, boyutu temsil etmektedir. i ise sınıflandırılacak olan yeni bir örneğin (X_{jp}), en yakınındaki k komşularını $X_{ip}(i = 1,2,\dots,k)$ ifade etmektedir. Şekil 5.1'de iki boyutlu ($n = 2$) bir uzayda yeni bir X_{jp} örneğinin $k = 3$ değerine göre sınıflandırılma işlemi gösterilmektedir.



Şekil 5.1. Yeni bir örneğin ($k = 3$) değerine göre sınıflandırılması.

Şekil 5.1'deki örnekte; yeni bir örneğin veri setindeki tüm girdilere göre komşuluk mesafeleri belirlendikten sonra k komşuluk durumuna göre hangi sınıfa ait olacağı gösterilmektedir. Sonuç olarak, $k = 3$ değerine göre üçgenlerin sayıca fazla olması nedeniyle yeni örneğin sınıfı da üçgen olarak belirlenmiştir.

5.5. DESTEK VEKTÖR MAKİNELERİ

Destek Vektör Makineleri (DVM), ilk olarak 1963 yılında Vladimir N. Vapnik ve Alexey Y. Chervonenkis tarafından keşfedilmiştir. 1992'de Bernhard E. Boser, Isabelle M. Guyon ve Vladimir V. Vapnik çekirdek düzenlmesini (Kernel tric), maksimum-toleranslı çoklu düzlemlere (hyper-plans) uygulayarak doğrusal olmayan sınıflandırıcılar için yeni bir yöntem önermişlerdir. Verilerin doğrusal olarak ayrılamadığı durumları da (Soft Margin) kapsayan mevcut yöntem, 1993 yılında Corinna Cortes ve Vapnik tarafından önerilmiş ve 1995 yılında yayınlanmıştır.

DVM, yapısal risk minimizasyonu prensibine göre çalışan ve dış bükey optimizasyona dayalı bir makine öğrenme algoritmasıdır [125]. Temel olarak ikili sınıflandırma problemlerini çözmek için tasarlanmıştır. Burada amaç, sınıfları birbirinden optimal olarak ayıracak çoklu düzleminin (hyper-plane) elde edilmesidir. Sınıflandırmada genellikle $\{-1, +1\}$ şeklinde sınıf etiketleri ile temsil edilir. Sınıflandırılacak olan veriler, doğrusal olarak (AND ve OR problemi) ayrılabildiği gibi tek bir doğruyla ayrılamayan (XOR problemi) yapıda da bulunabilir. Bu nedenle DVM, verilerin durumuna göre Doğrusal DVM ve Doğrusal Olmayan DVM olmak üzere iki gruba ayrılır.

DVM, karmaşık veri setlerinde ve çözümlenmesi zor örüntülerin tanımlanmasında etkili bir öğrenme algoritmasıdır. Algoritma, önceden gözlenmemiş verilerin sınıflandırma kestirimi için örneklerden ayırt edebilen bir sınıflandırma öğrenmesini gerçekleştirmektedir. Bilindiği üzere, gerçek dünyada sınıflandırma problemlerinin büyük çoğunluğu ikiden daha fazla sınıftan oluşmaktadır. Bu türden problemlerin çözümü için çok sınıflı bir DVM sınıflandırıcısına ihtiyaç duyulmaktadır. Çoklu sınıflandırma, ikili sınıflandırıcıların birleştirilmesiyle elde edilebilir [126]. DVM sınıflandırıcısı, büyük boyutlu verileri ele alma ve farklı veri kaynaklarını yüksek

doğrulukta modelleme esnekliği nedeniyle biyoinformatikte (ve diğer disiplinlerde) yaygın olarak kullanılmaktadır [127].

Avantajları:

1. Yüksek doğruluk,
2. Karmaşık karar sınırları modelleyebilme,
3. Çok sayıda bağımsız değişkenle çalışabilme,
4. Hem doğrusal olarak ayrılan hem de doğrusal olarak ayrılamayan verilere uygulanabilme,
5. Diğer birçok yönteme kıyasla aşırı uyum (overfitting) sorunun az olması.

Dezavantajları:

1. Olasılıksal tahminler üretememe (VarYok, A sınıfı-B Sınıfı vb.),
2. Çekirdek fonksiyonlar için Mercer Koşulu (Çekirdek fonksiyonları pozitif tanımlı sürekli simetrik fonksiyonlar olmalı) zorunluluğu.

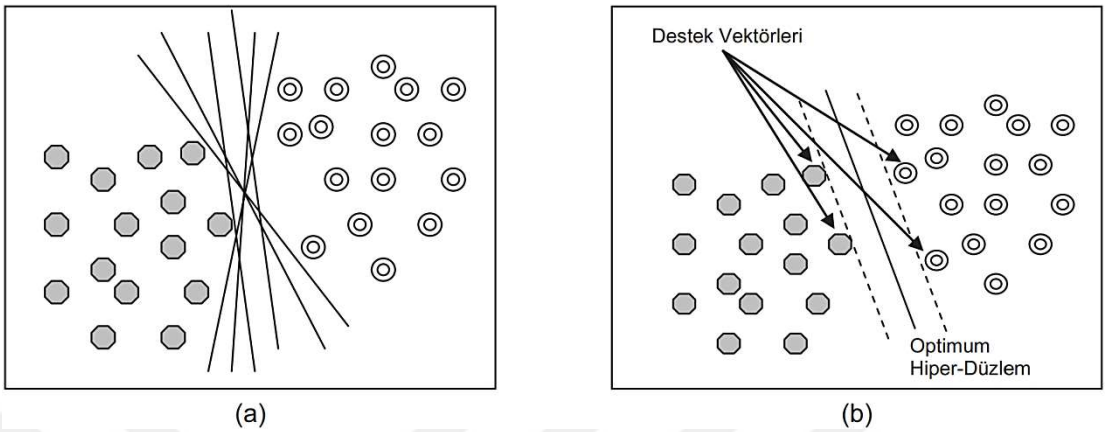
Kullanım Alanları

1. Nesne tanıma (Yüz tanıma, parmak izi tanıma vb.) El yazısı tanıma,
2. Zaman serisi tahmin testleri,
3. Biyoinformatik (Gen ekspresyonu, mikro-dizi verilerin analizi).

5.5.1. Doğrusal Destek Vektör Makineleri

DVM, eğitim veri setinin doğrusal olarak ayrılabilme durumunda, en geniş aralığa sahip ayırma düzlemini (hyper-plane) bulmaya çalışır. Şekil 5.2(a)'da gösterildiği üzere iki sınıflı veri setini birbirinden ayırabilen sonsuz sayıda düzlem çizilebilir. Ancak buradaki amaç, kendisine en yakın veri örnekleri arasındaki mesafeyi maksimuma çıkaran düzlemi bulabilmektir. Bu mesafeye genellikle tolerans denir ve buna karşılık gelen sınıflandırıcı, maksimum tolerans sınıflandırıcısı olarak bilinir. Şekil 5.2(b)'de görüldüğü üzere sınırı maksimuma çıkararak ayrımı yapan düzleme optimal ayırma düzlemi denir [128]. Bu ayırma düzlemi, her iki tolerans sınırına eşit uzaklıkta bulunur. Tolerans sınırları üzerinde bulunan veri örnekleri ise destek

vektörleri olarak adlandırılır. Söz konusu destek vektörleri, ait olduğu sınıfın sınırını belirler ve optimal ayırma düzlemine paralel bir düzlem üzerinde yer alır [129].

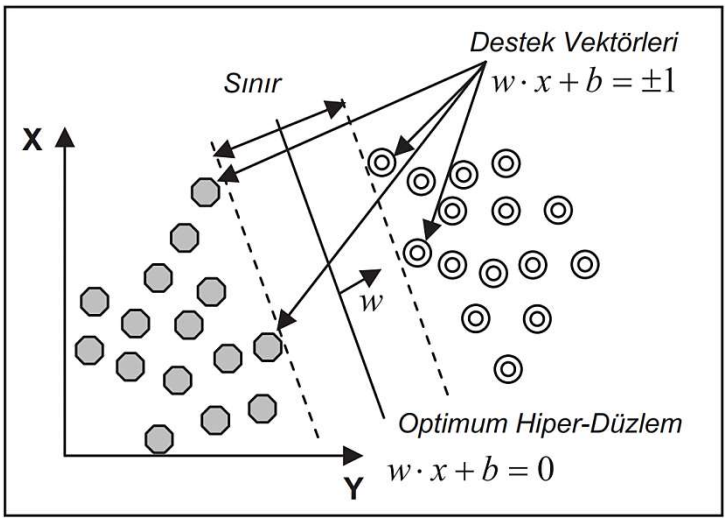


Şekil 5.2. Doğrusal DVM'lerde ayırma düzlemleri; (a) İki sınıflı bir problem için hiper-düzlemler, (b) Optimum hiper-düzlem ve destek vektörleri.

Doğrusal olarak ayrılabilen iki sınıflı bir sınıflandırma probleminde DVM'nin eğitimi için n sayıda örnekten oluşan eğitim verisinin $\{x_i, y_i\}, i = 1,2, \dots, n, y_i \in \{-1, +1\}, x_i \in R^d$ olduğu kabul edilirse, optimal ayırma düzlemine ait karar fonksiyonu Eşitlik 5.11'deki gibi olur:

$$y_i = \begin{cases} w \cdot x_i + b \geq +1, & +1 \\ w \cdot x_i + b \leq -1, & -1 \end{cases} \tag{5.11}$$

Burada R^d, x_i girdi örüntülerinin d boyutlu uzayını, y_i girdilerin $\{-1, +1\}$ olarak sınıflandırılacağı etiketleri, w çoklu düzlemin normalini (ağırlık vektörü), b eğilim değerini (bias) temsil etmektedir. Optimal ayırma düzleminin belirlenebilmesi için bu düzeleme paralel olan sınırların belirlenmesi gerekir. Yani destek vektörlerinin bulunması gerekmektedir. Bu işlem Şekil 5.3'te görüldüğü üzere $w \cdot x_i + b = \pm 1$ şeklinde ifade edilir [128].



Şekil 5.3. Doğrusal olarak ayrılabilen veri setleri.

Tolerans değerinin maksimuma çıkarılması için $\|w\|$ ifadesinin minimum hale getirilmesi gerekir. Bu durumda optimal düzlemin belirlenebilmesi için Eşitlik 5.12'deki gibi sınırlı optimizasyon probleminin çözümlenmesi gerekir.

$$\min\left[\frac{1}{2}\|w\|^2\right] \tag{5.12}$$

Buna bağlı sınırlamalar ise $y_i(w \cdot x_i + b) - 1 \geq 0$ şeklinde ifade edilir. Bu optimizasyon problemi Lagrange denklemleri kullanılarak çözülebilir. Bu işlem sonrasında Eşitlik 5.13'deki gibi;

$$L(w,b,\alpha) = \frac{1}{2}\|w\|^2 - \sum_{i=1}^{k} \alpha_i y_i (w \cdot x_i + b) + \sum_{i=1}^{k} \alpha_i \tag{5.13}$$

eşitliği elde edilir. Sonuç olarak, doğrusal olarak ayrılabilen iki sınıflı bir problem için karar fonksiyonu Eşitlik 5.14'deki gösterildiği şekilde yazılabilir;

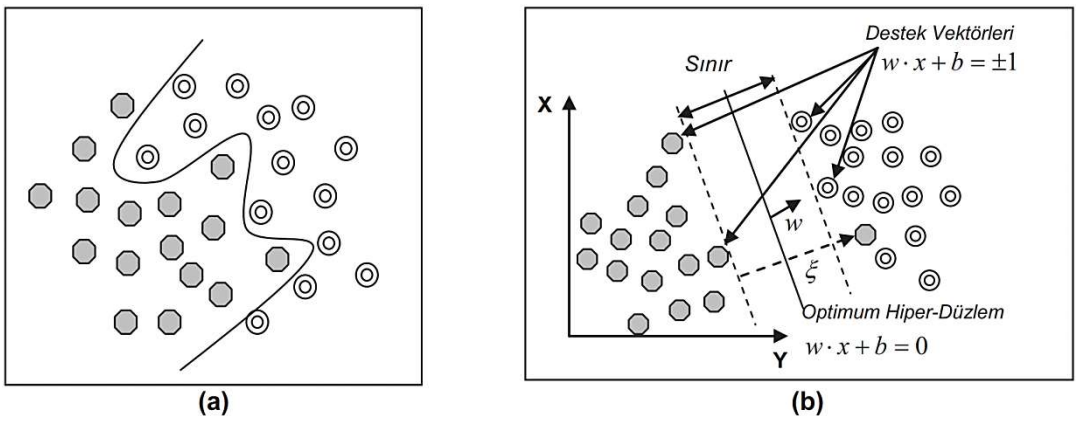
$$f(X) = sign\left(\sum_{i=1}^{k} \lambda_i y_i (X \cdot x_i + b)\right) \tag{5.14}$$

5.5.2. Doğrusal Olmayan Destek Vektör Makineleri

Tıbbi görüntülerin sınıflandırılmasında olduğu gibi diğer birçok görüntü işleme probleminde de Şekil 5.4(a)'da gösterildiği şekilde verilerin doğrusal olarak ayrılması mümkün değildir. Bu durumda, eğitim verilerinin bir kısmının optimum hiper-düzlemin diğer tarafında kalmasından kaynaklanan problem pozitif bir yapay değişkenin (ξ_i) tanımlanması ile Şekil 5.4(b)'de gösterildiği gibi çözülmesi mümkün olur [128]. Sınır değerinin maksimum hale getirilmesi ve yanlış sınıflandırma hatalarının minimum hale getirilmesi arasındaki denge pozitif değerler alan ve C ile gösterilen bir düzenleme parametresi $(0 < C < \infty)$ tanımlanmasıyla kontrol edilebilir [130]. Düzenleme parametresi ve yapay değişken kullanılarak doğrusal olarak ayrım yapılamayan veriler için optimizasyon problemi Eşitlik 5.15'deki gibi:

$$\min\left[\frac{1}{2}\|w\|^2 + C\sum_{i=1}^{r}\xi_i\right] \tag{5.15}$$

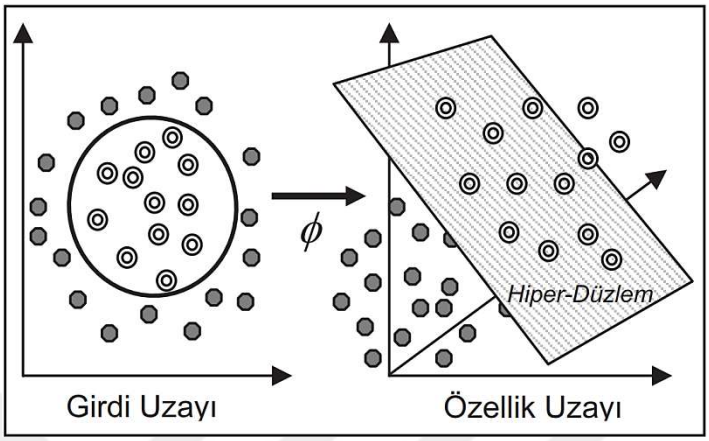
şeklini alır. Buna bağlı sınırlamalar ise $y_i\big((w, x_i) + b\big) - 1 \geq 1 - \xi_i,\ \ \xi_i \geq 0$ şeklinde ifade edilir.



Şekil 5.4. Doğrusal olmayan DVM'lerde ayırma düzlemleri; (a) Doğrusal olarak ayrılamayan veri seti, (b) Doğrusal ayrılamayan veri setleri için ayırma düzleminin belirlenmesi.

Eşitlik 5.15'te ifade edilen optimizasyon probleminin çözümü için Şekil 5.5'te görüleceği üzere girdi uzayında doğrusal olarak ayrılamayan veri, özellik uzayı

olarak tanımlanan yüksek boyutlu bir uzayda görüntülenir [128]. Böylece verilerin doğrusal olarak ayrımı yapılabilmekte ve sınıflar arasındaki hiper-düzlem belirlenebilmektedir.



Şekil 5.5. Çekirdek fonksiyonu kullanarak veri setinin daha büyük bir boyuta dönüştürülmesi.

DVM'leri matematiksel olarak $K(X, x_i) = \varphi(X) \cdot \varphi(x_i)$ şeklinde ifade edilen bir çekirdek fonksiyonu yardımıyla doğrusal olmayan dönüşümler yapılabilmekte ve bu şekilde verilerin yüksek boyutta doğrusal olarak ayrımına imkân sağlamaktadır. Sonuç olarak, çekirdek fonksiyonu kullanarak doğrusal olarak ayrılamayan iki sınıflı bir problemin çözümü ile ilgili karar kuralı Eşitlik 5.16'daki şekilde yazılabilir [131]:

$$f(X) = sign\left(\sum_{i=1}^{k} \alpha_i y_i \varphi(X) \varphi(x_i) + b\right) \tag{5.16}$$

DVM'ler ile gerçekleştirilecek bir sınıflandırma işlemi için kullanılacak çekirdek fonksiyonu ve bu fonksiyona ait optimum parametrelerin belirlenmesi esastır.

5.5.3. Çekirdek Düzenleme ve Fonksiyonları

Denklemler dönüştürülmüş uzayda iki vektörün iç çarpımı biçimindedir. Boyut sorunundan dolayı hesaplanması zordur. Bu sorunu önlemek amacıyla "Çekirdek Düzenlemesi" önerilmiştir. Çekirdek düzenlemesi yapılarak dönüştürülmüş uzaydaki $\Phi(x)$ vektörü yerine girdi uzayındaki verilerden oluşturulan bir çekirdek fonksiyonu

(Çizelge 5.2) ile işlemler yapılır. Orijinal veriyi kullanarak dönüştürülmüş uzayda bir benzerlik hesaplaması yapar.

Çizelge 5.2. DVM'de kullanılan temel çekirdek fonksiyonları ve parametreleri.

Çekirdek Fonksiyonu	Matematiksel ifadesi	Parametre
Lineer Çekirdek	$K(x,y) = xy + c$	
Polinom Kerneli	$K(x,y) = (xy + c)^d$	Polinom derecesi
Radyal Tabanlı Fonksiyon Kerneli	$K(x,y) = e^{-\gamma\|x-x_i\|^2}$	Kernel boyutu
Pearson VII (PUK) Kerneli	$K(x,y) = \frac{1}{\left[1+\left(\frac{2\sqrt{\|x-y\|^2\sqrt{2^{(1/\omega)}-1}}}{\sigma}\right)^2\right]^{\omega}}$	Pearson genişliği parametreleri
Sigmoid Çekirdek	$K(x,y) = \tanh(\alpha x \cdot y - b)$	

Çekirdek fonksiyonuna özgü parametrelerin yanında tüm DVM için düzenleme parametresi C'nin (tolerans) kullanıcı tarafından belirlenmesi gerekir. Bu parametre için olmasa gerekenden çok küçük veya çok büyük değerler seçilmesi durumunda optimum hiper-düzlem doğru belirlenemeyeceğinden, sınıflandırma doğruluğunda ciddi düşüş beklenmektedir.

5.5.4. Çok Sınıflı Destek Vektör Makineleri

DVM'de, ikiden fazla sınıf olması durumunda, ele alınan problemin çözümü için üç farklı yaklaşımdan birisi izlenir:

1. Problemin ikili gruplara indirgenmesi (bire bir, one-to-one)
2. Problemin tek gruptan bütün gruplara modellenmesi (bire çok, one-to-many)
3. Çok sınıf sıralama DVM (Multiclass Ranking SVM)

Bu yaklaşımlardan en çok kullanılan "bire bir" yöntemine göre; örneğin bir girdinin A, B ve C olmak üzere üç sınıftan hangisine gireceği bulunmak istenirse; bu sınıflar öncelikle ikili gruplar halinde eğitirsek sınıfların birbirine göre çarpanları çıkartılır. Çoklu sınıflandırmada kullanılan bire çok yaklaşımına (one-to-many) göre de

problem “kazanan hepsini alır” (Winner takes all) haline dönüşmektedir. Bu yaklaşımda yeni gelen bir girdinin sınıflandırılacağı alternatiflerden birisi diğerine göre baskın olmakta ve sonuçta bu sınıf seçilmektedir. Ancak bu yaklaşım bir önceki yaklaşıma göre daha az tercih edilmektedir. Son olarak, çoklu sınıf sıralama (multiclass ranking) yaklaşımına göre sınıflar üzerinden bir DVM çalışarak, bu sınıfların bütün üyelerini içeren bir sınıflandırma yapmaya çalışır. Ancak bu yaklaşım diğer iki yaklaşımdan daha az tercih edilir olmasında bu yaklaşımda eğitim süresinin diğerlerine göre inanılmaz oranda yüksek olması ve sonucun bulunamama ihtimali önemli rol oynar.

5.6. NAIVE BAYES

Naive Bayes (NB) Sınıflandırıcısı, Bayes teoremine (Thomas Bayes, 1702-1761) dayanan basit bir olasılıksal sınıflandırma yöntemidir. Bayes teoreminde (BT), birbirinden bağımsız olan ve rastgele iki olayın (X ve Y) arka arkaya gerçekleştiği durumlarda, bu iki olaydan birinin gerçekleşmesi durumunda ikinci olayın gerçekleşme olasılığı $P(X \cap Y)$ ifadesi ile gösterilebilir. Değişme özelliği sayesinde Eşitlik 5.17’deki gibi çarpım kuralı iki farklı ifade ile yazılabilir;

$$P\left(X \cap Y\right) = P\left(X \middle| Y\right) P\left(Y\right) = P\left(Y \middle| X\right) P\left(X\right) \tag{5.17}$$

Bayes teoremi, rassal bir sürece bağlı olarak ortaya çıkan rasgele bir X olayı ile diğer bir rasgele Y olayı için koşullu olasılıklar ve marjinal olasılıklar arasındaki ilişkiyi tanımlar (Eşitlik 5.18).

$$P\left(Y \middle| X\right) = \frac{P\left(X \middle| Y\right) P\left(Y\right)}{P\left(X\right)} \tag{5.18}$$

Herhangi bir problemde gerçekleşmesi muhtemel bağımlı durumların olasılıkları yukarıda verilen Bayes eşitliği ile hesaplanır. Bu eşitlikte $P(X)$ ifadesi problemin girdi olasılığını, $P(Y)$ ifadesi olası çıkış durumunun olasılığını ve $P(Y\ |X)$ ifadesi ise daha önce gerçekleşen X girişine karşın Y çıkışı durumlarının olasılığını temsil

etmektedir [132]. NB sınıflandırma tekniğinde, her bir ilişkiden koşullu bir olasılık oluşturmak için bağımlı ve bağımsız özellikler arasındaki ilişkiyi analiz eder. Yeni bir örneği sınıflandırmak için bağımlı değişken üzerinde bağımsız değişkenlerin etkilerini birleştirerek bir tahmin yapılır [133]. Bu yöntemde sınıflandırma işlemi için; ilk aşamada, muhtemel çıkış durumları içerisindeki en büyük olasılığa sahip olan durum y_{MPH} (maximum a posteriori hypothesis) olarak belirlenir.

$$y_{MPH} = \underset{y_j \in Y}{\arg\max}\, P\left(Y = y_j \mid X\right) \tag{5.19}$$

Burada, y_j muhtemel j. çıkış durumunu ve X değişkeni ise sınıf ataması yapılacak olan giriş örneğini ifade etmektedir. BT kullanılarak Eşitlik 5.19'daki denklem şöyle yazılabilir:

$$y_{MPH} = \underset{y_j \in Y}{\arg\max} \frac{P\left(y_j \mid x_1, x_2, ..., x_n\right) P\left(y_j\right)}{P\left(x_1, x_2, ..., x_n\right)} \tag{5.20}$$

$$y_{MPH} = \underset{y_j \in Y}{\arg\max}\, P\left(x_1, x_2, ..., x_n \mid y_j\right) P\left(y_j\right) \tag{5.21}$$

Eğitim verisine dayanarak Eşitlik 5.19'daki iki terim hesaplanır. Her $P(y_j)$ değeri, eğitim verisinde geçen, her hedef değer y_j'nin frekansı sayılarak kolaylıkla hesaplanabilmektedir. Bu terimlerin sayısının muhtemel örnekler ile hedef değerleri çarpımına eşit olması probleme neden olabilir. Bu nedenle, daha reel değerler elde edebilmek için her bir örneğin, örnek uzayında defalarca gösterilmesi gerekir. Naive Bayes sınıflandırıcısı, özellik değerlerinin hedef değerden bağımsız olması kabulüne dayanır. Bir başka deyişle, $(x_1, x_2, \dots, x_n)$ bağlamının olasılığı, herbir özelliğe ait olasılıklarının çıktısıdır [134].

Giriş örneğinin birden çok özelliğe sahip olması durumda, Bayes formülü farklı bir biçime dönüşecektir. Birçok niteliğin kesişimi görünümündeki veri örneği için hedef sınıf tahmininde tüm özellikler için Eşitlik 5.22'deki gibi koşullu olasılıkların çarpımı hesaplanmalıdır.

$$P\left(x_1, x_2, ..., x_n \mid y_j\right) = \prod_{i=1}^{n} P\left(x_i \mid y_j\right) \tag{5.22}$$

Burada, $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ giriş örneği olup n adet özellikten oluşmaktadır. NB sınıflandırıcı ile BT hesaplamalarında dikkat edilmesi gereken en önemli farklılık, sınıflandırıcının olasılık değerinden daha çok "hedef sınıfı" bulmaya odaklanmış olmasıdır. BT'de paydada bulunan değer, tüm hedef durumların olasılık hesaplarında ortak olduğundan NB sınıflandırıcıda ihmal edilir. Bu durumda çok özelliğe sahip girişlerde NB formülü Eşitlik 5.23'deki gibi olur.

$$y_{NB} = \arg\max_{y_j \in Y} P\left(y_j\right) \prod_{i=1}^{n} P\left(x_i \mid y_j\right) \tag{5.23}$$

Burada y_{NB}, NB sınıflandırıcısının çıktısını, yani sınıfını temsil eder. Kısaca, NB sınıflandırma yöntemi, çeşitli $P(y_j)$ ve $P(x_i|y_j)$ terimlerinin eğitim verisi üzerindeki frekanslarına dayanarak hesaplandığı bir öğrenme sürecidir [134].

5.7. MULTINOMIAL LOJİSTİK REGRESYON

Regresyon analizi, aralarında sebep-sonuç ilişkisi bulunan iki veya daha fazla değişken arasındaki ilişkiyi belirlemek ve bu ilişkiyi kullanarak, konu ile ilgili tahminler ya da kestirimler yapabilmek amacıyla kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu yöntemde iki veya daha fazla değişken arasındaki ilişki açıklamak için matematiksel bir model kullanılır ve bu model "Regresyon Modeli" olarak adlandırılır.

Bağımlı değişkenin normal dağılım gösterdiği ve sürekli bir değişken olduğu durumlarda "Doğrusal Regresyon (DR)" analizi kullanılabilir. Bağımlı değişkenin kategorik olması durumunda "Lojistik Regresyon (LR)" ve "Multinomial Lojistik Regresyon (MLR)" analizi tercih edilen yöntemlerdir [135-137]. LR, iki bağımlı değişken için tasarlanmış doğrusal olmayan bir regresyon modelidir. LR, literatürde "Logit Regresyon" olarakta adlandırılmaktadır [138]. MLR ise bağımlı değişkenin en az üç veya daha fazla kategori içerdiği [139] ve değerlerinin sınıflayıcı ölçekle elde

edildiği durumlarda, bağımlı değişken (Y) ile bağımsız değişkenler (X) arasındaki neden sonuç ilişkilerini açıklamak için kullanılmaktadır [136,137,140]. Bu analizde amaç, kategorik olarak bağımlı değişkenlerin değerini tahmin etmek olduğundan, aslında burada yapılmaya çalışılan iki veya daha fazla kategoriye ilişkin "üyelik" tahminidir. Buna göre, amaçlarından birinin sınıflandırma, diğerinin ise bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkileri araştırmak olduğu ifade edilebilir [141]. Bir diğer ifade ile, gözlemleri ait oldukları sınıflara en doğru şekilde atayacak ve gözlemlere ilişkin yapıları ve risk faktörlerini belirleyebilecek modeli kurmayı amaçlamaktadır [142].

LR'de, bir p olayının olma olasılığının kendi dışında kalan diğer olayların olma olasılıklarının oranına "odds" ya da "üstünlük" değeri denilmektedir (Eşitlik 5.24) ve bu oran, LR modelinin doğrusallaştırılması esnasında dönüşümü kolaylaştırıcı bir işlev vazifesi görmektedir.

$$Odds = \frac{p}{1-p} = \frac{\pi(x)}{1-\pi(x)} \tag{5.24}$$

LR modeli, genel doğrusal modellerin binom dağılımlı olarak bağımlı değişkenler için elde edilmiş olan özel bir biçimidir ve Eşitlik 5.25'deki gibi ifade edilir;

$$\pi(x) = \frac{\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots + \beta_p x_p}{1 + e^{\alpha + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots + \beta_p x_p}} \tag{5.25}$$

Burada, $\pi(x)$ incelenen bir olayın görülme olasılığını, α bağımlı değişken sabitini, $\beta_1, \beta_2, \ldots, \beta_p$ bağımsız değişkenlerin regresyon katsayılarını, $x_1, x_2, \ldots, x_p$ bağımsız değişkenleri, p bağımsız değişken sayısını ve e hata terimini temsil etmektedir.

MLR modeli, Eşitlik 5.26'da gösterildiği şekilde, iki durumlu olan LR modelinin genişletilmiş biçimidir.

$$\pi_j\left(x_i\right)=\frac{e^{\alpha_i+\beta_{1j}x_{1i}+\beta_{2j}x_{2i}+\ldots+\beta_{pj}x_p}}{1+\sum_{j=1}^{k-1}e^{\alpha_i+\beta_{1j}x_{1i}+\beta_{2j}x_{2i}+\ldots+\beta_{pj}x_p}} \tag{5.26}$$

Burada, $j_1, j_2, \ldots, j_k$ olmak üzere k adet kategoriyi, $i_1, i_2, \ldots, i_n$ olmak üzere n adet olası bağımsız değişken seviyelerini temsil etmektedir.

Lojistik regresyon analizinin özellikle son 20 yıldır askeri konularda, meteorolojide, iç göç hareketlerinde ve eğitim alanında kullanımının arttığı görülmektedir. Bu artışın en önemli sebeplerinden birisi, istatistik ile ilgili paket programlarının kullanımının yaygınlaşmış olmasıdır. Ancak yine de daha yaygın kullanıldığı alanlardan birinin tıp olduğu görülmektedir [141]. Lojistik modelin biyolojik deneylerin analizi için kullanımı ilk olarak Berkson (1944) tarafından önerilmiş, Cox (1970) bu modeli gözden geçirerek çeşitli uygulamalarını yapmıştır [143].

BÖLÜM 6

MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLEME SİSTEMİ

6.1. MİKROSKOBUN TARİHSEL GELİŞİMİ

17. yüzyılda mikroskobu ilk kullananlar Anton von Leeuwenhoek, Jan Swammerdam, Marcello Malpighi, Nehemiah Grew ve Robert Hooke olmuştur. Hooke Micrographia ile ilk mikroskobi kitabını yayınlamıştır. Bu kitapta ilk defa "hücre" terimi ölü mantar hücreleri için kullanmıştır. Mikroskobun gelişimi ve kullanımı konusunda Leeuwenhoek'un yeri ise ayrıdır. Geliştirdiği tek mercekli mikroskop ile 270X büyütme gücü elde etmiştir. Bu mikroskopların sayısal açıklıklıklarının $NA = 0{,}4$ olduğunu vurgulamak gerekir ve bu da 1,5μ'luk bir ayrıntı anlamına gelir. Geliştirdiği mikroskopların göreceli olarak küçük olması, Şekil 6.1'de görüldüğü gibi göze yakın tutulması gerektiği ve incelenecek olan örneğin merceğe çok yakın şekilde tutturulması gibi olumsuz durumlar kullanımının zorluğuna yol açmaktadır [144].

Şekil 6.1. Anton von Leeuwenhoek'un geliştirdiği mikroskop.

Leeuwenhoek'un daha iyi mikroskoplar geliştirdiği ve hatta modern mikroskop kalitesinde görüntü elde edilebilen seviyeye ulaştığı da iddia edilmektedir. Bu mikroskoplarının en önemli özelliği ise kromatik sapmalarının çok küçük olmasıdır.

Leeuwenhoek incelemelerinde Malpighi'nin bulgularını doğrulamış, eritrositleri tanımlamış, hücre çekirdeği ve spermatozoitleri gözlemlemiştir. Bakteriler üzerine ilk gözlem de yine Leeuwenhoek'a aittir. Bunun için karanlık alan mikroskobi tekniğini kullandığı düşünülmektedir. Leeuwenhoek'un tekniğini kullanan ve devam ettiren olmadığı için mikroskobide gelişmeler, akromatik bileşik mikroskobun bulunacağı 1830'lardan sonra olabilmiştir [145].

Hücrenin tanımlanmasından sonra 1700'lerin son çeyreğinde Marie Francois Xavier Bichat önderliğinde dokular ve organlar tanımlanmıştır. Joseph Lister, 1827 yılında kromatik ve sferik sapmayı düzelterek kompozit mikroskobun gelişimine önemli katkı sağlamıştır. 1830'lu yıllarda Ernst Abbe ve Carl Zeiss'ın çalışmaları ile Amici ve Chevalier, akromatik lensleri geliştirdiler ve aynı zamanda akromatik mikroskoplarda fiziki sınır olan 0,5μ'luk diskriminasyon sınırına ulaştırdılar. Histopatolojinin doğuşu, Johannes Müller'in 1838 yılında yazdığı "On the Nature and Structure Characteristics of Cancer" isimli ilk histopatoloji kitabı olarak kabul edilebilir.

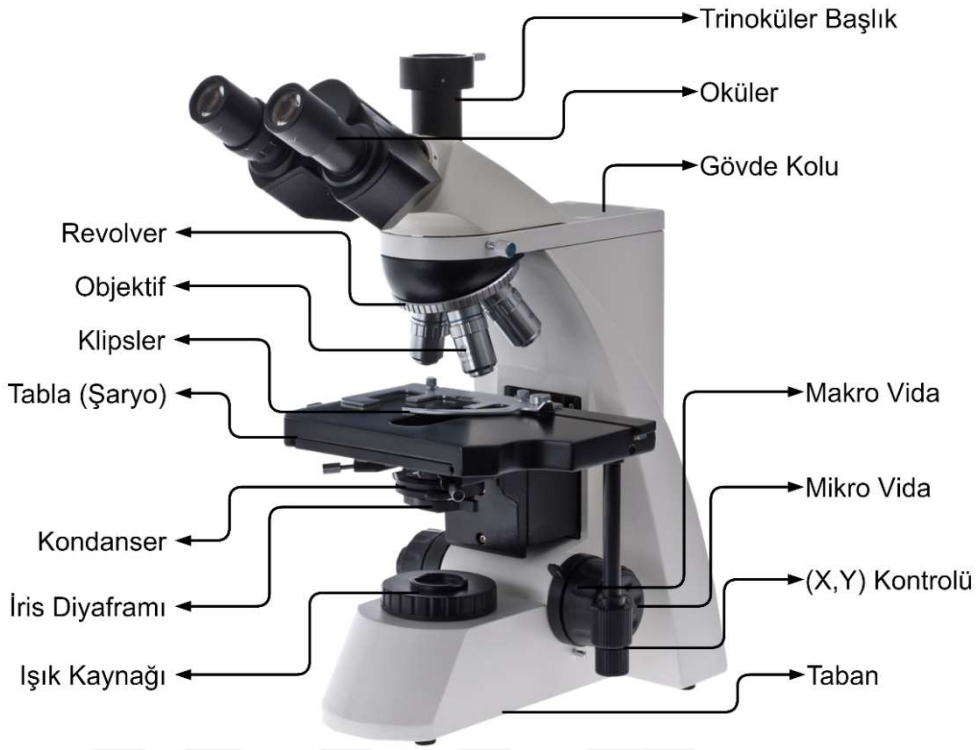
6.2. IŞIK MİKROSKOBU

Işık mikroskobu, görünür ışık ve mercek sistemlerini kullanarak, çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük cisimlerin görüntülerini büyüterek incelenmesini sağlayan karmaşık bir sistemdir ve literatürde optik mikroskop olarakta bilinir.

Bir insan gözü 0,1 mm'lik cisimleri çözümleyebilirken, ışık mikroskobu 1000X büyütme ile 200 nm'ye kadar olan cisimleri çözümleyebilmektedir [146]. Bu mikroskoplar genelde laboratuvar ortamlarında çeşitli amaçlar için kullanılırlar ve büyütme kapasiteleri 40X-3000X arasındadır.

6.2.1. Mikroskop Bileşenleri

Işık mikroskopları; mekanik, optik ve aydınlatma olmak üzere üç kısımdan oluşur. Şekil 6.2'de trinoküler bir ışık mikroskobunun bileşenleri gösterilmektedir.



Şekil 6.2. Trinoküler ışık mikroskobunun bileşenleri.

6.2.1.1. Mekanik Bileşenler

Ana kaidesi dayanıklı metalden yapılmış olup, tüp, gövde kolu, makro ve mikro hareket vidaları, tabla ve taban bileşenlerinden meydana gelir. Ayrıca aydınlatma ve optik kısımlarının da taşıyıcısıdır.

Mikroskop Tüpü: Genellikle iç içe geçebilen iki tüpten oluşur. Üst ucunda oküler ve/veya trinoküler, alt ucunda ise revolver ve buna bağlanan objektifler bulunur. Mikroskop tüplerinin toplam uzunluğu genellikle 160 mm'dir.

Göve Kolu: Mikroskopları tutmaya ve kaldırmaya yarayan kol yarım ay veya düz bir şekilde olabilir. Bunun üst ucu tüpün gövdesine alt ucu da mikroskop tablasına bağlanmıştır. Aynı zamanda makro ve mikro vidaları da kol üzerinde bulunurlar.

Tabla (Şaryo): Mikroskop tablası, yuvarlak veya dört köşe olup üzerine incelenecek olan nesne konulur. Bazılarında tabla, yanlardaki kontrol düğmeleri tarafından

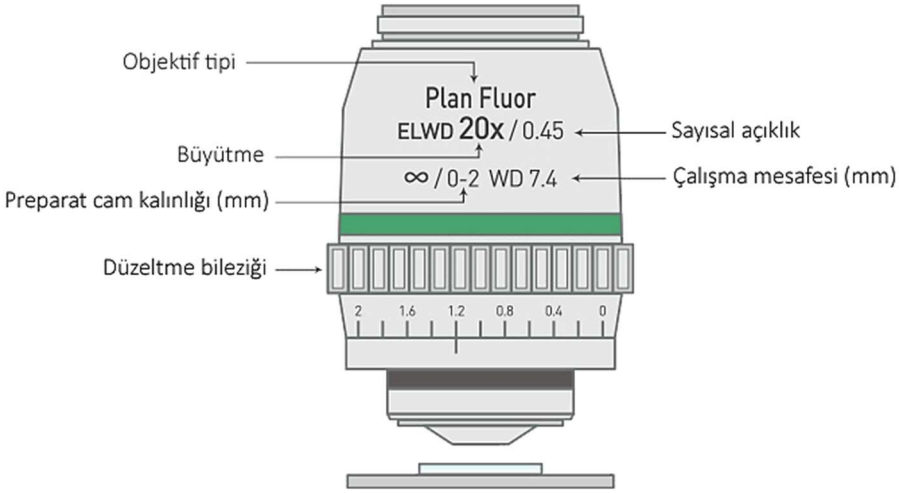
hareket ettirilmesine karşın bir kısmında da sabit olup, nesneyi hareket ettirmek için özel sürgü (şaryo) tertibatı bulunur.

Taban: Mikroskobun üzerine oturtulduğu, at nalı, oval veya düz şekillerdeki ağır bir ayak mekanizmasıdır. Bazı ışık mikroskoplarında taban sistemi içerisinde aydınlatma ve ayna tertibatı bulunabilmektedir.

6.2.1.2. Optik Bileşenler

Tabla üzerinde bulunan cisimlerin uygun bir şekilde aydınlatılmasını sağlayan ve incelenen cismin istenilen oranda büyütülmüş görüntüsünü okülere yansıtan kısımdır. Bu kısım, objektif ve oküler parçalarından meydana gelir. Bunlar birer mercek sisteminden yapılmış olup, mikroskobun en kıymetli parçalarıdır.

Objektif: Optik kısmın nesneye en yakın bölümünü oluşturan objektifler, mikroskop tüpünün altına yerleştirilmiş ve orta eksen etrafında dönebilen bir tablaya (revolver) vidalanmışlardır [147]. Şekil 6.3'de 20X büyütme kudretine sahip bir objektif gösterilmektedir.



Şekil 6.3. Objektif.

Üzerlerinde büyütme oranlarını bildiren, 10x, 20x, 40x, 90x veya 100x gibi rakamlar, objektifin numerik (sayısal) açıklığını (NA) ifade eden 0,30, 0,75, 1,00 ve 1,25 gibi

sayılar, mm cinsinden çalışma mesafesi ve preparat cam kalınlığı gibi ifadeler bulunur. Objektiflerin amaçları, incelenen cismin herhangi bir yerinden gelen ışınları birleştirmek, bu ışınları odak noktasında toplamak ve odak noktasında oluşan görüntüyü büyütmektir.

Mikroskop üreticileri, büyütme ve immersiyon ortamlarına göre objektiflerin üzerine çeşitli renklerde işaretleme yaparak daha hızlı tanımlanmasını ya da sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Şekil 6.4'de objektif büyütme kudretine göre yaygın olarak kullanılan renk kodları verilmiştir.

Büyütme	Renk Kodu
4x	Kırmızı
10x	Sarı
20x	Yeşil
40x	Açık Mavi
60x	Kobalt Mavisi
100x	Beyaz

Şekil 6.4. Objektif büyütme kudretine göre renk kodları.

Oküler: Optik kısmın gözle bakılan ve tüpün üst kısmına konulan parçasını oluşturur. Okülerde de büyütmelerine göre numaralar (5x, 7x, 10x, 15x, 20x, 25x) bulunur. Okülerlerin görevi objektif tarafından oluşturulan obje imajını büyütmek ve objektifin bazı hatalarını düzeltmektir. Bu amaçları kapsamak üzere çeşitli türde (huygenian, hiperplane ve düzeltici oküler) okülerler imal edilmiştir. Okülerler genellikle iki ve bazen üç mercekten oluşurlar.

Nümerik Açıklık: Bir mikroskobun sayısal açıklığı, bunun resolusyon kuvvetinin bir ölçüsünü ifade eder. Bu açıklık ne kadar fazla olursa resolusyon kudreti de (birbirine çok yakın iki noktayı ayırma kabiliyeti) o kadar fazla olur ve obje ince ayrıntısına kadar görülebilir. Sayısal açıklık, bir merceğin çapının kendi odak uzaklığına olan oranı olarak ta tanımlanabilir ve $NA = n \times \sin U$ matematiksel formülle ifade edilir. Bu formülde n, cisim ile objektif arasındaki ortamın kırılma indisi (refraksiyon), U,

objenin orta noktasından çıkarak göze kadar gelen ekstrem ışınların arasındaki açının yarısıdır. NA, büyüdükçe birbirine çok yakın iki cismi ayırma kabiliyeti de artar.

6.2.1.3. Aydınlatma Bileşenleri

Lam/lamel üzerine konulan nesneyi aydınlatmak için ışık kaynağı, bu ışığı cisim üzerine doğru yansıtan veya yönlendiren ayna ve ışığı üzerinde toplayan kondansör ve açma/kapatma düğmesinden oluşur.

Işık Kaynağı: Mikroskoplarda objeyi aydınlatmak için, genellikle elektrikle çalışan, mikroskobun dışında bulunan veya mikroskobun içine monte edilen ışık kaynakları kullanılmaktadır. Bu ışık kaynakları yeterince ışık verirler ve bazıları da ışığı ayarlamak için de özel diyaframlara sahiptirler. Işık kaynağının bulunmadığı durumlarda güneş ışığından da yararlanılır.

Ayna: Mikroskop üzerine monte edilmiş bir yüzü konkav ve diğer yüzü düz olan aynalar, ışık kaynağından gelen ışınları kondansatöre ve dolayısıyla obje üzerine yansıtırlar. Konkav yüz daha fazla ışın topladığından immersiyon objektifleriyle çalışmalarda bu yüz kullanılır. Bazı araştırma mikroskoplarında ışık kaynağı tam kondansatörün altına monte edilmiştir. Bazılarında da ayna, mikroskop içinde bulunur.

Filtre: Kondansatörün altında bulunan özel ve halka şeklindeki yere ışık kaynağından gelen ışınları süzen, mavi, yeşil veya mat filtreler konarak iyi görüntü sağlanmaya çalışılır.

İris Diyaframı: Işık kaynağından gelen ışık demetinin çapını kontrol etmek için kullanılır. Işık kaynağının üstünde ya da kondenserin altında yerleşiktir. Işığın şiddetini azaltmak için değil, en iyi kontrast ve rezolüsyon elde edilecek ışık çapını ayarlamak için kullanılır. İmmersiyonla çalışmalarda genellikle diyafram tam açılarak içeri fazla ışık girmesi ve objenin aydınlatılması sağlanır. Buna karşılık, hareket muayenelerinde ise iyi bir kontrast sağlanması için, diyafram gereği kadar kapatılır.

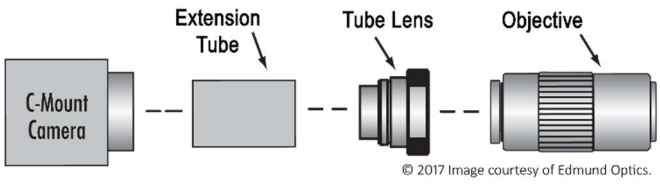
Kondanser: Bir mikroskopta kondenserin esas görevi, ışığı incelenecek cisim üzerinde toplamak ve gerektiği kadar aydınlatmaktır. Genellikle iki mercekten oluşan kondenserler, bir düğme ile aşağı yukarı iner çıkar ve ışığın iyi odaklanmasını sağlarlar. Akromatik türdeki kondenserlerde 5-6 tane mercek bulunur.

6.3. MİKROSKOP BÜYÜTMESİ

Bir mikroskobun toplam büyütmesi, objektif lensi ile göz merceğine ait büyütme kudretlerinin çarpımına eşittir. Örneğin, 10X oküler ve 100X objektifli bir ışık mikroskobu 1000X büyütme sağlar. Objektifin büyütmesi şu şekilde hesaplanır (Eşitlik 6.1);

$$M_{obj} = \frac{L_{tube}}{F_{obj}} \tag{6.1}$$

Burada L_{tube}, optik tüp uzunluğunu, F_{obj} ise objektifin odak uzaklığını temsil etmektedir. Dijital mikroskop sistemlerinde ise Şekil 6.5'te görüldüğü üzere, dijital bir kamera, genişletme tüpü, tüp lensi ve objektif bileşenlerinden meydana gelir. Bu sisteminin toplam büyütmesi ise; kamera genişletme tüpü lensi ile objektif lensinin büyütme kudretiyle çarpılarak hesaplanır.



Şekil 6.5. Dijital mikroskop sistemi.

Dijital mikroskop sistemlerinde kameradan elde edilen görüntüler, geliştirilen bir arayüz uygulaması ile bilgisayar monitörüne yansıtılabilir. Monitördeki bu görünür alanın toplam büyütme değeri şu şekilde hesaplanır (Eşitlik 6.2);

$$M_{total} = M_{obj} \times M_{tube} \times \frac{D_{monitor}}{D_{sensor}} \tag{6.2}$$

Burada M_{obj}, objektif büyütme kudretini, M_{tube}, genişletme tüpü lensinin büyütme gücü, $D_{monitor}$, milimetre cinsinden monitörün diyagonalini ve D_{sensor} ise yine milimetre cinsinden kamera sensörünün diyagonalini ifade etmektedir. Kameradan resim olarak kaydedilen görünür alanın gerçek boyutu, Çizelge 2.1'de verilen hücre çaplarının karşılaştırılması açısından önemlidir. Gerçek boyut hesaplaması ise şu şekilde yapılır (Eşitlik 6.3);

$$R_{width} = \frac{M_{obj} \times M_{tube}}{S_{width}}, \; R_{height} = \frac{M_{obj} \times M_{tube}}{S_{height}} \tag{6.3}$$

Burada S_{widt} ve S_{heigh} , kamera sensörüne ait mikrometre cinsinden genişlik ve yükseklik değerlerini ifade etmektedir. Böylece segmente edilen her bir kan hücresinin gerçek çapı yaklaşık olarak bulunabilir.

6.4. GELİŞTİRİLEN PROTOTİPLER

Bu çalışma; mekanik mikroskop sistemi, elektronik kontrol, kan hücrelerinin segmentasyonu ve sistemin uzaktan kontrolü olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

Motorize mikroskop sistemi için X, Y ve Z eksenlerinde hareket edebilen mekanik bir şaryo sistemi modellenerek, tasarım ve montajı yapılacaktır. Daha sonra, bu mekanik düzeneğe ait her bir eksen için bilgisayar üzerinden kontrol edilebilen step motor bağlantıları ve sürücü devre tasarımları gerçekleştirilecektir. Çalışmanın üçüncü aşamasında kan hücrelerinin segmentasyonu, sınıflandırılması ve sayımı yapılacaktır. Dördüncü ve son aşamada ise uzaktan kontrolü için gerekli olan alt yapı ve web ara yüzü geliştirilecektir. Aşağıda yapılacak işlem adımları maddeler halinde verilmiştir.

1. Mekanik Katman
   a. Işık mikroskobu için mekanik şaryo düzeneğinin 3B tasarımı.
   b. Tasarlanan sistemin montajı.

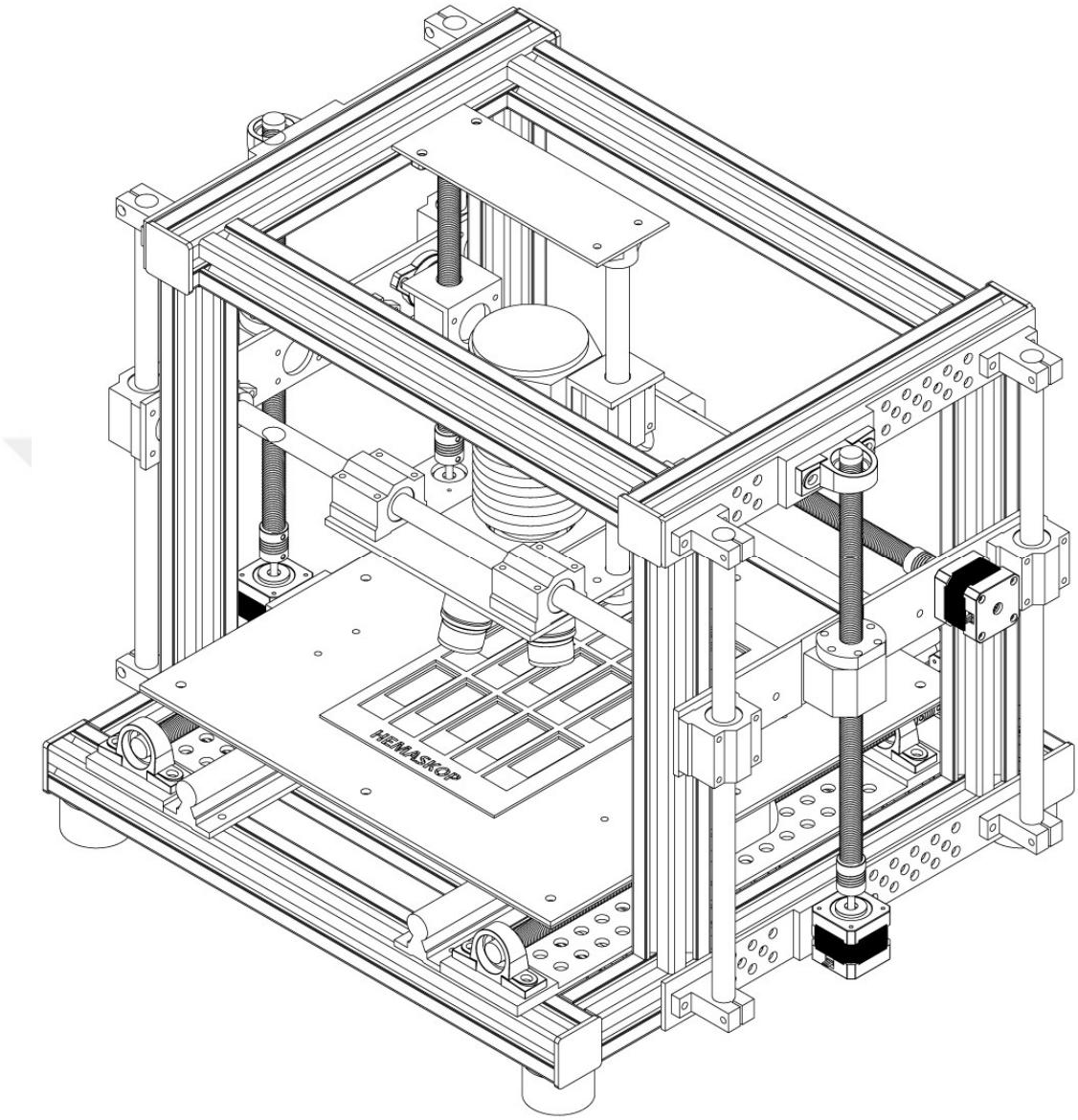
2. Elektronik Katman
   a. Montajı tamamlanan mekanik düzeneğin X, Y ve Z ekseninde hareket kabiliyetini otomatik olarak sağlayan step motorların, durdurma mandallarının (End-stop switch) ve kontrol/sürücü kartlarının montajı ve elektronik devre bağlantıları.
   b. Sistemin bilgisayarlı kontrolü (seri haberleşme, motor kontrol) için kontrol kartında koşturulacak gömülü kodun geliştirilmesi.
3. Yazılım Katmanı (Segmentasyon ve Uzaktan kontrol)
   a. Temel görüntü işleme sınıflarının kodlanması.
   b. Tez konusuna ilişkin spesifik tıbbi görüntü işleme fonksiyonlarının geliştirilmesi
   c. Otomatik olarak taranan periferik kan yayma görüntülerinin veri tabanında saklanabilmesi için gerekli alt yapı çalışmasının yapılması.
   d. Sistem üzerinden gerçek zamanlı görüntü alarak çalışabilen, kan hücrelerinin segmentasyon ve sayım işlemlerini yapabilen yazılım alt yapısının hazırlanması ve testleri.
   e. Geliştirilen sistemin uzaktan erişimi ve kontrolü için gerekli olan yazılım alt yapısının oluşturulması

6.4.1. Prototip I

Sistemin üç boyutlu (3D) çizimi SolidWorks ile hazırlan elektromekanik mikroskop sistemi (Şekil 6.6), X, Y ve Z eksenlerinde hareket kabiliyetini sağlamada vidalı mil ve bunlara bağlı step motorlar bulunmaktadır. Tüm mekanik sistem Arduino kart ile kontrol edilmektedir.

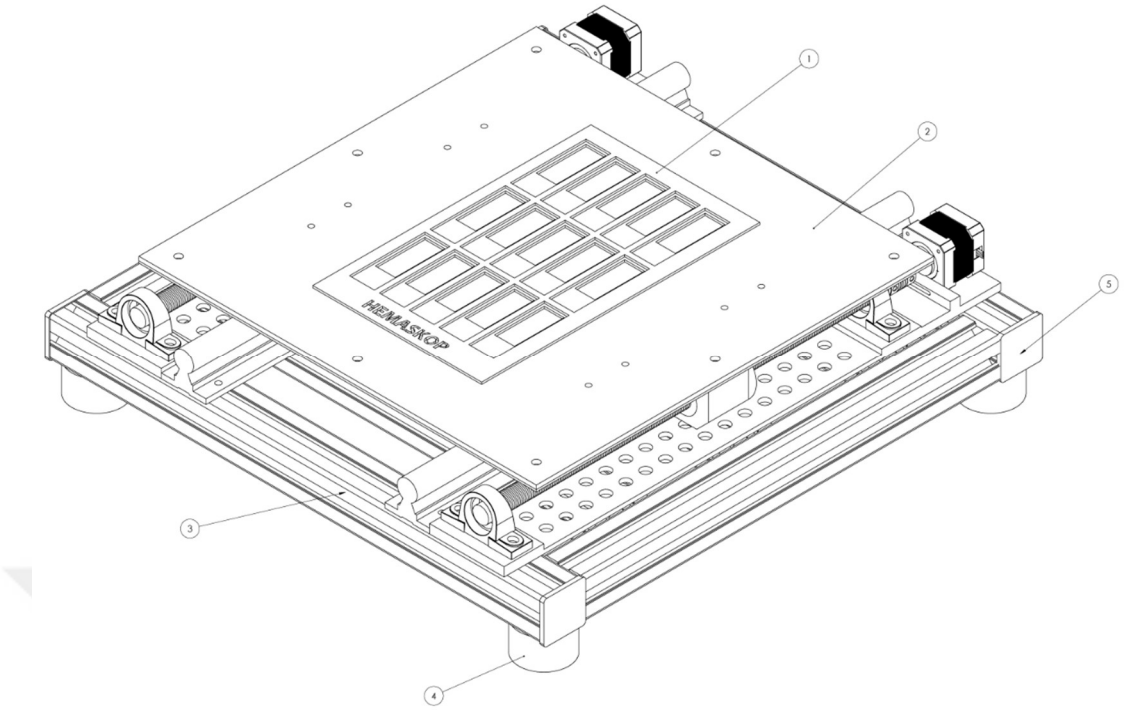
Periferik kan yayma preparatları X-Ekseni üzerinde 15 çerçeveli bölgeye yerleştirilmesi planlanmıştır. Y-Ekseni üzerinde ise Z-Ekseni yönünde hareket kabiliyeti olan 16.0 MP dijital kamera ve buna bağlı mikroskop objektifleri revolver ile sabitlenmiştir. Optik sisteminin odaklaması için otomatik kontrol edilebilir körüklü dikey mil sistemi tasarlanmıştır.

6.4.1.1. Tasarım



Şekil 6.6. Sistemin izometrik görünümü.

Şekil 6.7'de X ekseni mekanizmasının dış görüntüsü yer almaktadır. 15 hücreli preparat tablası en üst katmana montajı yapılmıştır. Bu mekanizmaya ait detaylı parça ve malzeme listesi Çizelge 6.1'de verilmiştir.

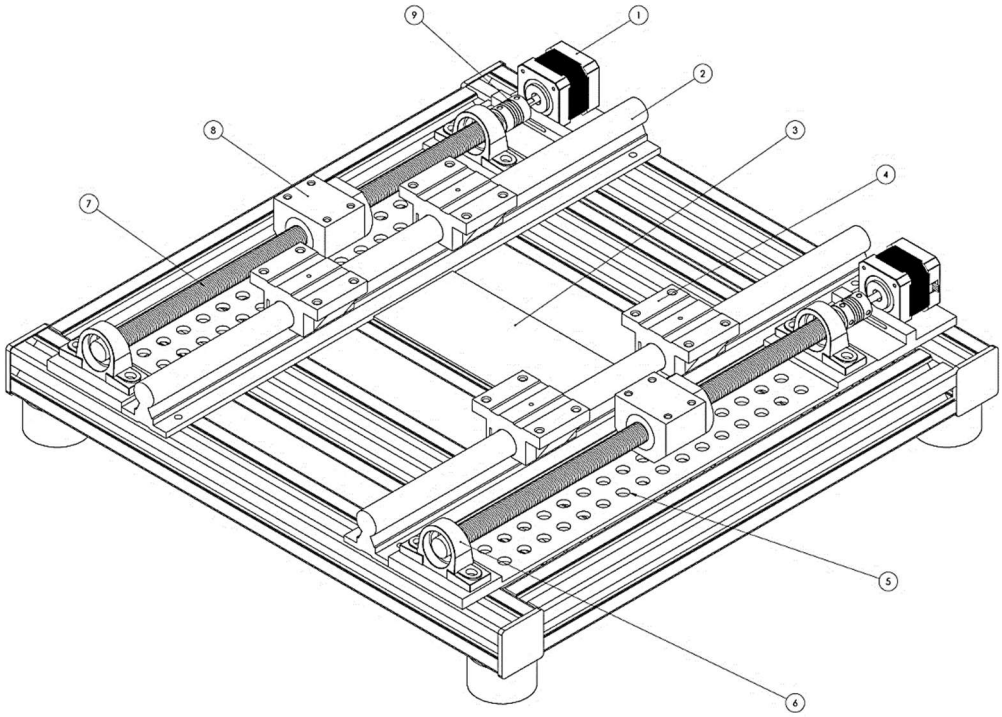


Şekil 6.7. X-Ekseni dış görüntüsü.

Çizelge 6.1. X-Ekseni dış görüntüsüne ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	15 hücreli preparat tablası
2	X-Ekseni tablası
3	Sigma profil
4	Metal ayak
5	Sigma profil sonlandırma kapağı

Şekil 6.8'de preparat tablasının X-ekseninde hareketini sağlayan mekanizmanın iç görüntüsü yer almaktadır. Tahrikleme sistemi, eş zamanlı çalışan iki step motor ve bunlara kaplin ile bağlı vidalı miller ile sağlanmaktadır. Bu mekanizmaya ait detaylı parça ve malzeme listesi Çizelge 6.2'de verilmiştir.

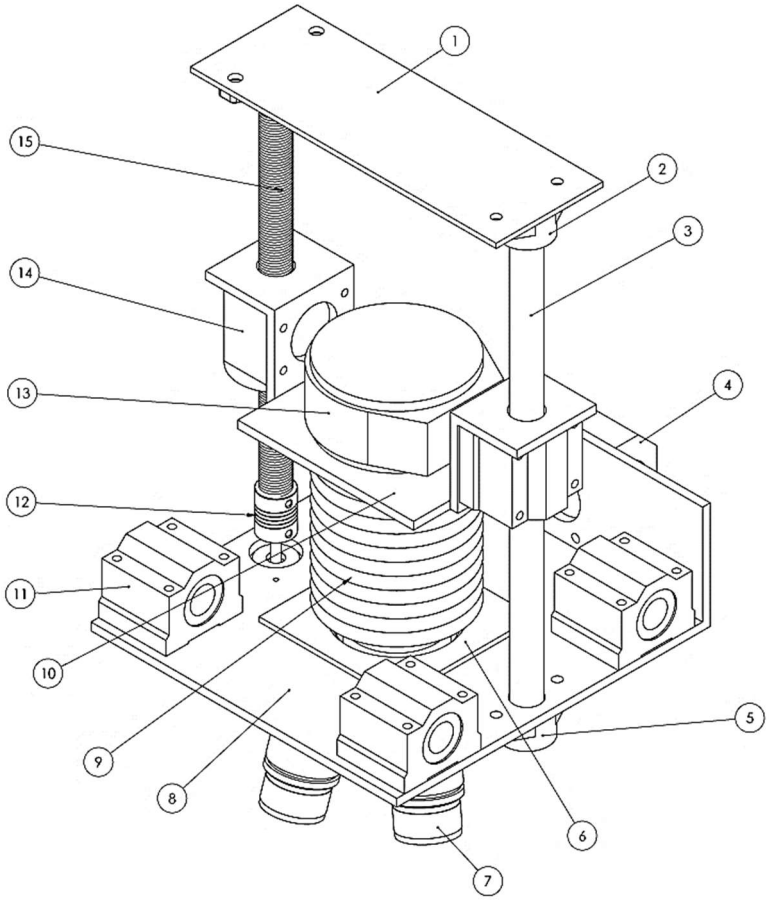


Şekil 6.8. X-Ekseni iç görüntüsü.

Çizelge 6.2. X-Ekseni iç görüntüsüne ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	X-Ekseni tablasını ileri ve geri yönde tahrikleyen step motor
2	X-Ekseni tablası için al destek ray sistemi
3	Aydınlatma sistemi için plaka
4	X-Ekseni tablası ile alt destek ray sistemini birbirine bağlayan parça
5	Mekanik sistem yataklama alt destek parçası
6	Vidalı mil için rulmanlı yatak
7	X-Ekseni tahrikleme için vidalı mil
8	Vidalı mil somunu
9	Step motor ile vidalı mil bağlantısını sağlayan kaplin

Mikroskop sistemlerinde bilgisayarla görüntüleme işlemleri için dijital kameralar kullanılmaktadır. Mikroskop objektifi ile kamera arasında genelde sabit odak uzunluğunda uzatma tüpleri (Extension-tube) kullanılmaktadır. Ancak farklı tip ve özellikteki mercekler için odak uzaklığı da değişken olacağından her seferinde yeniden odak uzaklığının belirlenmesi gerekir. Buna çözüm olarak, Şekil 6.9'da görüldüğü gibi; step motor kontrollü ve lineer vidalı mil sistemi ile tahriklenen lazer körüklü (9 nolu) elektromekanik bir sistem tasarlanmıştır.



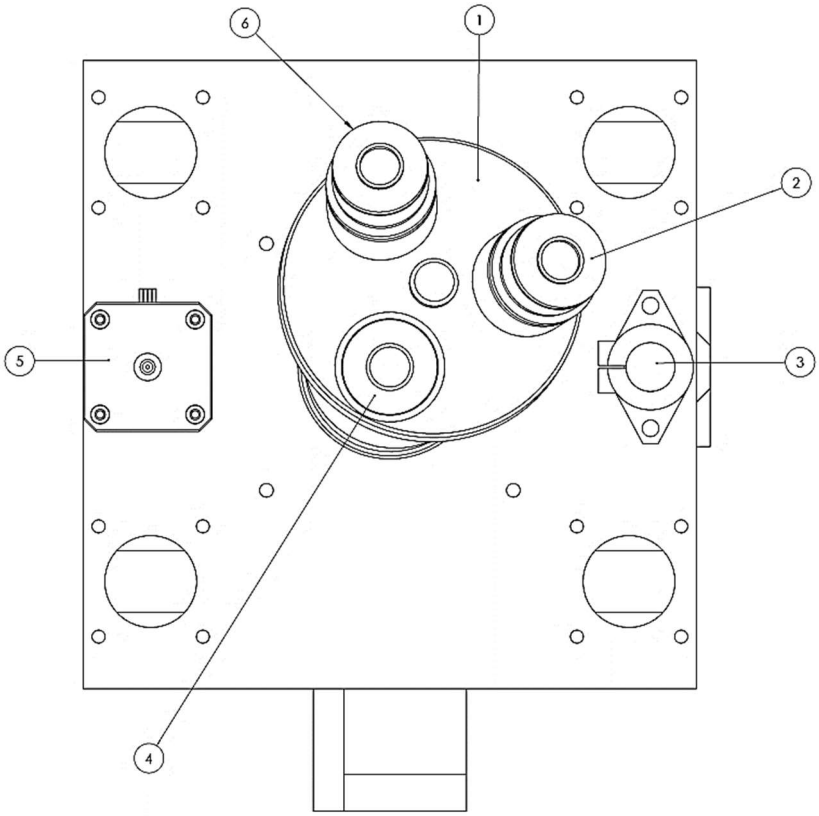
Şekil 6.9. Y-ekseni izometrik görüntüsü.

6 nolu bağlantı parçası ile körük zemine, 10 nolu parça ile de dijital kamera zeminine sabitlenmiştir. 3, 12 ve 15 nolu mekanik parçalar ile sistemin yukarı ve aşağı yönde hareketi sağlanarak odak noktası (bilgisayar yazılımı desteğiyle) belirlenmektedir.

Çizelge 6.3. Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi.

P. No	***Açıklama***
1	Kamera sistemi sabitleme ve sonlandırma parçası
2	İndüksiyonlu mil sabitleme parçası
3	Kamera sistemine dikey eksende kılavuzluk eden indüksiyonlu mil
4	Y-Ekseni tablası tahrikleme için vidalı mil somunu
5	İndüksiyonlu milin Y-Eksenine sabitleme parçası
6	Lazer Körüğün Y-Eksenine sabitleme parçası
7	Mikroskop objektifi
8	Y-Ekseni tablası
9	Kamera sistemi odaklaması için koruyucu lazer körük
10	Kamera tablası

Şekil 6.10'da Y ekseninin alttan görüntüsü verilmiştir. Burada 1 numaralı parça (Revolver) ile mikroskop objektiflerinin bağlantısı yapılır ve çalışılmak istenen objektif el yordamıyla uygun konuma getirilir. Bu mekanizmaya ait detaylı parça ve malzeme listesi Çizelge 6.4'de verilmiştir.



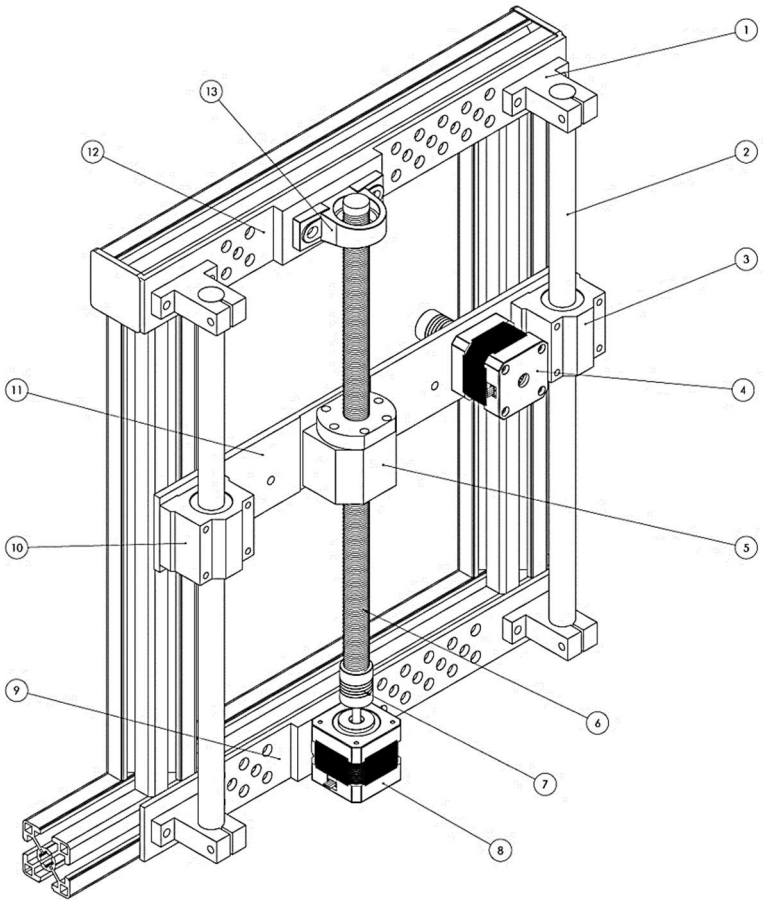
Şekil 6.10. Y-ekseninin alttan görünümü.

Çizelge 6.4. Y-ekseninin alttan görünümüne ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	Mikroskop objektifleri için revolver
2	Mikroskop objektifi
3	İndüksiyonlu milin Y-Eksenine sabitleme parçası
4	Mikroskop objektifi
5	Kamera sistemini aşağı ve yukarı yönde tahrikleyen step motor
6	Mikroskop objektifi

Şekil 6.11'de sistemin Z-ekseninde dikey hareket kabiliyetini sağlayan mekanizmanın izometrik görüntüsü verilmiştir. Burada da X ekseninde olduğu gibi tahrikleme sistemi, eş zamanlı çalışan iki step motor ve bunlara kaplin ile bağlı vidalı

miller ile sağlanmaktadır. Bu mekanizmaya ait detaylı parça ve malzeme listesi Çizelge 6.5'te verilmiştir. Ayrıca bu mekanizma üzerine bağlı olan, Y ekseni kontrolü için bir step motor bulunmaktadır. Şekil 6.12'da ise sistemin montajı için gerekli olan bazı özel parçaların listesi verilmiştir.



Şekil 6.11. Z-ekseni izometrik görüntüsü.

Çizelge 6.5. Z-eksenine ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	İndüksiyonlu mil yatağı
2	Y-Ekseni sisteminin dikey hareketine kılavuzluk eden indüksiyonlu mil
3	İndüksiyonlu mil somunu
4	Y-Ekseni tahrikleme için step motor
5	Vidalı mil somunu
6	Y-Ekseni sisteminin dikey hareketini sağlayan vidalı mil
7	Step motor ile vidalı mil bağlantısını sağlayan kaplin
8	Z-Ekseni tahriklemede kullanılan step motor
9	Mekanik sistem yataklama alt destek parçası

Çizelge 6.5. (Devam ediyor)

10	İndüksiyonlu mil somunu
11	Y-Ekseni'ni Z-Ekseni'ne bağlantısını sağlayan ara bağlantı parçası
12	Mekanik sistem yataklama alt destek parçası
13	Vidalı mil yatağı

Şekil 6.12. Tasarlanan mekanik bağlantı parçaları.

6.4.1.2. Mekanik Bileşenler

Geliştirilen mikroskop sistemini bir araya getiren mekanik bileşenleri listesi Çizelge 6.6'da verilmiştir. Malzemelere ait bazı fotoğraflar ise Şekil 6.13'de gösterilmektedir.

Çizelge 6.6. Mekanik malzeme listesi.

SNo	*Malzeme Adı ve Kodu*	*Adet*
1	Alt Destek Mili (SAC20)	2
2	Lineer Rulman (TBR20UU)	4
3	Lineer Rulman (SK16)	8
4	Lineer Rulman (SCE16UU)	9
5	Lineer Rulman (SHF16)	2
6	Rulmanlı Yatak (UFL001)	4
7	Rulmanlı Yatak (UP001)	6
8	Vidalı Mil (SFUR1605), 500 mm	4
9	Vidalı Mil Somunu (SFUR)	6
10	Vidalı Mil Somun Gövdesi (SSG)	6
11	İndüksiyonlu Mil (CAP16), 500 mm	4
12	Yaylı Kaplin (BW20C)	7
13	Sigma Profil (40x40), 500 mm	14
14	Sigma Profil Bağlantı Ekipmanı (40x40, K10)	30
15	Sigma Profil Ayak Bağlantı ve Parçaları (M10)	6

Şekil 6.13. Mekanik bileşenler; a) sigma profil, b) vidalı mil, indüksiyon mili ve alt destek sistemi, c) rulman ve yataklar, d) bağlantı parçaları.

6.4.1.3. Elektronik ve Optik Bileşenler

Sistemin montajı için gerekli olan malzemeler Elektronik Kontrol ve Optik Kontrol olmak üzere iki grup altında toplanmıştır. Çizelge 6.7 ve Çizelge 6.8'de gerekli malzeme kalemlerine ait detaylı listeler verilmiştir.

Çizelge 6.7. Optik kontrol malzeme listesi.

SNo	*Malzeme Kodu ve Adı*	*Adet*
1	Revolver (4-Girişli)	1
2	Dijital Kamera (16MP, 1/2,33-inch sensor, colored)	1
3	Plazma Körük (80x80x200 mm)	1
4	Kare Led Panel (12 Watt)	1
5	Mikroskop Objektifi (4X) *	1
6	Mikroskop Objektifi (10X) *	1
7	Mikroskop Objektifi (40X) *	1
8	Mikroskop Objektifi (100X) *	1

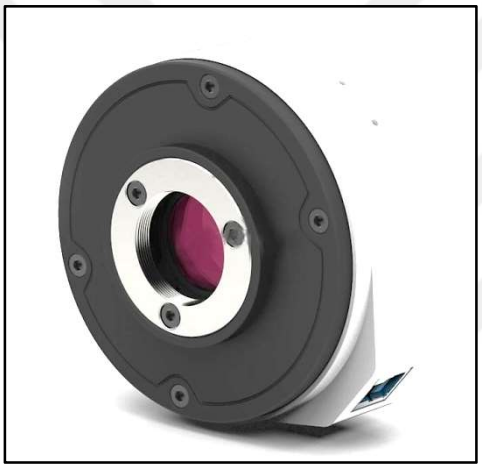
* Infinitive Semi-plan Achromatic Objektif

Çizelge 6.8. Elektronik kontrol malzeme listesi.

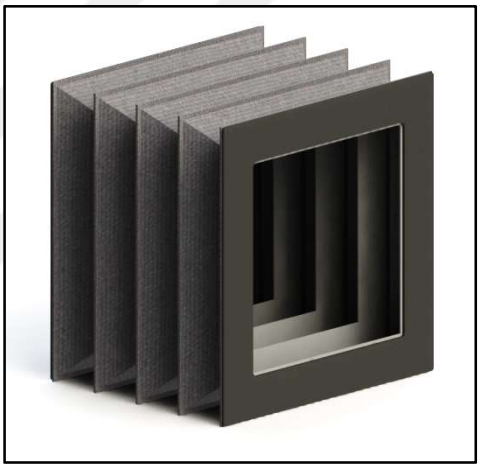
SNo	*Malzeme Kodu ve Adı*	*Adet*
1	Nema 17HS4401 Step Motor	6
2	Mekanik Endstop Switch	6
3	Arduino Mega 2560 R3 (Ana kart)	1
4	RepRap Ramps 1.4 (Kontrol Kartı)	2
5	A4988 Step Motor Sürücü Kartı	8
6	12V/24V AC Adaptör	1
7	Montaj Kablosu (12-24 Volt) 15 Metre	1
8	Spiral Kablo Koruma Kılıfı 2 Metre	1
9	220V AC Adaptör Güç Kablosu	1
10	40 Pin M-F Jumper Kablo	1

Şekil 6.14'de optik kontrol bileşenlerin ve Şekil 6.15'te elektronik malzemelere ait fotoğraflar gösterilmektedir.

(a)



(b)



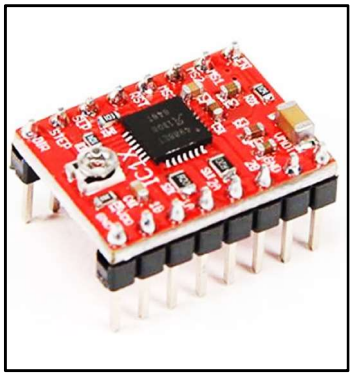
(c)

(d)

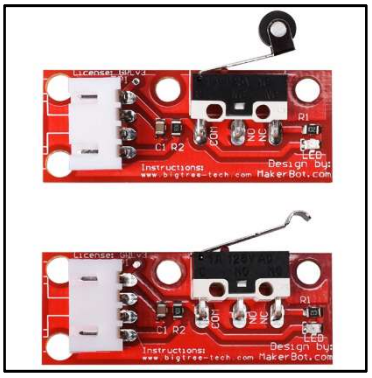
(e)

Şekil 6.14. Optik kontrol bileşenleri; a) Objektifler (4X, 10X, 40X, 100X), b) dijital kamera, c) plazma körük, d) kare led panel, e) revolver.

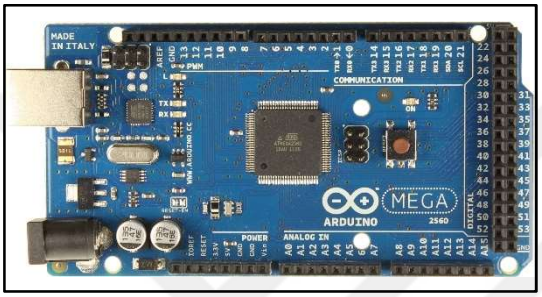
(a)



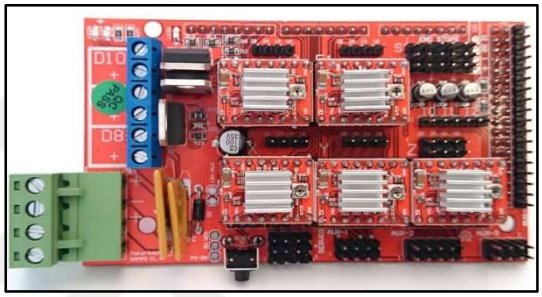
(b)



(c)



(d)



(e)

(f)

Şekil 6.15. Elektronik bileşenler; a) Nema 17HS4401 step motor, b) A4988 step motor sürücü kartı, c) mekanik end-stop switch, d) Arduino Mega 2560 R3, e) RepRap Ramps 1.4, f) 12V/24V AC adaptör ve kablolar.

6.4.1.4. Montaj

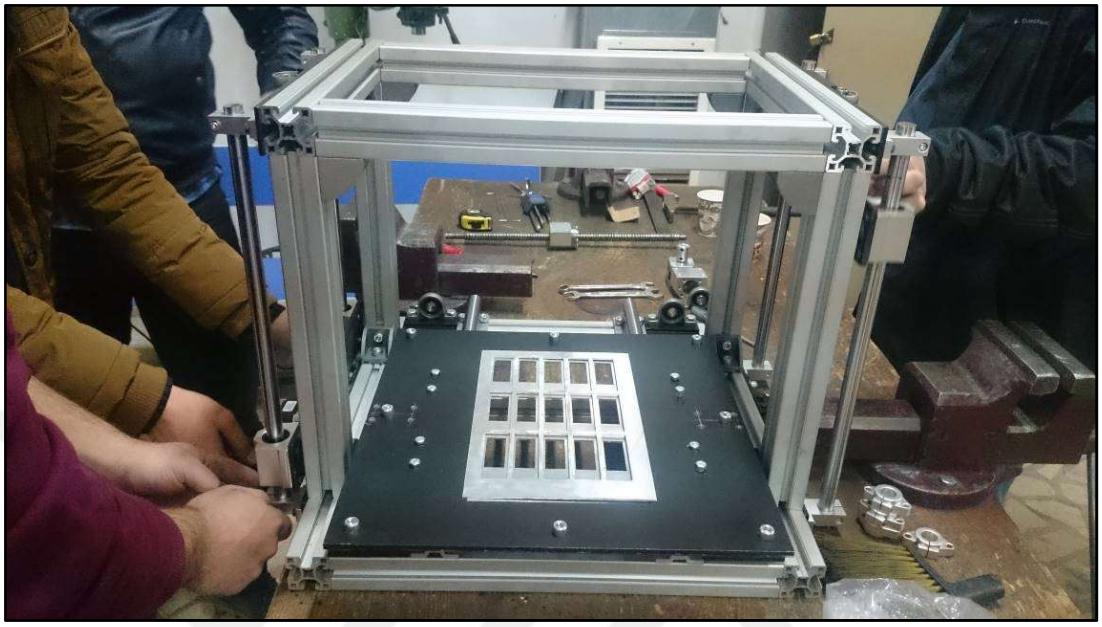
Bu kısım, bizim için en meşakkatli ve uzun süren bir çalışma olmuştur. Sanal dünyada gerçekleştirilen çizim ile montaj aşamasındaki hassas ölçülerin çok iyi ayarlanması gerekmektedir. Parça kesimleri esnasında milimetrik hassasiyet farkı ileriki süreçlerde tahrik sistemleri için büyük sorunlar çıkarmaktadır. Montaj süreci tamamlandıktan sonra eksen tahrikleme sistemleri kontrol kartlarına bağlanarak ilk hareketlendirme işlemleri yapılmıştır. Ancak elektronik katman sisteme entegre edildiğinde bazı mekanik kasılmalardan dolayı tahrik sistemlerinin doğru çalışmadığı görülmüştür. Bu durumları ortadan kaldırmak için her bir eksen ayrı ayrı test edilerek, sorun olan bölgelerde vida gevşetme veya sağlamlaştırma işlemleri yapılmıştır.

Ayrıca lazer kesim, sertleştirilmiş çelik işleme gibi işlemler için büyük şehirlerdeki sanayilere ve hassas CNC tezgahlarına ihtiyaç duyduğumuz zamanlarda olduğundan montajın tamamlanması beklenen süreden daha fazla olmuştur. Tabii buna ek olarak, montaj esnasındaki parça zayiatları da hiç hesapta olmayan konuların başında gelmektedir. Şekil 6.16 ve Şekil 6.17'de montaj aşamasında çekilmiş bazı fotoğraflar gösterilmektedir.

Montaj aşaması mekanik ve elektronik olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Özgün bir tasarım olarak çizimlerini tamamlamış olduğumuz elektromekanik mikroskop sistemi için gerekli olan tüm malzemeler temin edildikten sonra, ilk iş olarak mekanik montajı yapılmıştır.

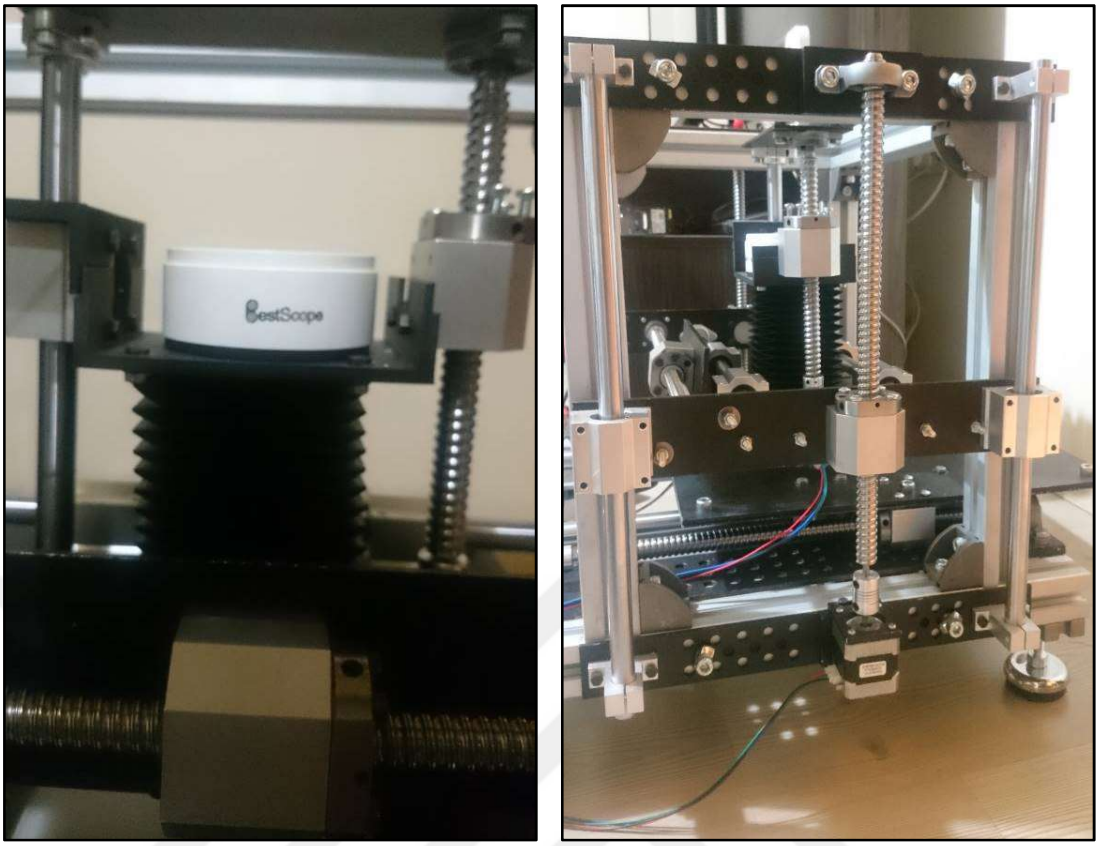
Mekanik montaj işlemlerinin tamamlanarak gerekli testlerin yapılmasından sonra gövde üzerinde bulunan tahrikleme sistemlerinin elektronik kart bağlantıları yapılmıştır. Ana kart olarak Arduino Mega 2560 R3 kullanılmıştır. Eksenleri tahriklemede kullanılan motorlar için ana kart üzerine RepRap Ramps 1.4 kontrol kartının montajı yapılmıştır. Her bir step motor ise DRV8825 Step Motor Sürücü Kartı sürülmüştür. Şekil 6.18, Şekil 6.19 ve Şekil 6.20'de elektronik bağlantıları yapılan bölgelerin kısmi görüntüleri yer almaktadır. Şekil 6.21'de kontrol kartı ve

Şekil 6.22’de sistemin montaj işlemleri tamamlandıktan sonraki genel görüntüsü verilmiştir.

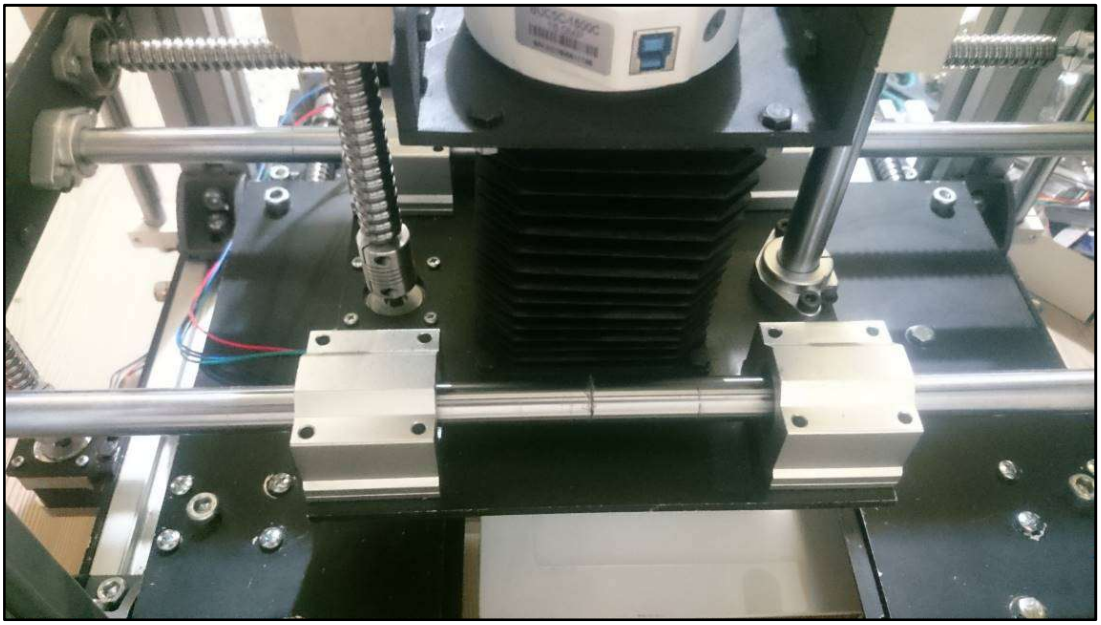


Şekil 6.16. Mekanik montaj aşamaları I.

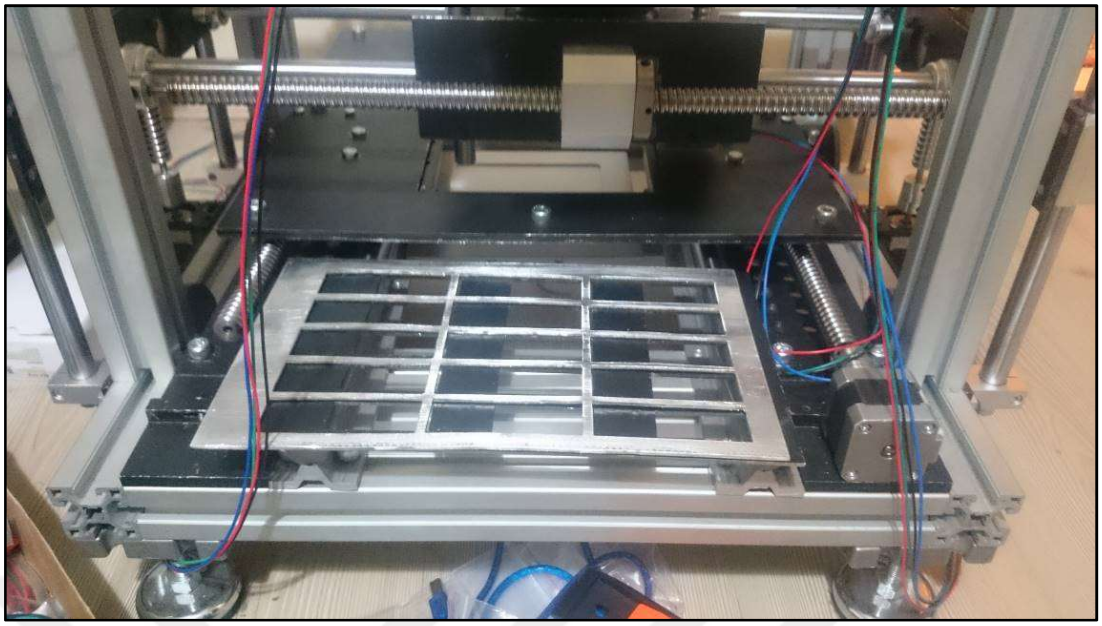
Şekil 6.17. Mekanik montaj aşamaları II.



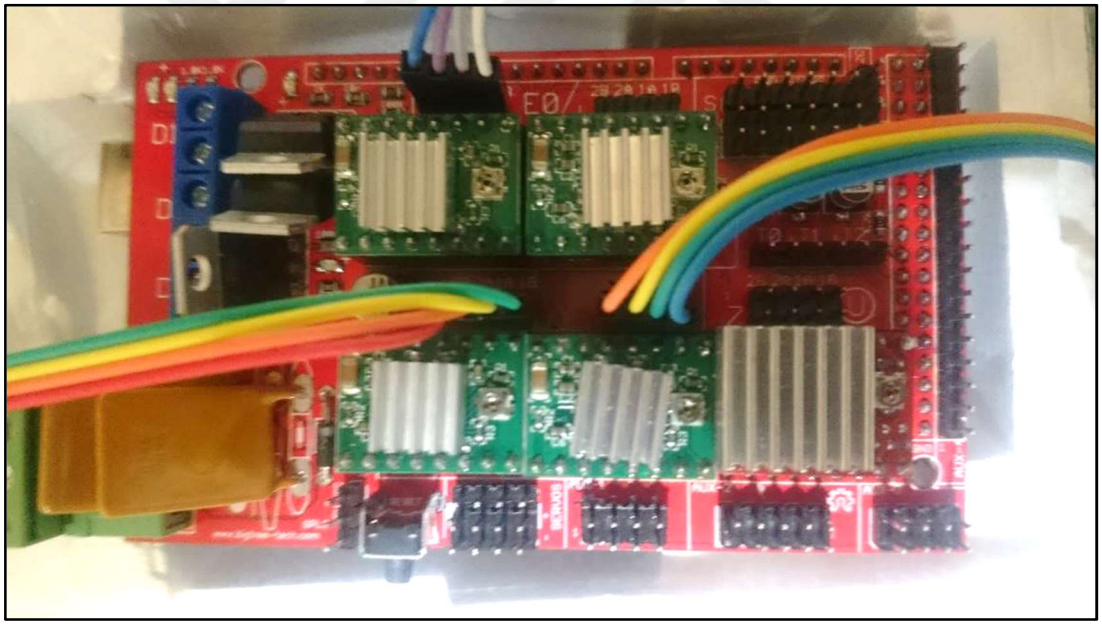
Şekil 6.18. Elektronik montaj aşamaları I.



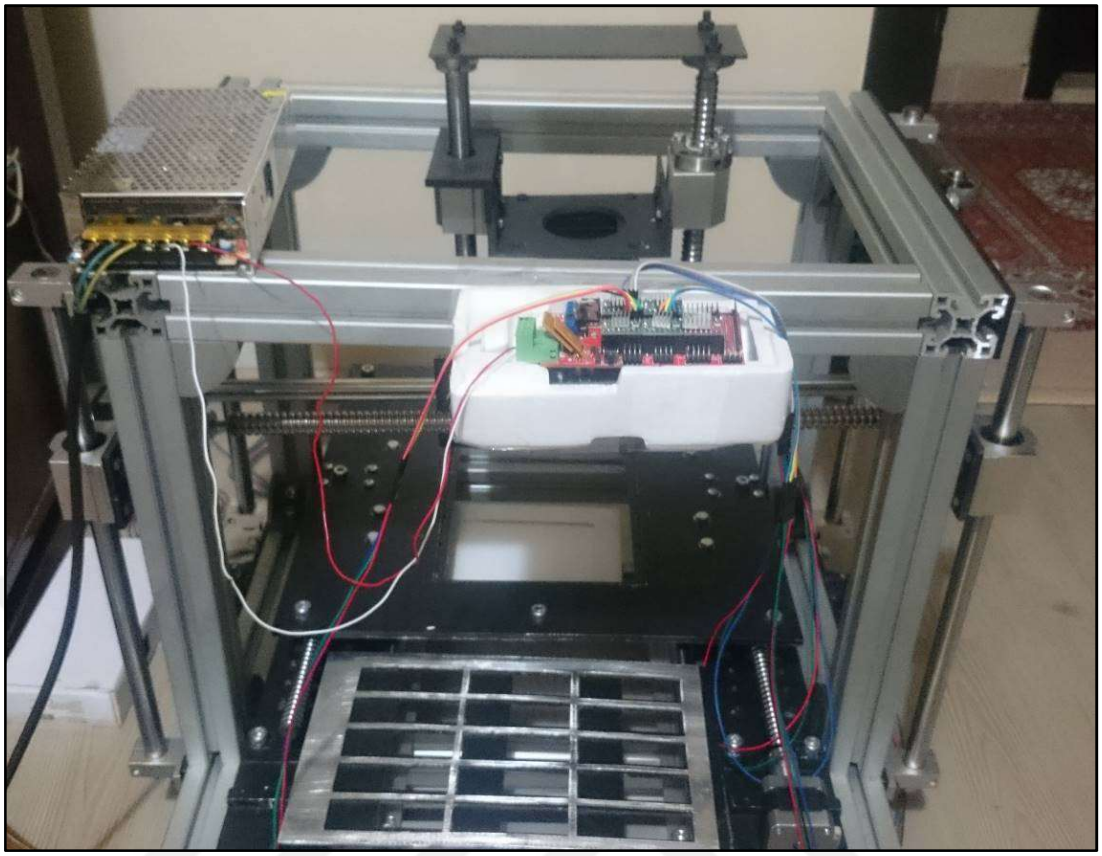
Şekil 6.19. Elektronik montaj aşamaları II.



Şekil 6.20. Elektronik montaj aşamaları III.



Şekil 6.21. Elektronik montaj aşamaları IV.



Şekil 6.22. Elektronik montaj aşamaları V.

6.4.2. Prototip II

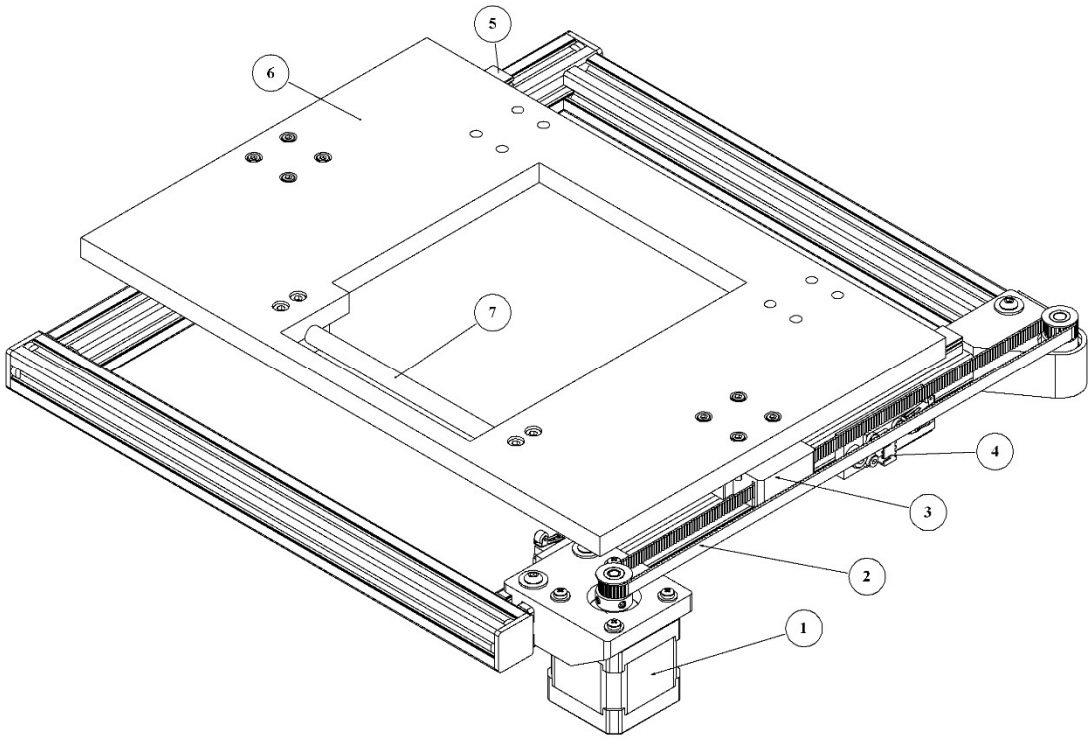
Geliştirilen bu prototipte, bir önceki prototipin imalatından sonra tecrübe edilen bazı sorunların ortadan kaldırılması amaç edinilmiştir. En önemli sorunlar; sistemin toplam ağırlığının bir insanın taşıyabileceğinden fazla olması (taşınabilirlik), preparat haznelerini ihtiva eden X eksenin ileri ve geri yöndeki hareket mesafesinin kendi ölçülerinin iki katı olması nedeniyle ürün giydirme sorunlarına sebep olması olarak söylenebilir.

İlk olarak taşınabilirlik ile ilgili sorununu ortadan kaldırmak için daha hafif ve küçük ölçülerde sigma profil tercih edilmiştir. Ayrıca hareket eksenlerinde bulunan tablalar için alüminyum yerine pleksi-glass malzeme kullanılarak hem ağırlık yönünden hem de ekonomik anlamda maliyeti azaltmıştır. X ve Y eksenleri için CAD/CAM ortamında özgün bir tasarım yapılarak, hareketli olan tüm sistemlerin kabin sınırları içerisinde çalışabilecek hale getirilmiştir. Tahim edileceği üzere, sistem boyutunun

azaltılması nedeniyle X eksenindeki preparat yuvalarının sayısı 15'ten 3'e düşürülmüştür. Böylece daha az malzeme kullanılarak hem taşınabilirlik hem de maliyet açısından daha optimal bir sistem tasarlanmıştır.

6.4.2.1. Tasarım

İkinci prototipin üç boyutlu çizimleri SolidWorks ile hazırlanmıştır. Çizimi yapılan her bir eksenin detaylı bilgileri bu başlık altında verilmiştir. Şekil 6.23'te sistemin X eksenine ait izometrik görüntüsü bulunmaktadır. Bu eksenin hareket mekanizması kayış düzeneği ile kurgulanmıştır. Şekil üzerinde gösterilen 1-4 numaralı bileşenler sayesinde tabla öne ve arkaya doğru hareket edebilmektedir.



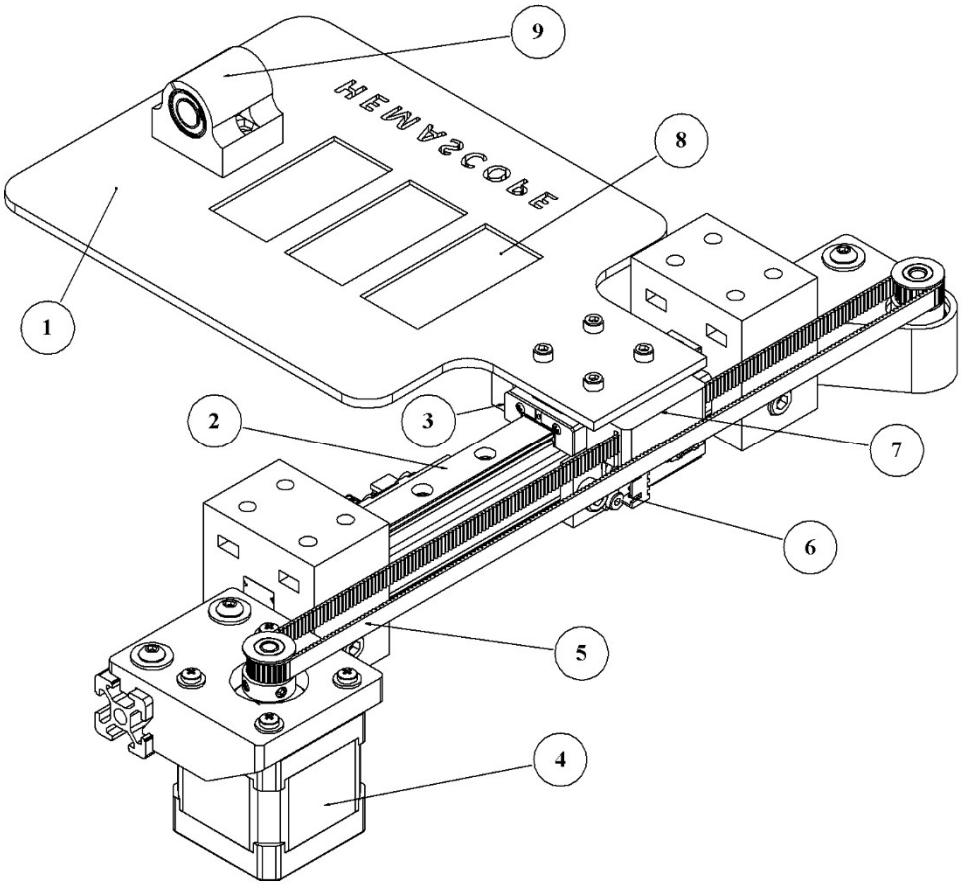
Şekil 6.23. Prototip II: X-ekseninin izometrik görünümü.

Bu tabla üzerinde aynı zamanda Y-ekseni entegre edilmektedir. Şekil üzerinde 7 nolu bileşen olarak gösterilen indüksiyonlu mil düzeneği, Y-ekseninin doğrusal hareketine klavuzluk etmektedir. X-ekseni tablasının ortasının boşaltılmış olma nedeni ise bir üst katmana engtegre edilecek olan preparat tablası için gerekli olan ışık kaynağının yerleştirilebilmesidir. Çizelge 6.9'da X-eksenine ait bileşenlerin listesi verilmiştir.

Çizelge 6.9. Prototip II: X-eksenine ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	X-ekseni tablasını ileri ve geri yönde tahrikleyen step motor
2	GT2 kayış/kasnak sistemi
3	X-Ekseni tablası ile ray sistemini birbirine bağlayan parça
4	End-stop switch (durdurma anahtarı)
5	Lineer ray sistemi
6	X-ekseni tablası
7	Y-ekseninin doğrusal hareketi için indüksiyonlu mil

Şekil 6.24'te Y-eksenin detaylı çizimi gösterilmektedir. Yine burada da X-ekseninde olduğu gibi kayış düzeneği (4-7 nolu bileşenler) ile preparat tablasının sağa ve sola hareket etmesi sağlanmaktadır. 9 nolu bileşen (rulman), Şekil 6.23'teki 7 nolu indüksiyonlu mile bağlanarak Y-eksenin X-ekseni üzerinde kısıtlı olarak hareket etmesi sağlanır. Çizelge 6.10'da Y-eksenine ait bileşenleri listesi verilmiştir.

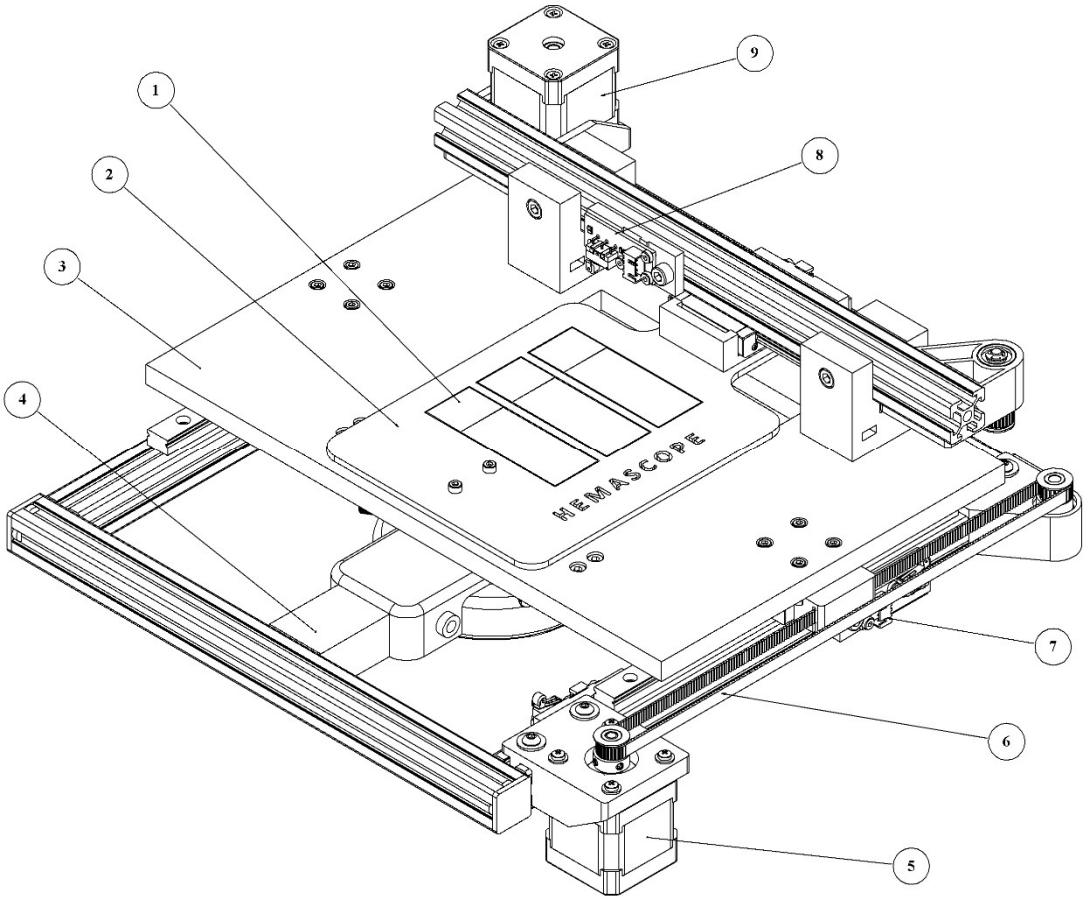


Şekil 6.24. Prototip II: Y-ekseninin izometrik görünümü.

Çizelge 6.10. Prototip II: Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	Y-Ekseni tablası
2	Y-Ekseni tablası için lineer ray sistemi
3	Lineer ray araba sistemi
4	Y-Ekseni tablasını ileri ve geri yönde tahrikleyen step motor
5	GT2 kayış/kasnak sistemi
6	End-stop switch (durdurma anahtarı)
7	Y-Ekseni tablası ile ray sistemini birbirine bağlayan parça
8	Preparat yuvası
9	X-ekseni üzerinde doğrusal hareketi sağlayan rulman.

Şekil 6.25'te X ve Y eksenlerinin montajlanmış hali gösterilmtektedir. Şekil 6.23'te gösterilen X ekseni tablasının üzerine, Şekil 6.24'deki Y ekseni sabitlenerek iki eksende hareket edebilen şaryo düzeneği oluşturulmuştur. Çizelge 6.11'de X ve Y-eksenine ait bileşenleri listesi verilmiştir.



Şekil 6.25. Prototip II: montajlanmış X ve Y eksenlerinin izometrik görünümü.

Çizelge 6.11. Prototip II: X ve Y-eksenine ait parça ve malzeme listesi.

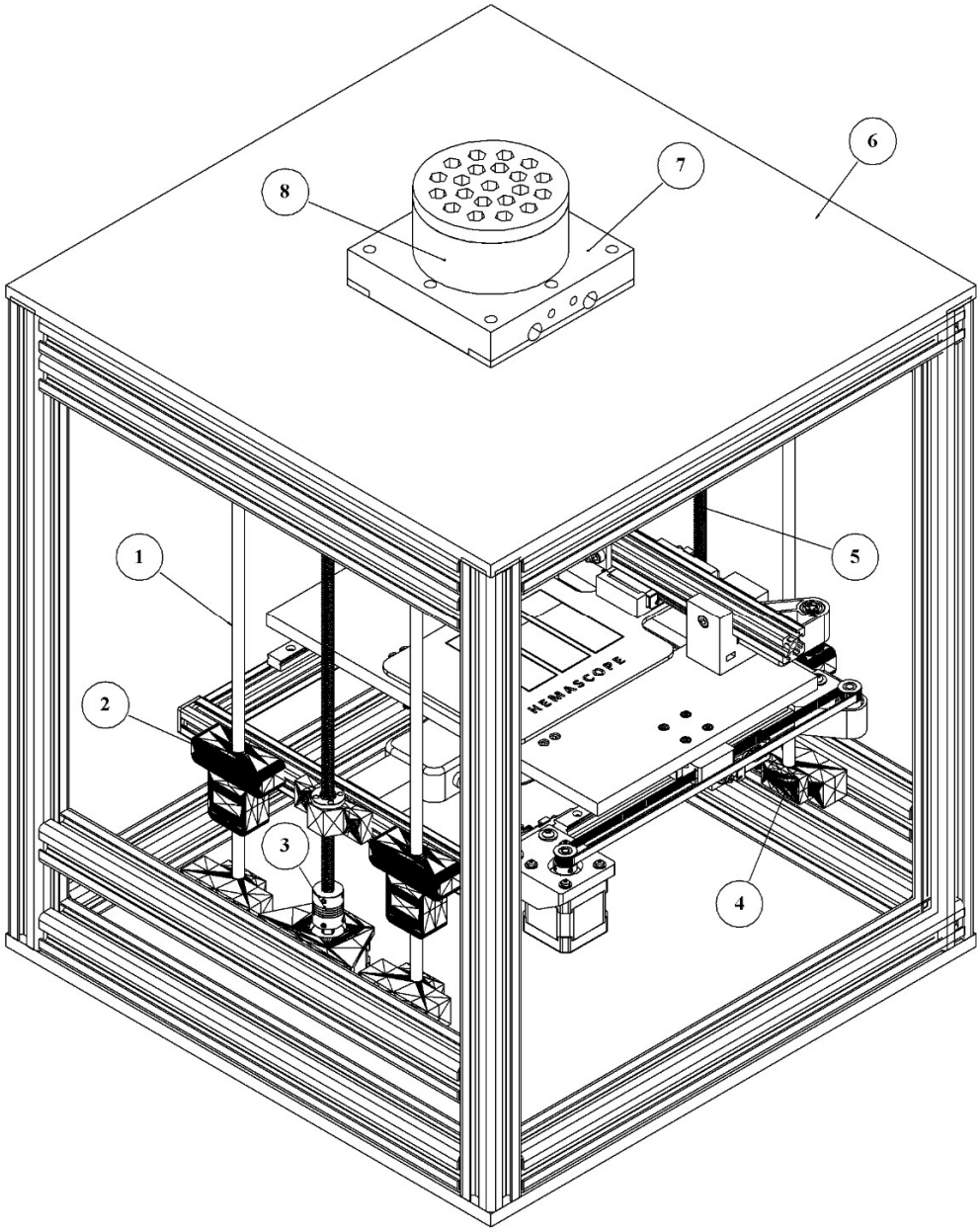
P. No	*Açıklama*
1	Preparat yuvası
2	Y-Ekseni tablası
3	X-Ekseni tablası
4	Aydınlatma sistemi ve kondanser
5	X-Ekseni tablasını ileri ve geri yönde tahrikleyen step motor
6	GT2 kayış/kasnak sistemi
7	X-Ekseni end-stop switch (durdurma anahtarı)
8	Y-Ekseni end-stop switch (durdurma anahtarı)
9	Y-Ekseni tablasını ileri ve geri yönde tahrikleyen step motor

Bir önceki prototipte olduğu gibi, Z-ekseni tahrikleme sisteminde vidalı mil kullanılmıştır. Şekil 6.25'deki iki eksenli (X ve Y) şaryo düzeneği, Şekil 6.26'da gösterildiği gibi montajı yapılmıştır. Sistemin üst kapağında dijital kameranın sabitlenebileceği bir yuva açılarak, özel olarak üretilen kamera kafesi monte edilmiştir.

Sistemin yukarı aşağı hareketlerini kısıtlamak için uygun bölgelere End-Stop switch kontrolleri bağlanmıştır. Böylece optik sistemin uzunluğuna bağlı olarak yeniden konumlandırma yapılabilemektedir. Çizelge 6.12'de sistemin montajlı görüntüsüne ait bazı bileşenlerin listesi verilmiştir.

Çizelge 6. 12 Prototip II: izometrik görünüme ait parça ve malzeme listesi.

P. No	*Açıklama*
1	Z-ekseni tahrikleme sistemi için indüksiyonlu mil
2	XY şaryo sistemini Z-eksenine bağlayan birleştirme parçaları
3	Z-eksenini yukarı ve aşağı yönde tahrikleyen step motor ve kaplin
4	Z-ekseni tahrikleme sistemi sonlandırma ve yataklama parçaları
5	Z-ekseni tahrikleme sistemi için vidalı mil
6	Üst kapak
7	Dijital kamera sabitleme yuvası
8	Dijital kamera



Şekil 6.26. Prototip II: sistemin izometrik görünümü.

6.4.2.2. Mekanik Bileşenler

Bölüm 6.4.1.2'de Mekanik bileşenler verilmiştir.

6.4.2.3. Elektronik ve Optik Bileşenler

Bölüm 6.4.1.3'de Elektronik ve Optik bileşenler verilmiştir.

BÖLÜM 7

GELİŞTİRİLEN YAZILIM UYGULAMALARI

Motorize mikroskop cihazının uzaktan kontrolü için AJAX tabanlı bir Web arayüzü geliştirilmiştir. Böylece dünya üzerindeki herhangi bir erişim noktasından sisteme bağlanarak, hastaya ait kimlik bilgilerini, kan sayım değelerini, cihaz tarafından çekilen kan görüntülerinin haritasını görebilemekte ve cihazı gerçek zamanlı olarak üzerinde çalışılmakta olan kan yayma preparatı üzerinde gezinerek gerekli incelemeleri yapabilme imkanına sahiptir.

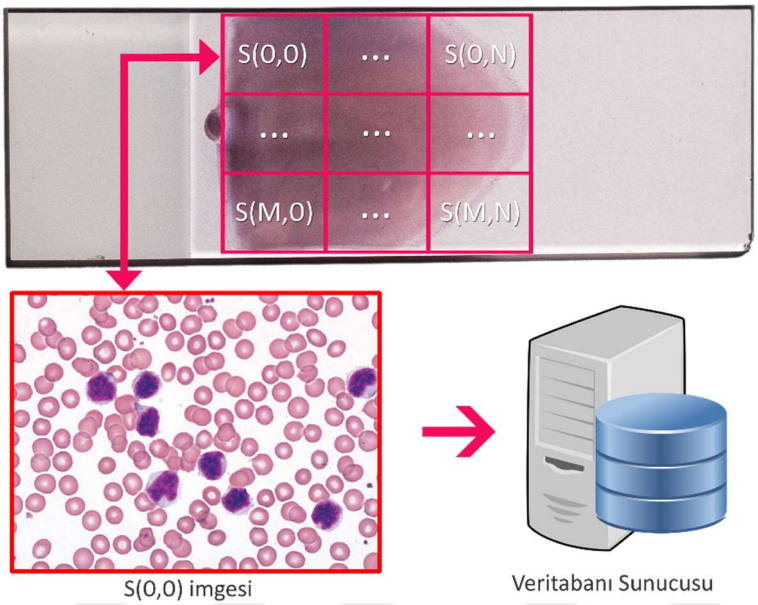
7.1. HASTA VERİTABANI

Bir sektör, mikroskop objektifinin periferik yayma preparatı (blood film) üzerinde odaklandığı herhangi bir konumundaki optik sistemin görüş alanını (field of view) ifade etmektedir. Her sektör optik sistemin büyütme kudreti ile ters orantılı olarak sabit bir yükseklik ve genişlik değerine sahiptir. Böylece tüm periferik yayma görüntüsü eşit boyutlarda parçalara ayrılır. Şekil 7.1'de görülen periferik kan yayma preparatı $S(M, N)$ olarak $M \times N$ adet sektöre bölünmüştür.

Yani, optik sistem $M \times N$ adımda preparat üzerindeki tüm alanı taramış (harita çıkarma) olacaktır. Tabi burada basit bir örnekle olayı açıklamaya çalıştığımız için sektör sayısı çok azdır. Bu durum gerçek dünyada, mikroskop sisteminin toplam büyütme kudretine bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte sektör sayılarının çok büyük değerlerde olacağı da bilinmektedir.

Motorize mikroskop sistemi tarafından taranan her bir sektör veritabanı üzerinde (ilişkilendirilmiş hasta kimlik bilgilerine göre) saklanır. Böylece bir hastaya ait kan yayma görüntüleri istenildiği zaman çağırılabilir ve hastanın bir sonraki süreçte alınan kan örnekleri ile karşılaştırma imkânı sağlar.

Ayrıca motorize mikroskop sisteminin farklı bir coğrafi konumda olduğu düşünülürse, görüntü sektörlerinin veritabanı üzerinde saklanması sayesinde web tabanlı olarak çalışan bir arayüz üzerinden birçok uzman hekim (hematolog) tarafından (aynı hasta veya farklı hastalar) eş zamanlı olarak incelenebilir.



Şekil 7.1. Dijital kan görüntülerinin saklanması.

Kan yayma preparatı üzerindeki görünür alanın (Sektör) hesaplanmasında Eşitlik 7.1 ve Eşitlik 7.2'den faydalanılmaktadır.

$$FOW_H = C_W / M_T \tag{7.1}$$

FOW_H ile bir sektörün yatay boyutu hesaplanır. Burada C_W, kamera sensörünün genişliğini ve M_T toplam büyütme kudretini temsil etmektedir.

$$FOW_V = C_H / M_T \tag{7.2}$$

FOW_V ile bir sektörün dikey boyutu hesaplanır. Burada C_H, kamera sensörünün yüksekliğini ve M_T toplam büyütme kudretini temsil etmektedir. Örnek olarak $40X$ büyütme kudretine sahip bir sistem için Çizelge 7.1'deki kamera özelliklerini kullanarak, bir sektörün boyunu hesaplayalım;

Çizelge 7.1. Dijital kamera özellikleri.

Sensör Boyutu	1/2,33 inch (6,16mm × 4,6mm, 28mm^2)
Kırpma Faktörü	5,6
Piksel Boyutu	1,335µm × 1,335µm
Renk Sıcaklığı	1900K-8000K
Efektif Piksel	16 MP
Çözünürlük	4608H × 3456V
Renk Derinliği	24 Bit
Pozlama Zamanı	1ms-1s
Çerçeve Hızı	5FPS @ 16MP (4608 × 3456)
	25FPS @4MP (2304 × 1728)

$$FOW_H = 6{,}16mm/40X \rightarrow FOW_H = 154\mu m$$

$FOW_V = 4{,}6mm/40X \rightarrow FOW_V = 115\mu m$ olarak bulunur. Bir preparat üzerindeki yayılmış kanın boyutları; yatay olarak $P_H = 30mm$ ve dikey olarak $P_V = 20mm$ olduğu düşünülürse;

$$M = P_H / FOW_H \tag{7.3}$$

$$N = P_V / FOW_V \tag{7.4}$$

Eşitlik 7.3 ve 7.4'ten sektör boyutları hesaplanarak, bu preparat üzerinde toplam $S(M,N) = 33{,}879$ adet sektör olduğu bulunur.

7.2. KAN HÜCRE SEGMENTASYONU

Kan hücre segmentasyonu, görüntüdeki hücrenin karmaşık arka plandan ayrılarak, hücre çekirdeğinin ve sitoplazmanın morfolojik parçalarına bölünmesi işlemidir [148], [149]. Başlangıçta, mikroskop kamerasından alınan veya laboratuvarda toplanan kan hücre görüntüleri renkli bir imgedir. Ön işleme aşamasında görüntü

genellikle gri tonlamalı formata dönüştürülür. Bu işlemi takiben, hücre görüntüsünün kalitesini artırmak ve görüntünün dinamik aralığını iyileştirmek için kontrast ve parlaklık ayarı uygulanır. Daha sonra görüntü normalize edilir. Lökosit çekirdeği ve trombositler için global eşik uygulama [150,151] veya başka herhangi bir bulgulama yöntemi görüntüye uygulanabilir.

Morfolojik işlemler, beyaz kan hücrelerini (lökositler) diğer hücrelerden ayırmak ve arka plandan çıkarmak için kullanılabilir [152]. Bazofil, eozinofiller, lenfosit, monositler ve nötrofiller gibi WBC türlerinin belirlenebilmesi için çekirdeğin ekstraksiyonu yapılmalıdır [153]. Lökositte diğer kan bileşenleri ile benzer renk ölçekleri olduğundan, hataları azaltmak amacıyla çekirdeği içeren alt görüntüler dikkate alınır [13].

Önerilen yöntem; ilk aşamada lökosit ve trombosit hücreleri için giriş görüntüsünü normalize ederek, RGB renk uzayına göre yeşil renk bileşenine göre gri tonlamalı bir çıkış görüntüsü üretir. Daha sonra Nucleus Template Function (NTF) ara işlem fonksiyonları uygulanarak lökosit nükleusları ve trombositlerin poligon olarak bir taslağı oluşturulur.

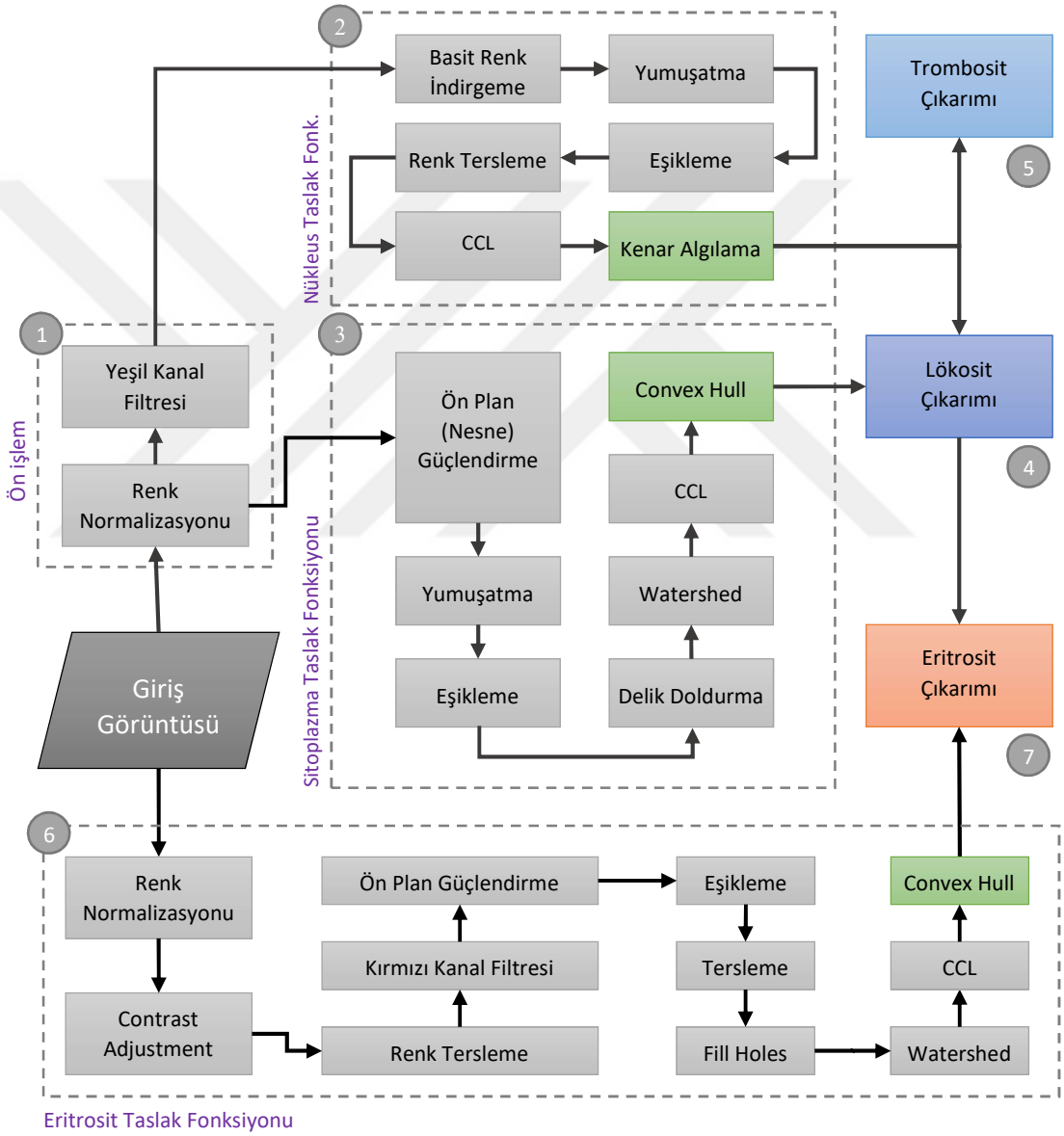
Normalize edilmiş giriş görüntüsü Cytoplasm Template Function (CTF)'nin girişine uygulanır ve fonksiyon çıkışında sitoplazma poligonu elde edilir. Bu poligonlar, küme ve alt küme birleşim işlemlerine tabii tutularak lökosit ve trombosit ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Son işlem adımında ise Erythrocyte Template Function (ETF) ile eritrosit poligonu oluşturulur. ETF poligonları ile NTF ve CTF'den elde edilen poligonlar karşılaştırma yapılarak eritrositlerin segmentasyonu yapılır. Böylece tüm kan hücrelerinin segmentasyon süreci tamamlanmış olur. Şekil 7.2'de algoritmanın genel akış diyagramı verilmiştir.

Bir görüntü fonksiyonunu Eşitlik 7.5'deki gibi tanımlayacak olursak;

$$F : S \rightarrow [0,1,2,...,255]^c \tag{7.5}$$

Burada $S = [\![0; m-1]\!] \times [\![0; n-1]\!]$ şeklinde pikselleri temsil etmektedir. m ve n, F görüntüsüne ait boyutları (sütun ve satır) ve c renk kanalların sayısını $c \in \{1,3,4\}$ temsil etmektedir. Renkli bir görüntüdeki piksel değerleri için tanım Eşitlik 7.6'daki gibi olur.

$$v = F[x, y] = (R, G, B) \tag{7.6}$$



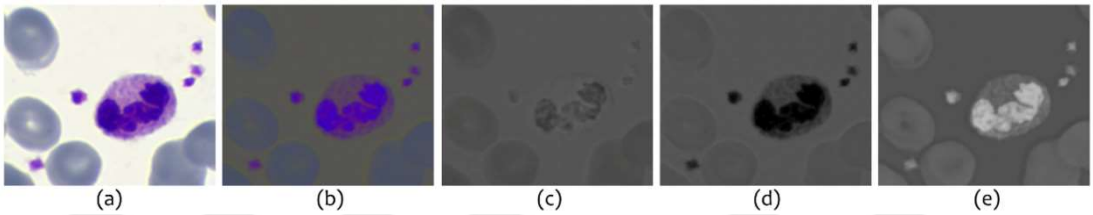
Şekil 7.2. Segmentasyon yönteminin genel akış diyagramı.

Çevresel kan yayma görüntülerinin elde edilmesi esnasında aydınlatmaya bağlı olarak meydana gelen düzensiz renk dağılımları [154], özellikle renk tabanlı görüntü

işlemede önemli bir sorundur. Normalizasyon işlemi ile bu görüntülerdeki piksel değerlerinin belirli bir standarda getirilmesi sağlanır. Bu da algoritmanın doğru sonuçlar üretmesine yardımcı olmaktadır. Görüntü normalizasyonu için, her bir renk bileşeni Eşitlik 7.7'de gösterildiği şekilde hesaplanır.

$$v_R^* = \frac{v_R}{v_R + v_G + v_B} \times 255,\ v_G^* = \frac{v_G}{v_R + v_G + v_B} \times 255,\ v_B^* = \frac{v_B}{v_R + v_G + v_B} \times 255 \tag{7.7}$$

Burada $\dot{v}_R$, normalize edilmiş kırmızı kanalı, $\dot{v}_G$ normalize edilmiş yeşil kanalı ve $\dot{v}_B$ ise normalize edilmiş mavi kanalı temsil etmektedir. Normalize edilmiş bir piksel ise $\dot{v} = (\dot{v}_R, \dot{v}_G, \dot{v}_B)$ şeklinde ifade edilir. Şekil 7.3'de normalize edilmiş görüntü ve RGB kanallarına göre sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 7.3. Örnek bir kan görüntüsüne ait RGB renk bileşenleri; a) giriş görüntüsü, b) normalize edilmiş görüntü, c) normalize R bandı, normalize G bandı, e) normalize B bandı.

7.2.1. Nükleus Taslak Fonksiyonu (NTF)

Çekirdek, yoğun bir nükleoprotein ve nükleik asit içerdiği için güçlü bir fiziksel absorbiyasyona ve kimyasal afiniteye sahiptir. Bu nedenle lökosit çekirdeğinin boyama yoğunluğu, sitoplazma ve eritrosit hücrelerine göre çok daha yüksektir [155]. Ayrıca RGB renk uzayına sahip sayısal görüntülerdeki çekirdek ve trombositler, görüntüdeki diğer nesnelere oranla Yeşil renk bileşeni en düşük değere sahiptir [156].

Şekil 7.3'de görüldüğü üzere, RGB kodlamalı bir görüntüyü Yeşil kanal kullanılarak gri ölçeğe dönüştürdüğümüzde, lökosit çekirdeği ve trombositler diğer renk bileşenlerine göre çok daha kolay ayrılabilmektedir. Ön işlemlerin ardından, ilk

adımda basit bir renk azaltma yöntemi uygulayarak (Eşitlik 7.8), görüntü üzerindeki sitoplazma ve eritrositlerin yok edilmesi sağlanır.

$$F[x,y] = round\left(\frac{G[x,y]}{interval}\right) \times interval \tag{7.8}$$

Burada $interval$, renk azaltma katsayısını ifade etmektedir. Bu çalışmada $interval$ değeri 5 olarak belirlenmiştir. Daha yüksek değerlerin alınması görüntüde önemli bilgi kaybına neden olmaktadır. Ayrıca bu işlem sonucunda elde edilen görüntüde istenmeyen birtakım gürültüler meydana gelebilir. Bunu da ortadan kaldırmak için Median yumuşatma filtresi uygulanır (Eşitlik 7.9).

$$F[x,y] = \text{median}\{g[p,q]\} \tag{7.9}$$

Burada $g[p,q]$, konvolüsyon kernelini, p ve q kernel indislerini ifade etmektedir. Bu çalışmada, performans açısından 3×3'lük bir konvolüsyon matrisi tercih edilmiştir. Bir sonraki aşamada ise görüntü ikili (*binary*) formatına dönüştürülür (Eşitlik 7.10). Otomatik segmentasyon sürecinde non-parametrik fonksiyonların önemli olması nedeniyle eşikleme yöntemi olarak Otsu tercih edilmiştir.

$$T[x,y] = \begin{cases} 255 & if\ F[x,y] \geq t \\ 0 & otherwise \end{cases} \tag{7.10}$$

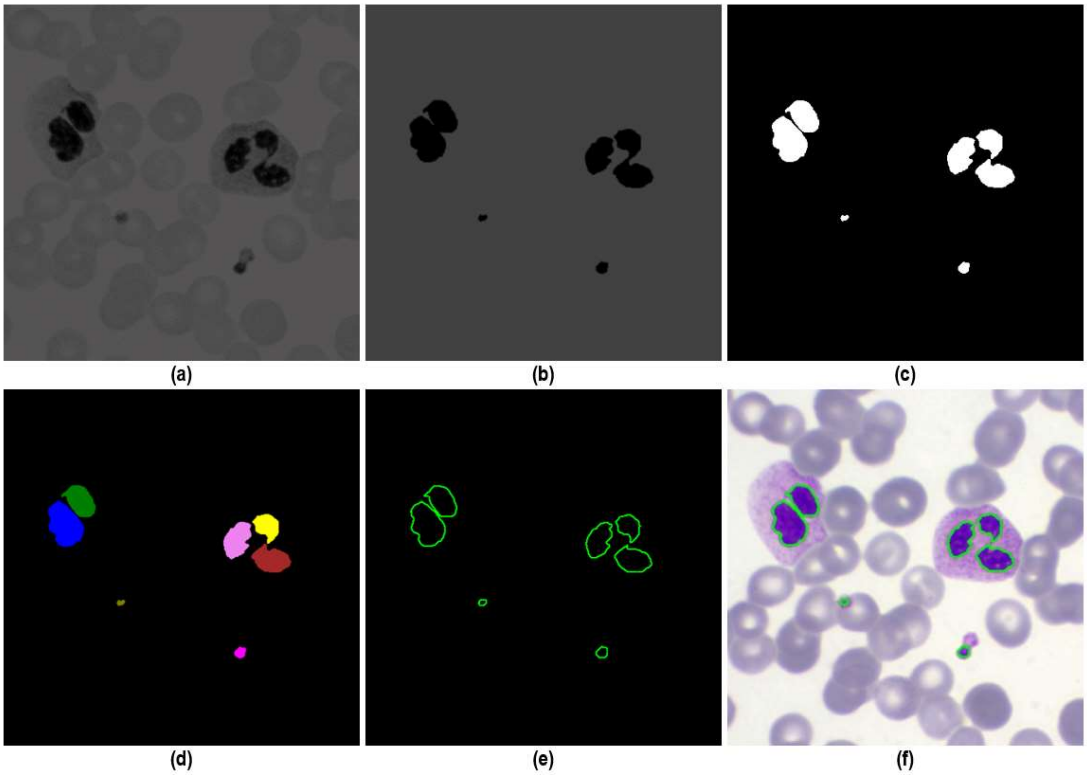
İkili (*binary*) seviyedeki bir görüntüde 0 değerine sahip olan pikseller arka plan, 1 değerine sahip olan pikseller ise görüntüdeki nesneler olarak bilinir. Mevcut durumda nükleuslar arka plan olarak görünmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak için Eşitlik 7.11'deki gibi görüntü tersleme işlemi yapılarak, nukleusların nesneye dönüşmesi sağlanır.

$$I[x,y] = \begin{cases} 255 & if\ T[x,y] = 0 \\ 0 & otherwise \end{cases} \tag{7.11}$$

Elde edilen bu nesneleri benzersiz bir ID ile kimliklendirmek için CCL yönteminden yararlanılır. Son işlem adımında, etiketlenen her bir bileşene Canny kenar algılama

algoritması uygulanarak kenar noktaları belirlenir. Böylece Şekil 7.4(e)'ye göre nükleus ve trombositlere ait dış kabuğu oluşturan noktalar $P_n = \{[x_0, y_0], [x_1, y_1], \dots, [x_m, y_m]\}$ poligonu olarak saklanır.

Burada n nesne sayısını, m ise n. nesnedeki nokta sayısını ifade etmektedir. Lökosit Exraction işleminde kullanılmak üzere tüm poligonların bir listesi $P_{NT} = \{P_0, P_1, P_2, \dots, P_n\}$ olarak saklanır. P_{NT} listesindeki nükleus ve trombositler, Lökosit ve Trombosit Extraction işlemi sırasında belirlenen kriterlere göre birbirinden ayrılacaktır. NTF'ye ait tüm işlem adımları Şekil 7.4'de görüldüğü gibidir.



Şekil 7.4. Nükleus taslak fonksiyonu işlem adımları; a) ön işleme yapılmış görüntü, b) basit renk indirgeme ve yumuşatma, c) eşikleme ve renk tersleme, d) bağlı bileşen etiketleme, e) kenar algılama, f) çıkış görüntüsü.

7.2.2. Sitoplazma Taslak Fonksiyonu (STF)

Sitoplazma, hücre zarı ile çekirdek arasında yer alır ve yüksek oranda su ihtiva etmesi nedeniyle açık renkli, yarı akışkan ve saydam özelliğe sahiptir. Bu nedenle nükleusa göre segmentasyonu çok daha zordur. Buna ilaveten, kırmızı kan hücreleri

ile bitişik olması gibi nedenlerle sitoplazma dış sınırlarının segmentasyonunu daha da karmaşık hale getirmektedir [29]. Bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde, sitoplazma segmentasyonun hücre çekirdeği segmentasyonuna oranla daha az başarı elde edildiği görülmektedir. Daha yüksek başarı oranı elde edebilmek için ön plan güçlendirme yöntemi geliştirilerek, yoğunluğu düşük olan sitoplazmaların da optimum bir şekilde segmentasyonu sağlanmıştır. Bu yöntemde işlem sırası şu şekildedir;

Birinci adımda, görüntü histogramına göre 0 ile 255 arasındaki ortalama rengi (avg) Eşitlik 7.12'deki gibi bulunur. Burada H, görüntü histogramını temsil etmektedir.

$$avg = \sum_{i=0}^{255} H_i \, i \Big/ \sum_{i=0}^{255} H_i \tag{7.12}$$

Bir sonraki adımda, görüntü histogramına göre avg ile 255 arasındaki ortalama rengi ya da yeni durumda eşik değeri (T) Eşitlik 7.13'deki gibi bulunur.

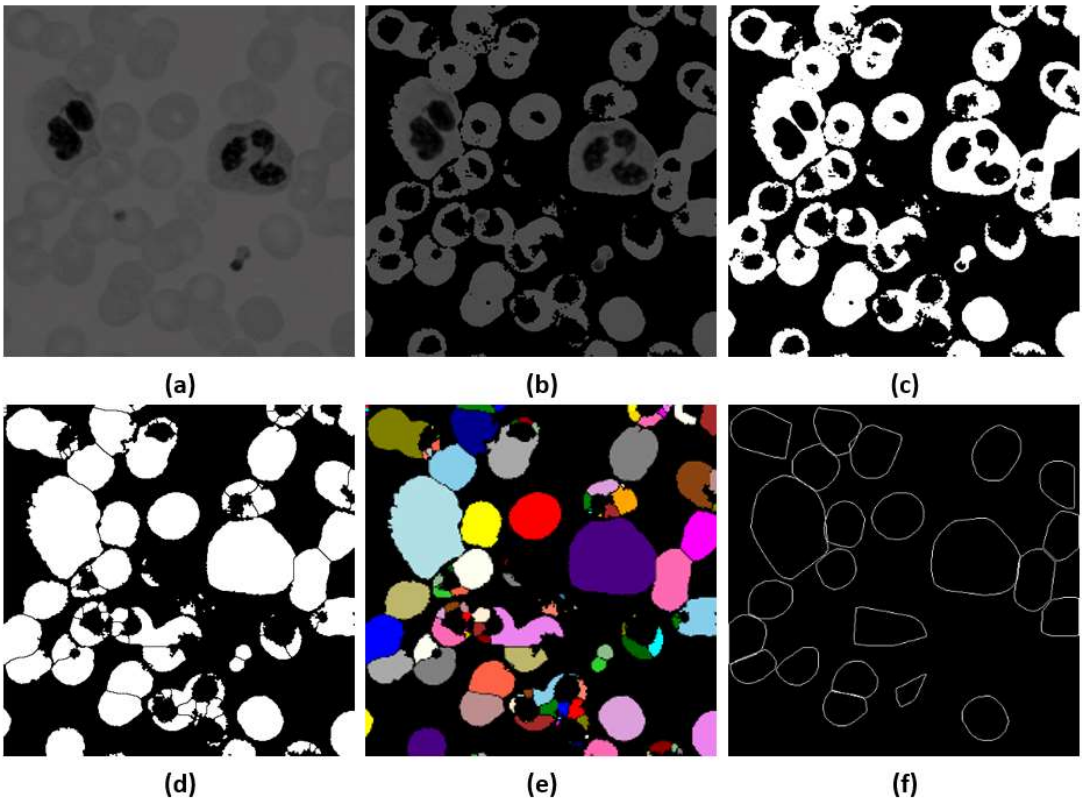
$$T = \sum_{i=avg}^{255} H_i \, i \Big/ \sum_{i=avg}^{255} H_i \tag{7.13}$$

Son işlem adımında ise görüntüdeki her bir piksel için Eşitlik 7.14'deki gibi T eşik değerine göre karşılaştırma yapılarak uygulanır. Böylece sitoplazmalar daha belirgin hale getirilmiş olur.

$$F[x,y] = \begin{cases} 0 & if\ F[x,y] > T \\ F[x,y] & aksi\ durumda \end{cases} \tag{7.14}$$

Şekil 7.5(a)'da dikkat edilecek olursa, arka plan ışıklık değeri ön plana göre daha yüksektir. Bu nedenle aydınlanma değeri ortalamanın üzerinde olan tüm pikseller sıfır yapılarak, nesneler daha güçlü bir şekilde vurgulanmış olacaktır. Bu işlemin ardından Median yumuşatma filtresi ile görüntüdeki istenmeyen gürültüler ortadan kaldırılır ve eşikleme işlemi uygulanır. Böylece sitoplazmanın da içinde bulunduğu tüm nesneler ikili (*binary*) görüntü formuna dönüşmüş olur. Watershed işlemi öncesinde iç bölgeleri boşluklu yapıda olan tüm kan hücreleri için delik doldurma fonksiyonu uygulanarak, özellikle sitoplazmaların hatalı bölütleme yapılması engellenmiş olur.

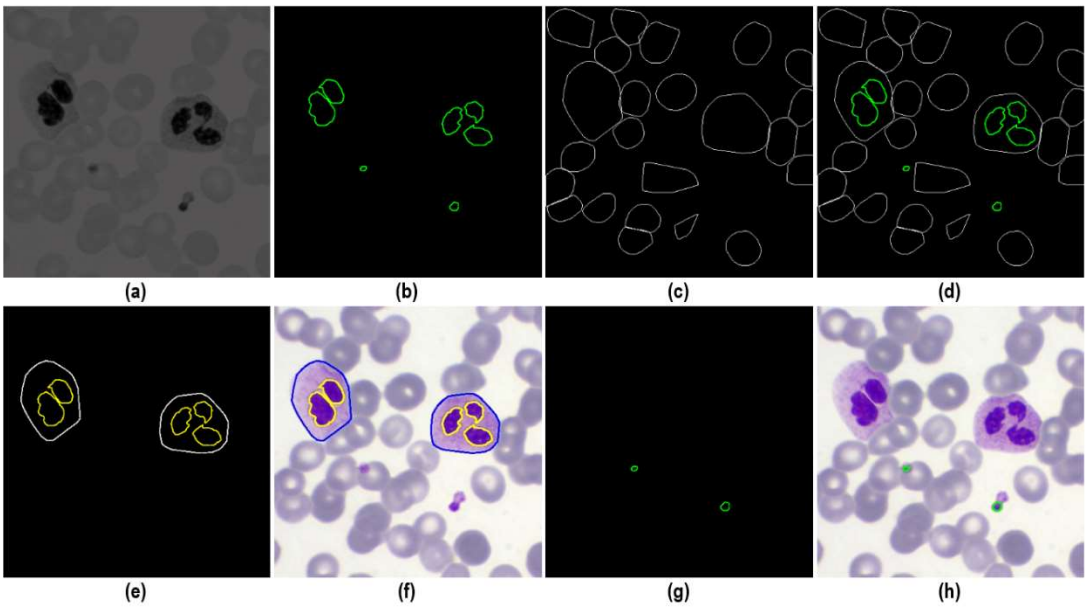
Şekil 7.5(d)'de görüldüğü üzere, her iki lökosite ait sitoplazmanın taslağı optimum şekilde segmente edilmiştir. Daha sonra bileşen etiketleme (CCL) yapılarak, her bir nesnenin benzersiz (*unique*) bir kimliğe sahip olması sağlanmıştır. Bir sonraki adımında ise Eşitlik 6.3'e göre her bir nesnenin gerçek boyutu hesaplanmıştır. Şekil 7.5(f)'deki sonuç görüntüsünde bulunan tüm nesnelerin dış kabuğunu oluşturan noktalar NTF'de olduğu gibi, $P_n = \{[x_0, y_0], [x_1, y_1], \dots, [x_m, y_m]\}$ poligonu olarak saklanır. Daha sonra her bir poligonun maksimum yarıçapı hesaplanır ve Çizelge 2.1'de verilen minimum lökosit çapı ile karşılaştırılarak, bu değere eşit ve büyük olanlar $P_{ST} = \{P_0, P_1, P_2, \dots, P_n\}$ poligon listesine eklenir. Burada dikkat edilirse, P_{ST} poligonları içerisinde sitoplazma haricindeki bazı hücrelerde (genelde RBC) listeye eklendiği görülmektedir. Ancak bu hücreler, Lökosit Extraction işlemi sırasında belirlenen kriterlere uymadığı için elenecektir.



Şekil 7.5. Sitoplazma taslak fonksiyonu işlem adımları; a) ön işleme yapılmış görüntü, b) ön plan güçlendirme ve yumuşatma, c) eşikleme, d) delik doldurma ve Watershed transformu, e) bağlı bileşen etiketleme, f) Graham taraması.

7.2.3. Lökosit ve Trombosit Çıkarımı

Bu bölümde, NTF ve STF işlemlerinden elde edilen binary sonuç görüntüleri bir araya getirilerek tam lökosit çıkartma işlemi yapılmaktadır. Burada NTF'yi f_{NT} ve STF'yi f_{ST} olarak ifade edersek, elde edilen lökosit görüntüsü $f_L = f_{NT} \cup f_{CT}$ şeklinde olacaktır. Ancak NTF ve STF'de bahsedilen durumlardan dolayı lökosit haricindeki diğer kan hücreleri de 'de yer alacaktır. Bunu ortadan kaldırmak için, Şekil 7.6(b)'de görüldüğü üzere NTF ile elde edilen poligonlar (P_{NT}) ve Şekil 7.6(c)'de görüldüğü gibi STF ile elde edilen poligonlar (P_{ST}) için bir kısıt kuralı gereklidir. Buna göre, birleştirilen görüntü üzerinde, $\forall p_n\{n|n \in \mathbb{N}, p_n \in P_{NT}\}$ olmak üzere $p_n \subseteq P_{ST}$ koşulunu sağlayan durumlar aranarak lökositler tespit edilir. Yani en az bir çekirdeği olan her sitoplazma bir lökosittir kuralı işletilmiş olur. p_n poligonu ve P_{ST} poligon listesinde bu koşulu sağlayan her bir poligon, $P_L = \{P_0, P_1, P_2, \dots, P_n\}$ şeklinde lökosit poligon listesine eklenir. Şekil 7.6(f)'de lökosit ekstraksiyon sonucu gösterilmektedir.



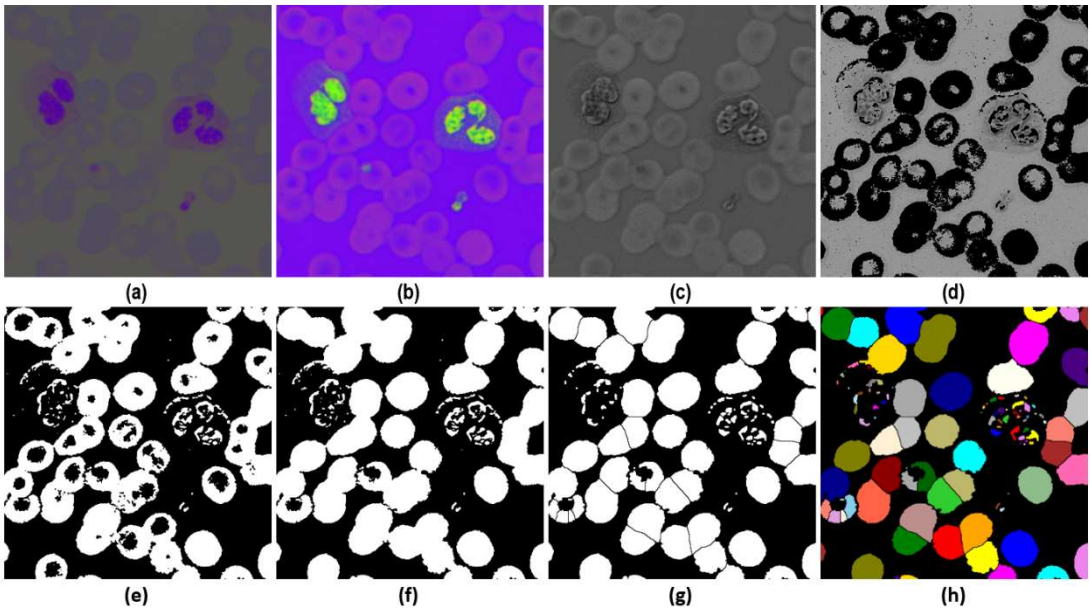
Şekil 7.6. Lökosit ve trombosit çıkarımına ait işlem adımları; a) ön işleme yapılmış görüntü, b) NTF sonucu, c) STF sonucu, d) $f_L = f_{NT} \cup f_{ST}$ sonucu, e) P_L sonucu, f) lökosit çıkarım sonucu, g) P_T sonucu, h) trombosit çıkarım sonucu.

Ancak her p_n poligonu P_{ST}'nin bir alt kümesi olmayabilir. Bu durumda olan poligonlar $p_n \nsubseteq P_{ST}$, lökosit nükleuslarını değil, trombositleri temsil etmektedir.

Böylece P_{NT} poligon listesindeki trombositler $P_T = \{P_0, P_1, P_2, \dots, P_n\}$ şeklinde trombosit poligon listesine eklenir. Şekil 7.6(h)'de trombosit ekstraksiyon sonucu gösterilmektedir.

7.2.4. Eritrosit Taslak Fonksiyonu (NTF) ve Çıkarımı

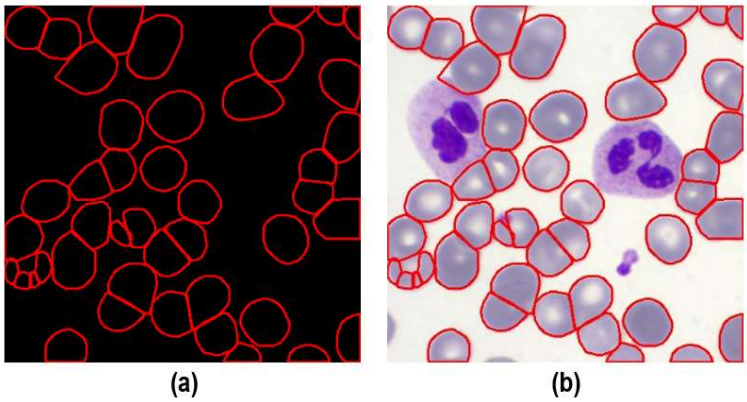
Eritrositler kan hücrelerinin %90'ından fazlasını oluştururlar ve hemen hemen her biri aynı boyuttadır. Genelde periferik kan yayma görüntülerinde üst üste binmiş diskler şeklinde olduğundan ekstraksiyonu çoğu zaman zordur ve bazı durumlarda sayıları gözle bile ayırt edilemeyecek kadar kümelenmiş olurlar. Bu çalışmada eritrositlerin ekstraksiyonu iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak, görüntünün ETF'sini elde etmek için Şekil 7.7'de görüldüğü gibi işlem basamaklarından geçirilir.



Şekil 7.7. Eritrosit bölütleme işlem basamakları; a) ön işleme yapılmış görüntü, b) Kontrast uydurma ve renk tersleme, c) R bandı filtresi, d) ön plan güçlendirme, e) eşikleme ve renk tersleme, f) delik doldurma, g) Watershed transformu, h) bağlı bileşen etiketleme.

İkinci aşamada, etiketlenen her bir bileşenin dış kabuğu Graham Scan metodu ile belirlenir. Bu işlemin ardından, dış kabuğu oluşturan noktalar $P_n = \{[x_0, y_0], [x_1, y_1], \dots, [x_m, y_m]\}$ poligonu olarak saklanır. Son olarak, elde edilen poligonlardan P_L veya P_T'nin alt kümesi olmayanları $p_n \nsubseteq (P_L \cup P_T)$ tespit edilir.

Böylece Şekil 7.8'de görüldüğü gibi eritrositlere ait dış kabuğu oluşturan tüm noktalar bulunarak, segmentasyon süreci tamamlanmış olur.



Şekil 7.8. Eritrosit çıkarımı; a) Graham taraması, b) çıkış görüntüsü.

7.3. LÖKOSİT HÜCRELERİNİN SINIFLANDIRILMASI

Kan hücrelerinin segmente edilmesi sonucunda eritrosit, trombosit ve lökosit hücreleri olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır. Bir sonraki aşama ise lökosit hücrelerinin 5 alt sınıfa ayrılmasıdır. Literatürde önemli konulardan birisi olan lökosit hücrelerinin sınıflandırılması için birçok yöntem önerilmiştir. Bu çalışmamızda yaygın olarak bilinen Destek Vektör Makinesi (DVM), Multinomial Lojistik Regresyon, Naive Bayes, K-En yakın Komşu (kNN), Karar Ağacı Öğrenmesi ve Rasgele Orman olmak üzere 6 farklı makine öğrenme algortiması ile lökosit hücrelerinin sınıflandırılması yapılmıştır.

Algoritmaların eğitim ve test süreçlerinde kullanılmak üzere 350 adet lökosit hücresi seçilmiştir. Örnek lökosit görüntülerinden rasgele seçilerek, 5 farklı oranda eğitim ve veriseti oluşturulmuştur. Örneğin ilk veriseti için 350 lökosit görüntüsünün %25'i olarak 87 tanesi eğitim için, %75'i olarak 263 tanesi ise test amaçlı seçilmiştir. Daha gerçekçi sonuçlar elde etmek için her bir verisetinin rasgele seçilmiş 100 farklı örneği oluşturulmuş ve başarı oranları hesaplanırken bunların ortalaması alınmıştır. Eğitim ve test verileriyle ilgili detaylı çizelgeler Bölüm 8.3'te verilmiştir.

Her bir makine öğrenme algoritması için en kötü, en iyi, ortalama değeler ölçülerek grafikleri çizdirilmiş ve algoritmların birbiriyle karşılaştırmalı sonuçları verilmiştir.

7.4. BİLGİSAYAR DESTEKLİ KONTROL

Geliştirilen motorize mikroskop sisteminin seri haberleşme ve motor kontrolü için Arduino Mega 2560 R3 kartı üzerinde gömülü olarak çalışabilen kodu C++ programlama dili ile geliştirilmiştir. Periferik kan yayma görüntü segmentasyonu ve sınıflandırma işlemleri için C# programlama dili ile sunucu yazılımı geliştirilmiştir.

Sunucu yazılımı ile mikroskop sisteminde gömülü olarak çalışan kodu seri haberleştirme yöntemi ile donanımsal boyutta erişimi sağlanmıştır. Son aşamada ise sistemin uzaktan kontrolü için AJAX tabanlı web ara yüzü oluşturulmuştur. Sunucu yazılımı ile haberleşmeyi sağlamak için MS SQL veritabanı kullanılmıştır.

7.4.1. Seri Haberleşme

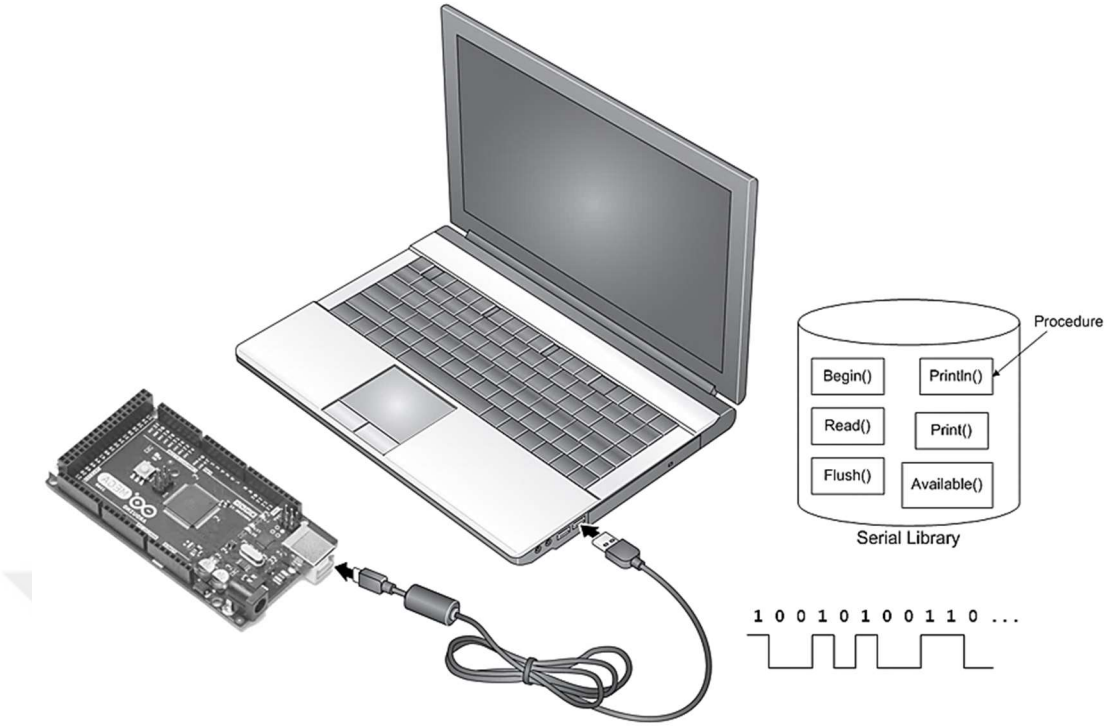
Arduino kartı bir bilgisayar veya diğer cihazlar arasında iletişim kurmak için kullanılır. Tüm Arduino kartlarında en az bir seri bağlantı noktası (ayrıca UART veya USART olarak bilinir) vardır. Kart, dijital pin 0 (RX) ve 1 (TX) üzerinden ve ayrıca USB üzerinden bilgisayarla iletişim kurar.

Arduino Mega'nın üç adet seri portu vardır:

1. Serial1 portu için 19 (RX) ve 18 (TX) pimleri üzerinden,
2. Serial2 portu için 17 (RX) ve 16 (TX) pimleri üzerinden,
3. Serial3 portu için 15 (RX) ve 14 (TX) pimleri üzerinden bağlantı yapılır.

Bu pimleri kişisel bilgisayarınızla iletişim kurmak için kullanılmak istenirse, ek bir USB-to-serial adaptörüne ihtiyaç duyulur. Bu çalışmada, bilgisayar ile Arduino kart haberleşmesi için USB portu kullanılmıştır. Bilgisayar bağlantı şeması Şekil 7.9’da verilmiştir.

Geliştirilen cihazın, bilgisayar destekli kontrolü için Arduino kart üzerinde gömülü olarak çalışan bir komut seti hazırlanmıştır. Komut setindeki her bir işlevin yerine getirilmesi esnasında, gerçekleşen işlem durumlarını sisteme geri bildirimde bulunmak üzere Çizelge 7.2’deki gibi komut durumları döndürülmektedir.



Şekil 7.9. Arduino kart bağlantı şeması.

Çizelge 7.2. Komut durumları.

Komut Durumu	Kodu	Açıklama
COMMAND_STATUS_REQUEST	0	Komut isteğinde bulunuldu.
COMMAND_STATUS_RESPONSE	1	İşlenen komutun yanıtı/sonucu.
COMMAND_STATUS_COMPLETED	2	Komut başarıyla tamamlandı.
COMMAND_STATUS_FAIL	3	Komut işleme başarısız.

Bilgisayara bağlanan kontrol kartına seri iletişim metoduyla gönderilen komutlar, kontrol kartı üzerinde gömülü olarak bulunan algoritma tarafından işlenerek ilgili donanıma iletilir. Bu şekilde mikroskop sistemi ile gerçek zamanlı bir çalışma sağlanmış olur. Çizelge 7.3'de seri haberleşmede kullanılan komut seti verilmiştir.

Çizelge 7.3. Seri haberleşmede kullanılan komut seti.

Komut Adı	Kodu	Açıklama
COMMAND_STOP_ALL	0	Tüm sistemi durdur.
COMMAND_STOP_LAMP	4	Işık kaynağını kapat.
COMMAND_STOP_FAN	5	Soğutma sistemini durdur.
COMMAND_LOCATE_BLOODFILM	6	Sistemi ilgili preparata konumlandır.

Çizelge 7.3. (Devam ediyor).

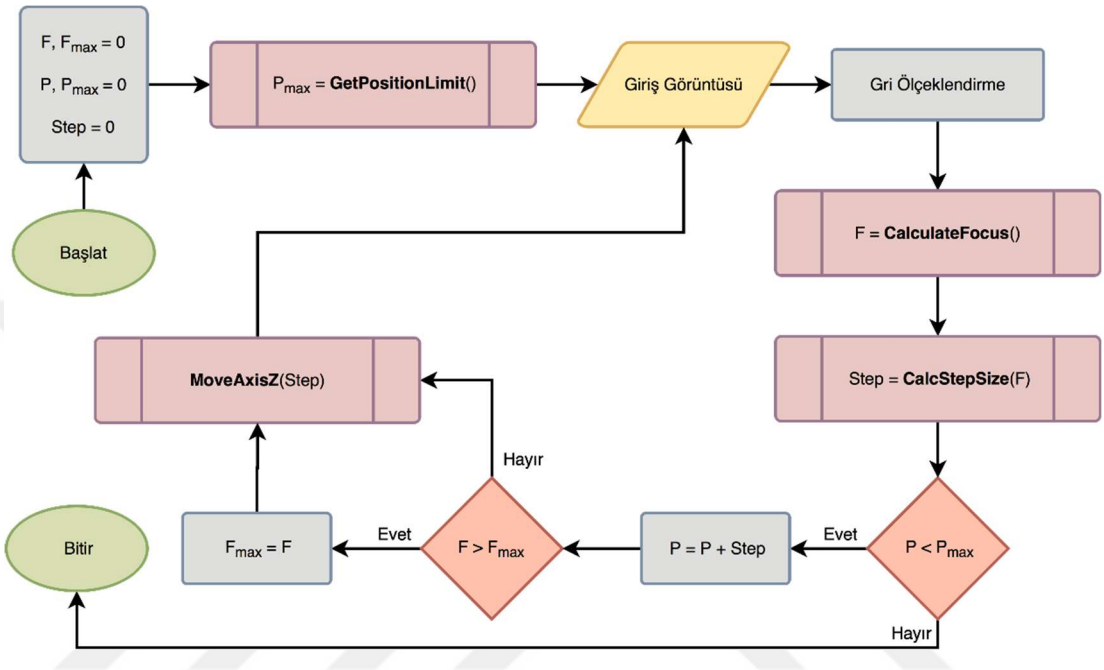
COMMAND_MOVE_X	9	X ekseninde ilerle.
COMMAND_MOVE_Y	10	Y ekseninde ilerle.
COMMAND_MOVE_Z	11	Z ekseninde ilerle.
COMMAND_GET_X	12	X ekseni konum bilgisini ver.
COMMAND_GET_Y	13	Y ekseni konum bilgisini ver.
COMMAND_GET_Z	14	Z ekseni konum bilgisini ver.
COMMAND_GET_FOCUS_VAL	16	Odaklama değerini ver.
COMMAND_GET_ROW	17	Sektör satır numarası.
COMMAND_GET_COL	18	Sektör sütun numarası.
COMMAND_LOCATE_OBJECTIVE	21	Objektifi konumlandır.
COMMAND_LOCATE_INIT_POSITION	23	Sistemi başlangıç konumuna getir.
COMMAND_OPEN_LAMP	24	Işık kaynağını aç.
COMMAND_OPEN_FAN	25	Soğutma sistemini başlat.
COMMAND_FOCUS_START	28	Otomatik odaklamayı başlat.
COMMAND_FOCUS_STOP	29	Otomatik odaklamayı durdur.
COMMAND_SCAN_START	30	Preparat taramayı başlat.
COMMAND_SCAN_STOP	31	Preparat taramayı durdur.
COMMAND_OBJECTIVE_4X	34	Objektifi 4X olarak belirle.
COMMAND_OBJECTIVE_10X	35	Objektifi 10X olarak belirle.
COMMAND_OBJECTIVE_40X	36	Objektifi 40X olarak belirle.
COMMAND_OBJECTIVE_100X	37	Objektifi 100X olarak belirle.

7.4.2. Otomatik Odaklama

Geliştirilen sunucu uygulaması, dijital kamera ve arduino kart ile eş zamanlı olarak haberleşerek otomatik odaklama için gerekli olan tüm durumları kontrol eder. Şekil 7.10'de gösterildiği gibi bu çok aşamalı bir işlemdir. Öncelikli olarak üzerinde çalışılan objektifin büyütme kudretine göre çalışma mesafesi (Working Distance) üst sınırı P_{max} belirlenir. Bu işlem $GetPositionLimit()$ fonksiyonu ile gerçekleştirilir. Daha sonra dijital kamera üzerinden giriş görüntüsü alınır ve gri ölçeklendirme yapılır.

Bir sonraki aşamada ise objektifin konumuna bağlı olarak görüntüye ait odaklama değeri F olarak hesaplanır. Bu F değerine göre sistemin Z ekseninde ne kadar adım ilerleyeceği $CalcStepSize(F)$ fonksiyonu ile $Step$ olarak belirlenir. Daha sonraki aşamada mevcut objektif pozisyonu kontrol edilir. Eğer çalışma mesafesi limitine

ulaştı ise odaklama işlemi sonlandırılır. Aksi durumda mevcut pozisyon $Step$ değeri kadar artılır. Daha sonra, odaklama değeri $F > F_{max}$ ise $F_{max} = F$ olarak yeni değeri belirlenir. Bu şarta bağlı olumlu ve olumsuz her iki durum için de Z ekseni $Step$ değeri kadar hareket ettirilir ve tekrar giriş görüntüsü alınır.



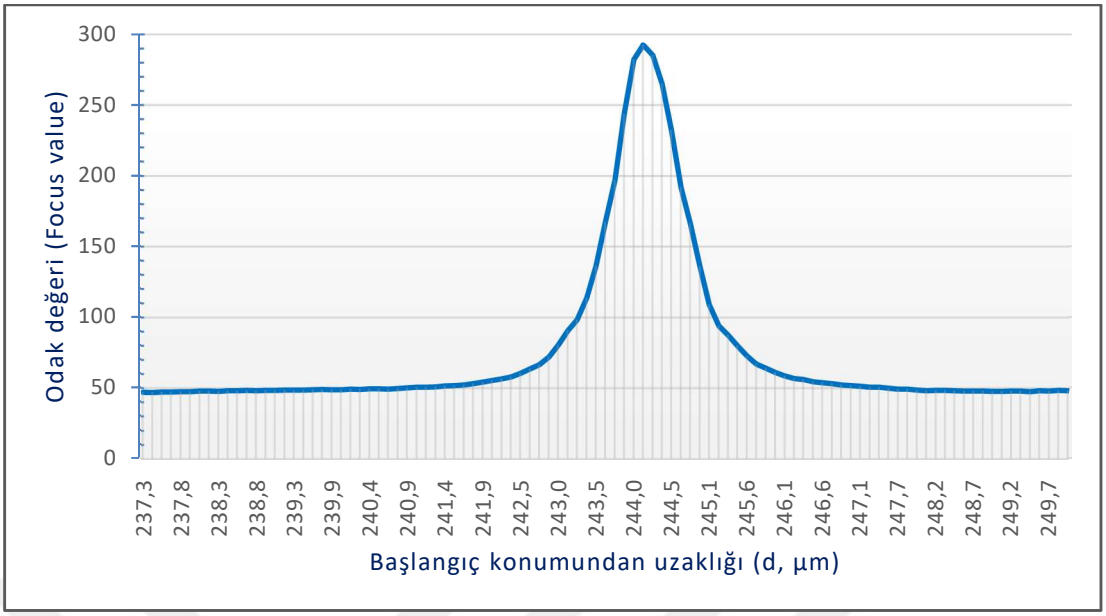
Şekil 7.10. Otomatik odaklama fonksiyonunun genel akış diyagramı.

Tüm bu işlemler, $P < P_{max}$ şartı sağlandığı sürece devam eder. Eşitlik 7.15'te otomatik odaklama fonksiyonu gösterilmektedir.

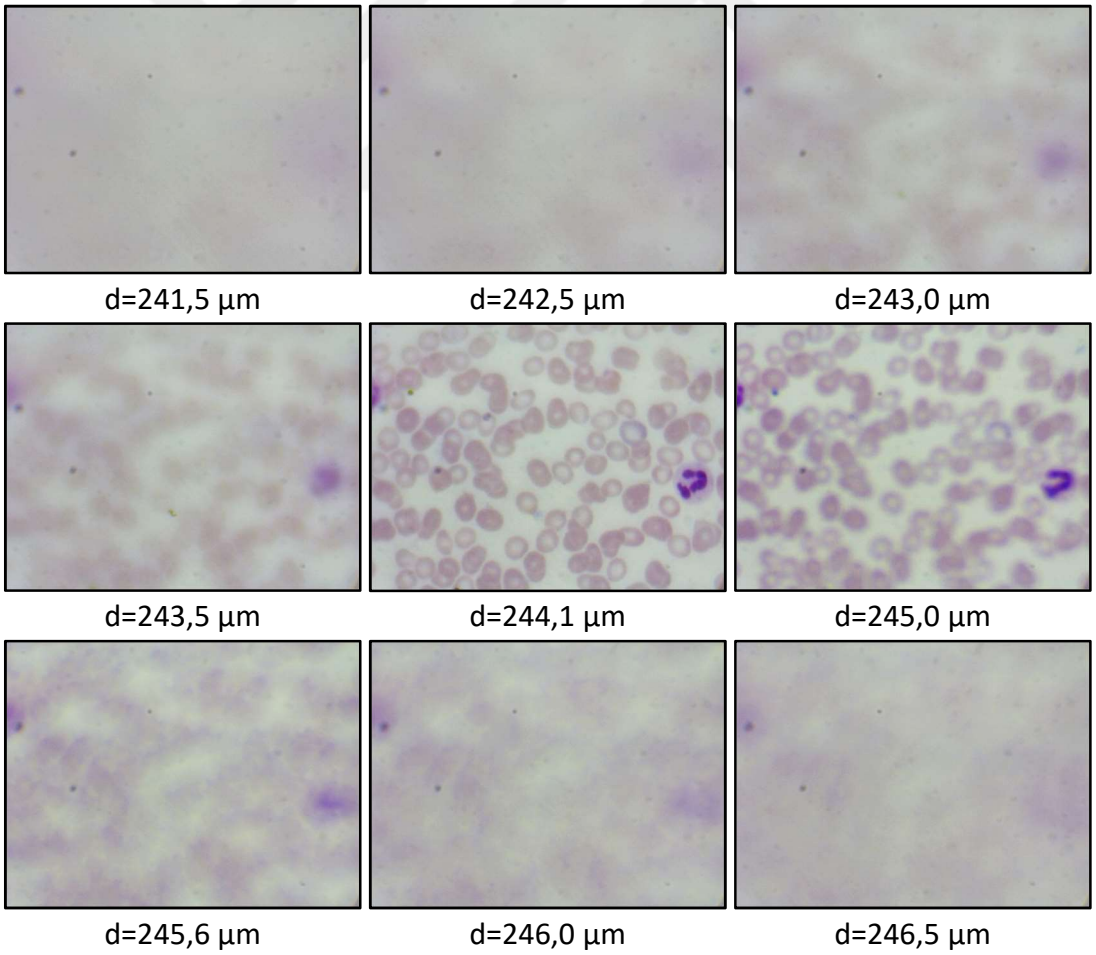
$$focus = -\sum_{i=0}^{n-1} p(I_i)\log_2(I_i)\sqrt{\sum_{i=0}^{n-1}(I_i-\mu)^2\, p(I_i)} \tag{7.15}$$

Gri seviyeli görüntü histogramına göre; μ görüntünün ortalama rengini, I yoğunluk seviyesini, n yoğunluk değerlerinin sayısını temsil etmektedir. Buradaki ifade, görüntü entropisi ile standart sapma çarpımına eşittir.

Şekil 7.11'de otomatik odaklama algoritmasının mikroskop objektifi konumuna göre hesapladığı odak değeleri gösterilmektedir. Şekil 7.12'de görüldüğü üzere otomatik odaklama grafiğinin en yüksek olduğu 244,1 μm mesafesindeki alınan görüntü en net olanıdır.



Şekil 7.11. Otomatik odaklama grafiği.



Şekil 7.12. Odaklama değerine göre elde edilen görüntüler.

7.5. UZAKTAN KONTROL

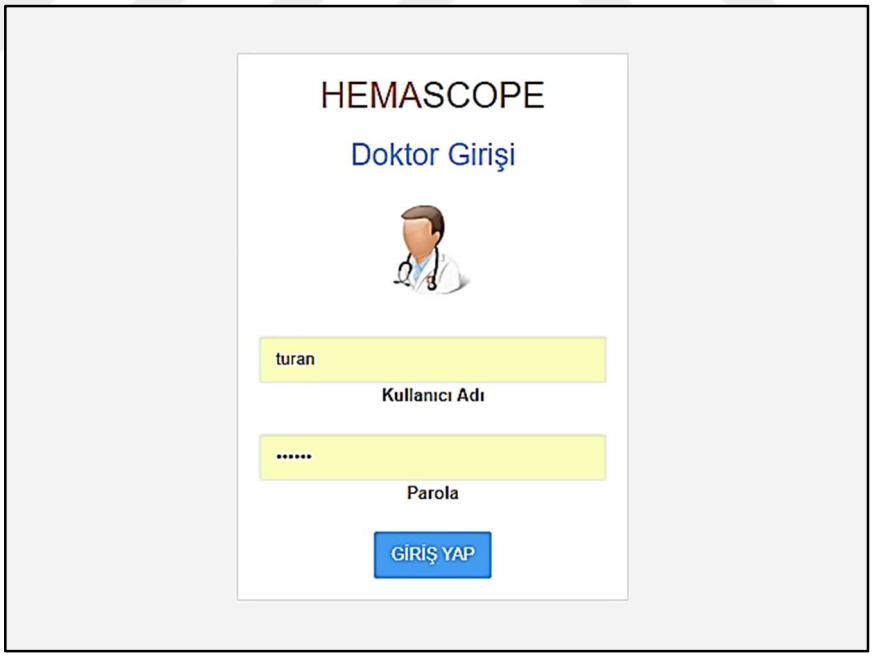
Bu kısımda geliştirilen motorize mikroskop sisteminin uzaktan kontrol amaçlı tasarlanan web arayüzüden bahsedilmektedir.

7.5.1. Sunucu Yazılımı

Sunucu yazılımı için C# .NET platoformunda uygulama arayüzü geliştirilerek, web arayüzünden gelen istekleri karşılamak üzere MS SQL Server üzerinde bir veritabanı oluşturulmuştur.

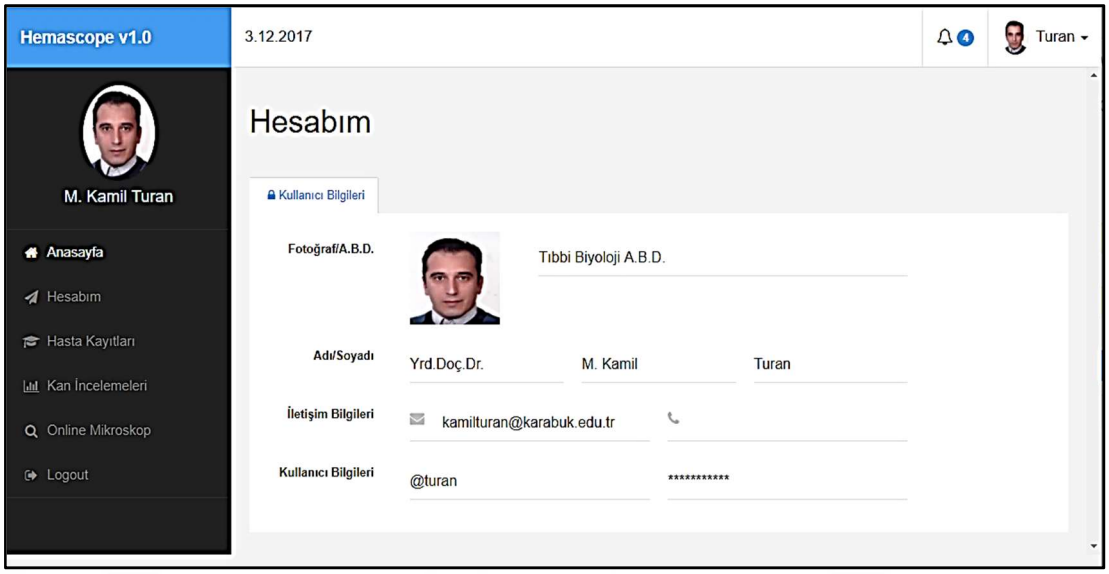
7.5.2. Uzaktan Kontrol İçin Web Uygulaması

Şekil 7.13'de uzaktan kontrol sistemine giriş ekranı verilmiştir. Bu kısımda ilgili uzmana ait kullanıcı adı ve şifre bilgileri girilerek sisteme bağlanması sağlanır.



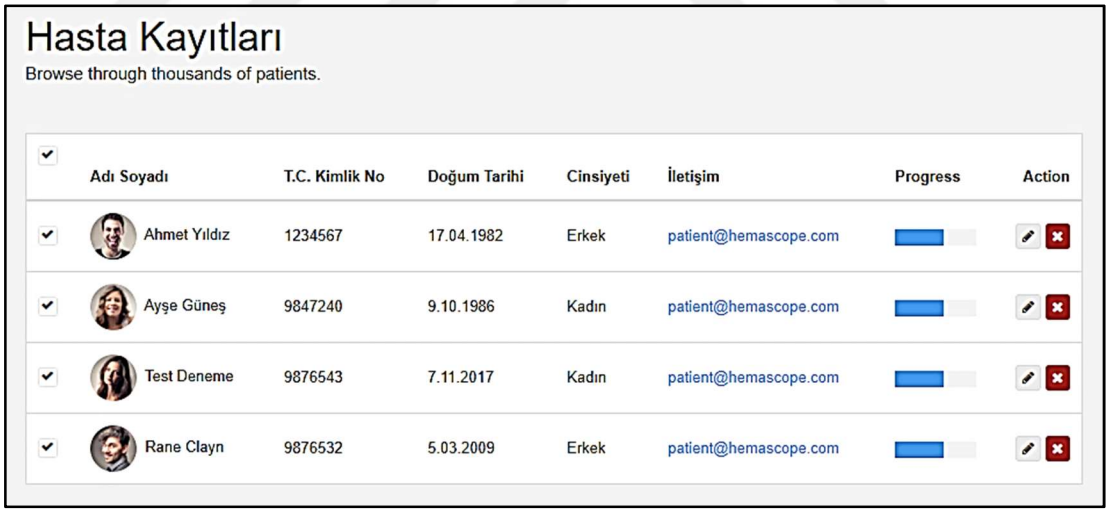
Şekil 7.13. Uzaktan kontrol sistemine giriş ekranı.

Şekil 7.14'de sisteme giriş yapan uzmana ait kullanıcı hesap bilgileri yer almaktadır.



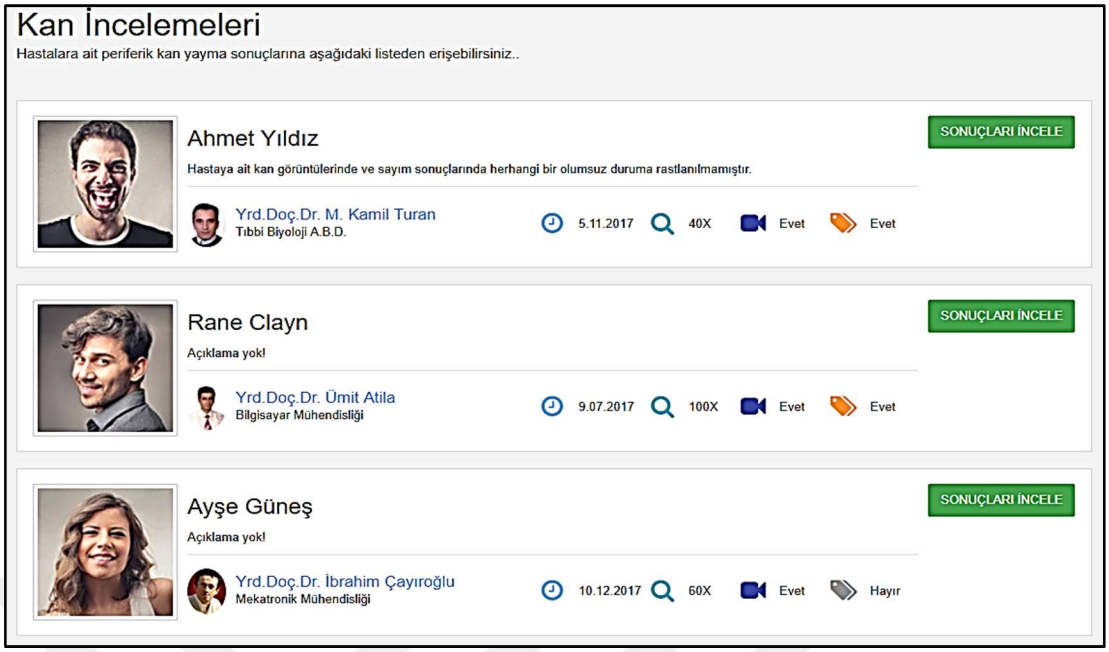
Şekil 7.14. Sisteme giriş yapan uzmana ait kullanıcı bilgi ekranı.

Şekil 7.15'de kan incelemeleri yapılan ve yapılacak olan hastalara ait kayıt listesi yer almaktadır.



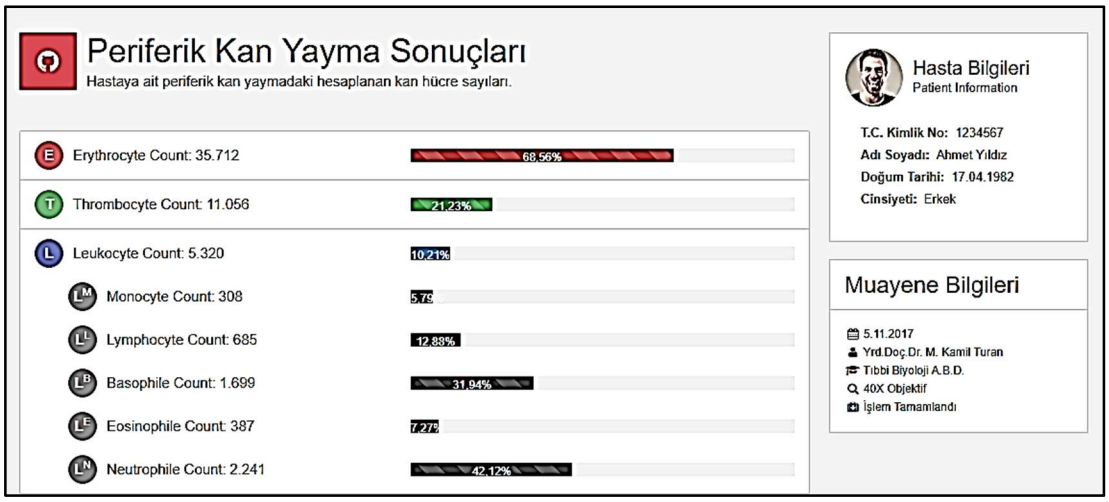
Şekil 7.15. Hasta kayıt listesi.

Şekil 7.16'da hastalara ait kan analiz ve inceleme durumlarını gösteren liste yer almaktadır.



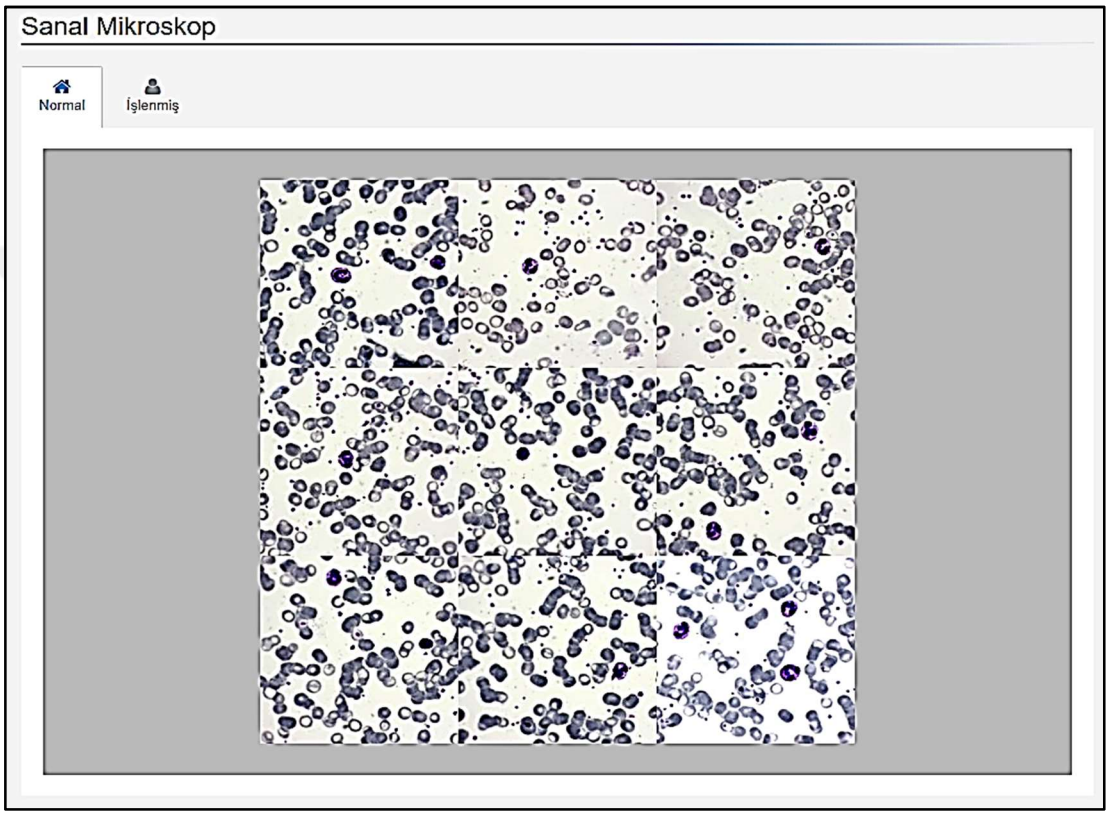
Şekil 7.16. Hastalara ait yapılan kan analizi ve inceleme listesi.

Şekil 7.17'de bir hastaya ait kimlik bilgileri, muayene bilgileri ve periferik kan yayma sonuçlarının detaylı olarak gösterildiği ekran görüntüsü yer almaktadır. Şekil 7.18'de bir hastanın taranan kan görüntülerinin bir araya getirilerek haritasını oluşturan sanal bir mikroskop paneli bulunmaktadır. İlgili uzman asenkron zamanda taranan görüntüleri inceleyebildiği gibi, diğer uzmanlar tarafından da görülmesi ve yorumlanmasına müsaade etmektedir.



Şekil 7.17. Bir hastaya ait detaylı kan yayma sonuçları.

Şekil 7.19'da sisteme bağlanan uzmanın, motorize mikroskop sistemini gerçek zamanlı olarak kontrol edebileceği bir panel yer almaktadır. Bu panelde incelenmekte olan kan yayma preparatının; yatay eksende (X ve Y) hangi konumda olduğu, dikey eksendeki (Z) odak uzaklığını, objektif büyütme değerini, yatay ve dikey eksendeki hareket adım sayısı bilgilerini görebilmektedir.



Şekil 7.18. Bir hastaya ait kan görüntülerinin haritalanması.

Kontrol mekanizması olarak; tabla üzerindeki hangi preparata konumlanacağını belirleyebilme, doğu, batı, kuzey ve güney istikametlerinde sistemi hareket ettirerek preparat üzerinde gezinebilme ve incelenen bölge üzerinde odak ayarı yapabilme gibi yeteneklere sahiptir.

Şekil 7.19. Motorize mikroskop sisteminin gerçek zamanlı çalışabilen olarak uzaktan kontrol paneli.

BÖLÜM 8

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneylerde kullanılan bu kan örnekleri uzman bir hematolog tarafından incelenmiş ve uygulamada elde ettiğimiz sonuçların doğruluğunu onaylamıştır. Deneysel çalışmalarda segmentasyon sonuçlarını analiz etmek için onbir istatistiksel ölçüm uygulanmıştır. Bu ölçümler Çizelge 8.1'de gösterilmektedir. Bunlar sırasıyla; TP (doğru onaylanmış hücreler), TN (doğru reddedilen hücreler), FP (yanlış onaylanan hücreler) ve FN (yanlış reddedilen hücreler) olarak sayılmıştır.

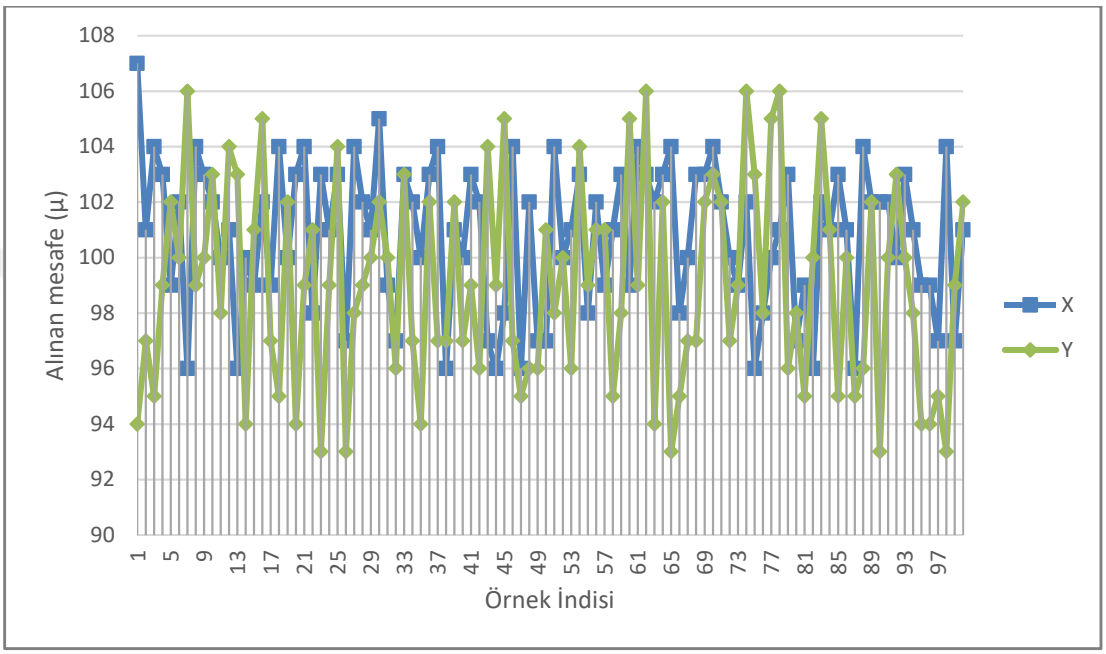
Çizelge 8.1. İstatistiksel ölçümler.

Sensitivity or True Positive Rate	$TPR = \frac{TP}{TP + FN}$	**Bookmaker Informedness**	$BM = TPR + SPC - 1$
Specificity or True Negative Rate	$TNR = \frac{TN}{TN + FP}$	**Markedness**	$MK = PPV + NPV - 1$
Precision or Positive Predictive Value	$PPV = \frac{TP}{TP + FP}$	**Accuracy**	$ACC = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$
Negative Predictive Value	$NPV = \frac{TN}{TN + FN}$	**F-Measurements**	$FM = \frac{2}{\frac{1}{TPR} + \frac{1}{PPV}}$
False Positive Ratio	$FPR = \frac{FP}{TN + FP}$	**Matthews Correlation Coefficient**	
False Negative Ratio	$FNR = \frac{FN}{TP + FN}$	$MCC = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$	

8.1. DONANIM TESTLERİ

Geliştirilen sistemin X ve Y eksenleri lineer hareket mekanizmasında 2 mm hatve çapında triger kayışı ve GT2 senktron 20 dişli kasnak, Z ekseninde ise 8 mm çapında 2 mm hatveli vidalı mil kullanılmıştır. Bu malzemeler genellikle 3D printer yapımında kullanılmaktadır. Bu nedenle üretime dayalı mutlak hata oranları milimetrik düzeye göre belirlenmektedir.

Yapılan konumlandırma testlerinde her iki malzemede de üretim hatasından kaynaklanan mutlak hata oranının, mikrometrik sistemlere göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Şekil 8.1'de X ve Y eksenlerine göre yapılan konumladırma testlerinde mikrometrik düzeydeki sapmalar gösterilmektedir. Bu test işleminde her iki eksende de 100 µm'lik ileri-geri hareket ettirilerek 100'er örnek kaydedilmiştir.



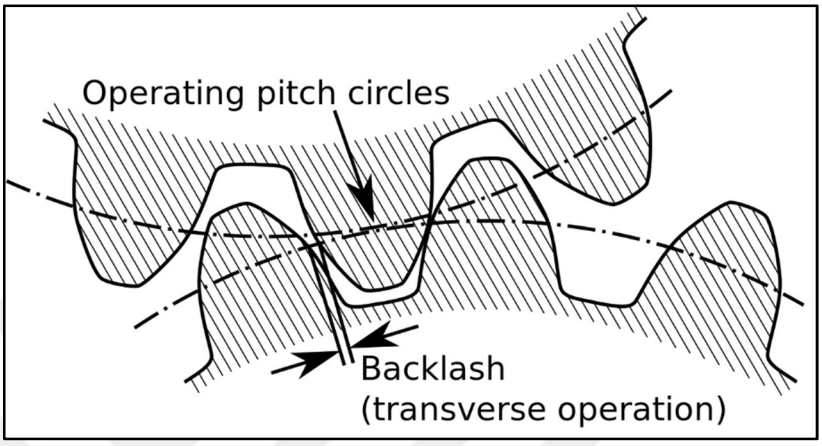
Şekil 8.1. X ve Y eksenlerine göre konumlandırma grafiği.

Yapılan konumlandırma testleri sonucunda X-eksenine göre; alınan mesafe ortalaması 100,81 µm olarak 2,60 standart sapma ile, Y-eksenine göre; alınan mesafe ortalaması 99,04 µm olarak 3,63 Standart sapma ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Detaylı test bilgileri Çizelge 8.2'de verilmiştir.

Çizelge 8.2. X ve Y eksenlerine göre konumladırma testleri.

Parametreler	X-ekseni	Y-ekseni
Örnek Sayısı	100	100
Ortalama	100,81 µm	99,04 µm
Standart Sapma	2,60	3,63
Standart Hata	0,26	0,363
Maksimum	107 µm	106 µm
Minimum	96 µm	93 µm
Korelasyon	-0,05156	

Boşluk (backlash), bir eksenin ters yöndeki hareketi esnasında oluşan hareketsizlik durumudur. Şekil 8.2'de mekanik bir dişli sisteminde bulunan bir boşluk (backlash) gösterilmektedir. Örnek olarak; x-ekseni pozitif yönde 1 mm hareketi için komut verilsin, x-eksen 1 mm hareket edecektir.



Şekil 8.2. Mekanik dişli sistemindeki boşluk (backlash).

Bu işlemin hemen ardından geriye doğru 1 mm ilerlemesi istendiğinde, negatif yönde hareketinin olabilmesi gerekir. Eğer bu hareket gerçekleştirilemiyorsa, sistemdeki mekanik boşluk nedeniyle 1 mm mesafeye hassas olarak dönemiyor demektir. Çizelge 8.3'te geliştirilen Prototip-II'nin mekanik sistemine ait teknik özellikler verilmiştir.

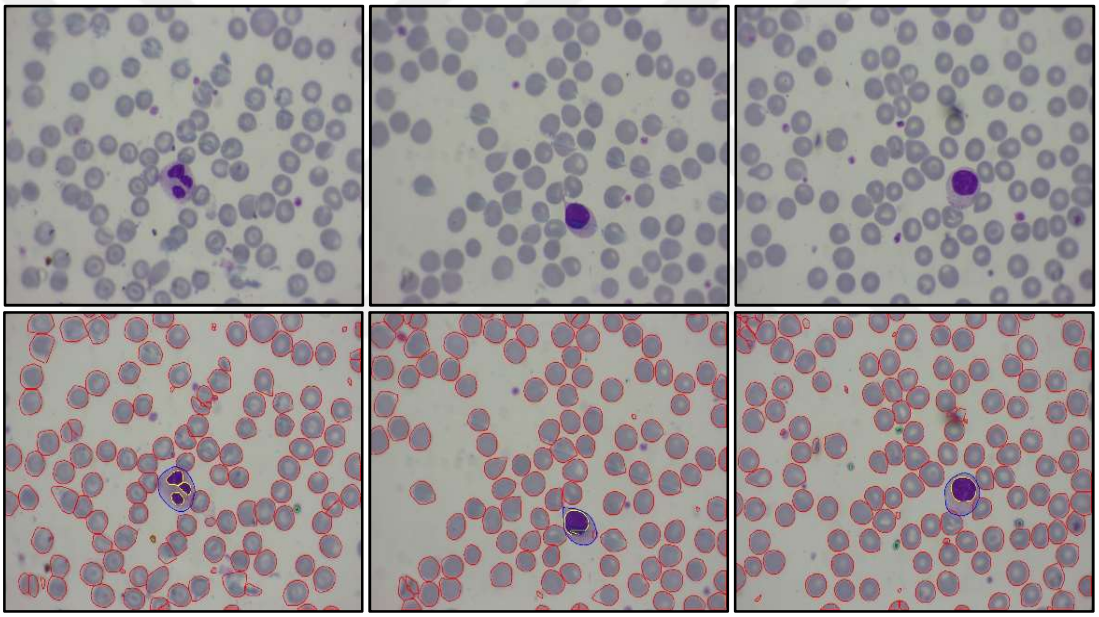
Çizelge 8.3. Mekanik sisteme ait teknik özellikler.

	X-ekseni	**Y-ekseni**	**Z-ekseni**
Hareket mesafesi	120 mm	100 mm	50 mm
Hareket hassasiyeti	10 µm	10 µm	0,065 µm
Boştaki hareket hızı	50 mm/sn	50 mm/sn	0,45 mm/sn
Boşluk (Backlash)	2,33 µm	3,14 µm	-
Eksen ölçüleri	280x350 mm	200x300 mm	300 mm
Sistem ölçüleri (E, B, Y)	400 mm	400 mm	600 mm

8.2. SEGMENTASYON TESTLERİ

Bu kısımda kan hücrelerinin segmentasyonu için geliştirlen algoritmanın örnek kan yayma görüntüleri üzerinde yapılan deneysel çalışmaları ele alınmıştır. Deneylerde kullanılan görüntüler 100X büyütme kudretine sahip objektif aracılığıyla çekilmiştir. Farklı ışık değerlerine sahip iki farklı görüntü veriseti oluşturularak, algoritmanın genel başarı oranı hesaplanması amaçlanmıştır.

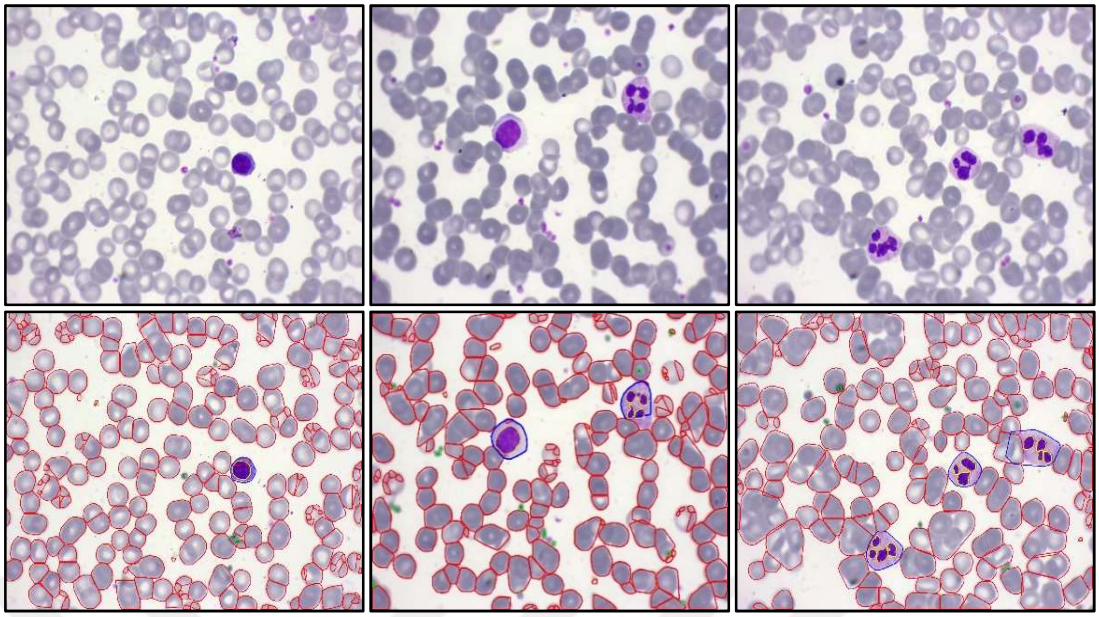
Görüntü verisetleri Şekil 8.3 ve Şekil 8.4'te gösterilmektedir. Bu verisetlerine ait segmentasyon sonuçları ise Çizelge 8.4 ve Çizelge 8.5'te verilmiştir.



Şekil 8.3. Dataset-1.

Çizelge 8.4. Dataset-1 sonuçları.

	TPR	TNR	PPV	NPV	FPR	FNR	BM	MK	ACC	MCC	FM
WBC çekirdeği	95,77	99,97	98,55	99,91	0,03	0,09	95,75	98,46	99,89	97,10	97,14
WBC	96,97	99,94	94,12	99,97	0,06	0,03	96,91	94,09	99,92	95,49	95,52
Lökosit	96,37	99,96	96,33	99,94	0,04	0,06	96,33	96,28	99,90	96,29	96,33
Trombosit	79,17	99,56	88,37	99,13	0,44	0,87	78,73	87,50	98,74	83,00	83,52
Eritrosit	97,67	67,21	96,38	76,31	32,79	23,69	64,88	72,69	94,60	68,67	97,02



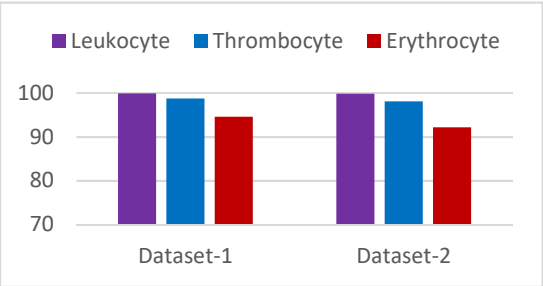
Şekil 8.4. Dataset-2.

Çizelge 8.5. Dataset-2 sonuçları.

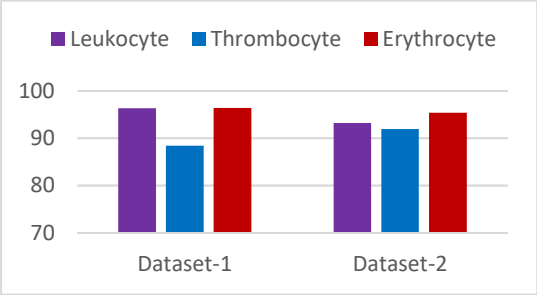
	TPR	TNR	PPV	NPV	FPR	FNR	BM	MK	ACC	MCC	FM
WBC çekirdeği	93,10	99,92	94,74	99,90	0,08	0,10	93,03	94,64	99,82	93,83	93,91
WBC	89,19	99,92	91,67	99,90	0,08	0,10	89,11	91,57	99,82	90,33	90,41
Lökosit	91,15	99,92	93,20	99,90	0,08	0,10	91,07	93,10	99,82	92,08	92,16
Trombosit	86,41	99,23	91,91	98,64	0,77	1,36	85,64	90,54	98,06	88,06	89,08
Eritrosit	95,43	73,96	95,37	74,20	26,04	25,80	69,39	69,57	92,19	69,48	95,40

Geliştirilen yöntemin test edilmesinde kullanılan iki datasetin ortalama değerleri Çizelge 8.6'da verilmiştir. Buna göre, lökositlerin segmentasyonunda doğruluk oranı %99,86 ve kesinlik oranı ise %94,77'lik bir başarı oranıyla gerçekleştirilmiştir. Bu durum tombositlerde doğruluk oranı %98,4 olduğu halde, kesinlik oranı %90,14'lik bir skor sergilemiştir. Bilindiği üzere trombositlerin lökositlere göre çok daha küçük çapta olmaları, preparat üzerindeki boya kalıntıları vb. nedenlerden dolayı bu oran biraz daha düşük kalmıştır. Bu çalışmaya göre, trombosit segmentasyonunda NTF'nin ortak kullanılması yerine, ayrı bir Trombosit Template Function (TTF) tasarlanması daha iyi bir sonuçlar verebilir. Son olarak, eritrositlerin segmentasyon durumlarına baktığımızda doğruluk oranının %93,4 olduğunu ve kesinlik değerinin de %95,88 olarak birbirine yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak Dataset-2'deki görüntüler incelendiğinde, Dataset-1'e göre eritrositlerin segmentasyonunun

biraz daha zor olacağı anlaşılmaktadır. Bu nedenle Dataset-2'deki doğruluk oranı biraz daha düşük kalmıştır. Şekil 8.5'de segmentasyon sonuçlarının Accuracy ve Precision ölçüm grafikleri gösterilmektedir.



a) Accuracy (ACC) (%)



b) Precision (PPV) (%)

Şekil 8.5. Dataset sonuçlarının karşılaştırılması.

Çizelge 8.6. Dataset-1 ve Dataset-2'nin ortalama değerleri.

	TPR	TNR	PPV	NPV	FPR	FNR	BM	MK	ACC	MCC	FM
WBC çekirdeği	94,44	99,95	96,64	99,91	0,05	0,09	94,39	96,55	99,86	95,46	95,53
WBC	93,08	99,93	92,89	99,94	0,07	0,06	93,01	92,83	99,87	92,91	92,97
Lökosit	93,76	99,94	94,77	99,92	0,06	0,08	93,70	94,69	99,86	94,19	94,25
Trombosit	82,79	99,40	90,14	98,88	0,60	1,12	82,19	89,02	98,40	85,53	86,30
Eritrosit	96,55	70,59	95,88	75,25	29,41	24,75	67,13	71,13	93,40	69,08	96,21

Önerdiğimiz metot için segmentasyon sonuçlarını literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırdık. Lökosit segmentasyon sonuçları Çizelge 8.7'de, eritrosit segmentasyon sonuçları Çizelge 8.8'de ve trombosit segmentasyon sonuçları Çizelge 8.9'da verilmiştir.

Çizelge 8.7. Lökosit değerlerinin karşılaştırılması.

Yöntemler	TPR	TNR	PPV	NPV	ACC	MCC
Prinyakupt and Pluempitiwiriyawej[156]	—	92,50	—	92,30	—	—
Alomari[157]	89,70	98,40	89,73	—	98,40	—
Vale vd.[158]	94,87	99,75	99,74	95,11	97,31	94,73
Geliştirdiğimiz yöntem	93,76	99,94	94,77	99,92	99,86	94,19

Prinyakupt and Pluempitiwiriyawej [156], combined thresholding, morphological operation ve ellipse curve fitting işlem adımlarını uygulayarak, çekirdek ve

sitoplazma ekstraksiyonunu yüksek başarı oranıyla yapmışlardır. Ancak nükleus segmentasyon bölümünde morfolojik operatörlerin uygulanmasındaki tekrar sayısı görüntüden görüntüye farklılık göstereceği bilinmektedir. Örneğin, yeterince erezyon yapılmadığı taktirde görüntüde gürültüler olacaktır. Bu nedenle otomatik segmentasyon yöntemlerine çok uygun bir yapı değildir.

Alomari vd. [157], WBC ve RBC hücrelerinin segmentasyonu için iterative structured circle detection algoritması önermiştir. Yapılan testlerde WBC için %98'in üzerinde bir doğruluk (*accuracy*) oranı ve %90'a yakın bir kesinlik başarısı elde etmiştir. Ancak WBC'lerin doğası gereği fizyolojik yapıları düzenli (*regular*) değildir. Bu nedenle dairesel yaklaşım metotları lökositler için her zaman uygun olmayabilir. Tahmin edileceği üzere RBC'ler için bu dairsel yöntem yaklaşımı daha başarılı sonuçlar vermiş. Ancak üst üste yığılmış veya tam dairsel olmayan düzensiz yapıdaki eritrositlerde iyi sonuç verememiştir. Bizim çalışmamızda Convex Hull yöntemini uygulamış olmamız, özellikle düzensiz yapıdaki kan hücreleri için bir esneklik sağlamaktadır. Vale vd. [158], giriş görüntülerinin RGB renk uzayına göre yeşil bileşenini kullanmışlardır. Bu bileşene göre elde ettikleri histogramdaki tepe noktaları ve lökosit çekirdeği merkezi ile geri kalan pikseller arasındaki Öklid uzaklığını Fuzzy kümeleri yardımıyla otomatik olarak hesaplamışlar. Sonuçlara göre, hem lökosit hem de eritrosit segmentasyonunda %95'in üzerinde başarı elde etmişlerdir.

Çizelge 8.8. Eritrosit değerlerinin karşılaştırılması.

Yöntemler	TPR	TNR	PPV	NPV	ACC	MCC
Alomari[157]	95,00	98,00	95,39	—	97,50	—
Vale vd.[158]	97,96	92,82	93,17	97,85	95,39	90,90
Khajehpour vd.[159]	97,99	45,09	97,76	47,91	95,91	44,36
Angulo and Flandrin[160]	97,29	89,53	88,88	97,46	93,12	86,59
Geliştirdiğimiz yöntem	96,55	70,59	95,88	75,25	93,40	69,08

Khajehpour vd. [159], binary dönüşümü yapılmış görüntüye Euclidian distance transform uygulamışlar. Bu işlem sonucuna göre elde ettikleri gray scale görüntüye de Watershed yöntemini uygulayarak, eritrosit hücrelerini yüksek başarı oranıyla segmente etmişlerdir. Angulo and Flandrin [160], eritrosit segmentasyoun için iki

aşamadan oluşan bir yöntem önermişlerdir. İlk adımda, görüntü analizi için matematiksel morfoloji yöntemlerini uygulayarak eritrosit çıkarımı, eritrosit merkezlerini ve merkeziyle birlikte eritrositleri elde etmişler. İkinci adımda ise, bu üç parametreye göre bağlı bileşenlerin sayısı, yayılma ve örtüşme katsayıları hesaplayarak segmentasyon işlemi yapan otomatik bir yöntem önermişlerdir.

Çizelge 8.9. Trombosit değerlerinin karşılaştırılması.

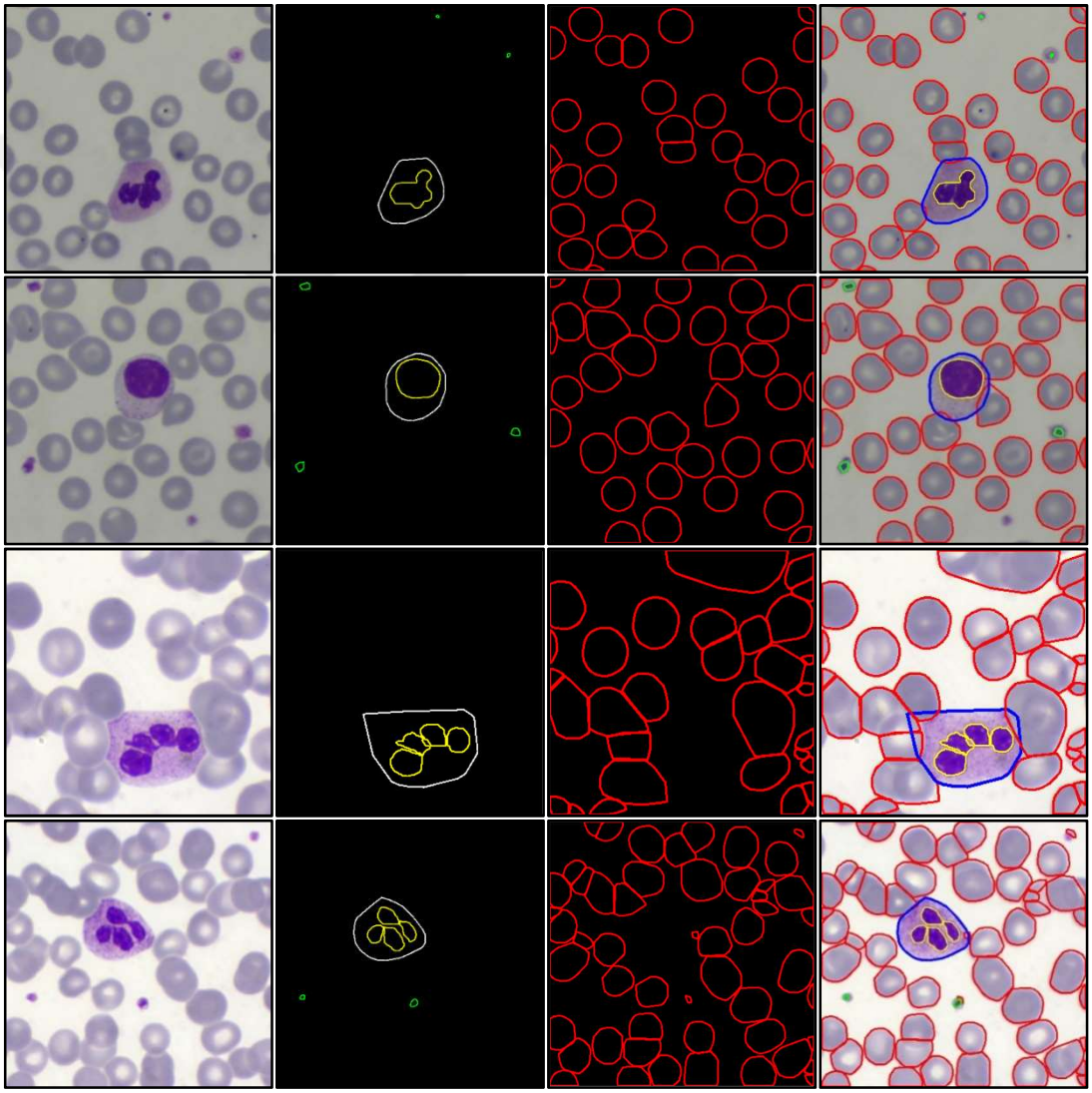
Yöntemler	TPR	TNR	PPV	NPV	ACC	MCC
Dey vd.[26]	—	—	—	—	92,71	—
Geliştirdiğimiz yöntem	82,79	99,40	90,14	98,88	98,40	85,53

Dey vd. [26], kan yayma görüntülerinden trombosit segmentasyonu için color-based bir algoritma önermiştir. Yöntemde giriş görüntüsü RGB'den L*a*b renk uzayına dönüştürerek, *a ve *b bileşenleri üzerinden görüntü işleme yapılmıştır. Bilindiği üzere trombositlerde WBC'ler gibi aynı renkte boyanır. Bu nedenle, renk tabanlı segmentasyon yöntemlerinde bunları birbirinden ayırmak zordur. Ancak WBC'ler genelde daha büyük çapta oldukları için boyut karşılaştırması yapılarak bu sorun önemli ölçüde giderilebilir. Bununla beraber bazı lenfositlerin çapları, trombositlerin çapına yakın olabilmektedir. Böyle durumlarda daha yüksek başarı elde edebilmek için hücre sitoplazmasının olup olmadığına bakılması gerekecektir.

Bu çalışmada, tam otomatik bir segmentasyon yöntemi geliştirilerek, farklı ışık ve yayma koşullarında elde edilen periferik kan yayma görüntülerindeki lökosit, eritrosit ve trombositlerin segmentasyonu için yeni bir bakış açısı sunmaktadır.

Önerilen yöntem kanın şekillendirilmiş elemanlarını beş aşamalı olarak parçalara ayırır. Birincisi, lökosit ve trombosit hücreleri için normalleştirilmiş bir gri tonlamalı görüntü üretir. İkincisi, lökosit çekirdeği ve trombosit için bir poligon listesi oluşturur. Üçüncü olarak, lökosit sitoplazması için bir poligon listesi oluşturur. Dördüncüsü, ikinci ve üçüncü basamaklarda belirtilen poligonları kullanarak lökosit ve trombosit çıkarır. Beşinci olarak, eritrosit için bir poligon listesi oluşturur ve tüm poligon listelerini kullanarak eritrosit hücrelerini çıkarır.

Her bir kan yayma görüntüsü ve görüntünün bileşenleri, küme/alt küme olarak ele alınmış olması hatalı hücre segmentasyonunu azaltmaktadır. Ayrıca görüntü bileşenlerinin poligon olarak saklanması hücre fizyolojisi açısından hesaplama esnekliği sağlamaktadır. Böylece, kan hastalıkları üzerine yapılacak olan çalışmalar için anormal hücrelerin değerlendirilmesinde büyük ölçüde yardımcı olacağı düşünülmektedir. Şekil 8.6'da tüm süreci gösteren detaylı örneklere yer verilmiştir. Önerilen yöntem lökosit hücrelerinde çok yüksek bir başarı göstermiştir.



Şekil 8.6. Ayrıntılı segmentasyon örnekleri. İlk sütunda orijinal görüntüler, ikincisi lökositler ve trombositler, üçüncüsü eritrositler, son kolon segmentasyon sonuçları.

Trombositler için daha öncede bahsedildiği gibi, lökosit segmentasyonundan ayrı olarak bir görüntü işleme yapılması ile daha iyi sonuçlar alınabilir. Eritrositlerde ise

üst üste yığılmış hücre öbeklerinin segmentasyonu önemli bir sorundur. Ancak bu çalışmada oldukça başarılı bir sonuç elde edilmiştir. Segmente edilemeyen hücre öbekleri için distance transform ya da ROI tabanlı lokal segmentasyon yöntemi geliştirilerek performans artışı sağlanabilir.

8.3. LÖKOSİT SINIFLANDIRMA TESTLERİ

Geliştirilen mikroskop sisteminden elde edilen 350 lökosit örneği üzerinden makine öğrenme algoritmalarını kullanarak sınıflandırma başarıları test edilmiştir. Lökosit sınıflandırma işlemlerinde kullanılan her bir örnek görüntü için 32 adet özellik çıkarımı yapılmıştır. Şekil 8.7'de istatistiksel ve geometrik olarak çıkarılan özellikler verilmiştir.

	Lökosit	Nükleus
Yarıçap	Var	Var
Alan	Var	Var
Çevre	Var	Var
Dairesellik	Yok	Var
Doluluk	Yok	Var
Kompaktlık	Yok	Var
Nük.Lob Sayısı	Var	Yok
pL/pN	Lökositin nükleus çevresine oranı	
aL/aN	Lökositin nükleus alanına oranı	

(a)

		R	G	B
Lökosit	Std.Dev.	+	+	+
	Mean	+	+	+
	Kurtosis	+	+	+
	Energy	-	-	-
Nükleus	Std.Dev.	+	+	+
	Mean	+	+	+
	Kurtosis	+	+	+
	Energy	+	+	+

(b)

Şekil 8.7. Lökosit hücrelerinin sınıflandırmasında kullanılan özellikler; a) geometrik özellikler, b) istatistiksel özellikler.

Makine öğrenme algoritmalarının eğitim ve teslerinde parametre olarak kullanılan geometrik ve istatistiksel özniteliklerin Çizelge 8.10'da açıklamaları verilmiştir.

Çizelge 8.10. Lökosit sınıflandırmasında kullanılan özelliklerin açıklamaları.

cRadius:	Lökosit yarıçapı	**nCircularity:**	Nükleus daireselliği
cArea:	Lökosit alanı	**nCompactness:**	Nükleus kompaktlığı
nucleus:	Hücredeki çekirdek sayısı	**nrKurtosis:**	Nükleus kırmızı bant basıklığı

Çizelge 8.10. (Devam ediyor)

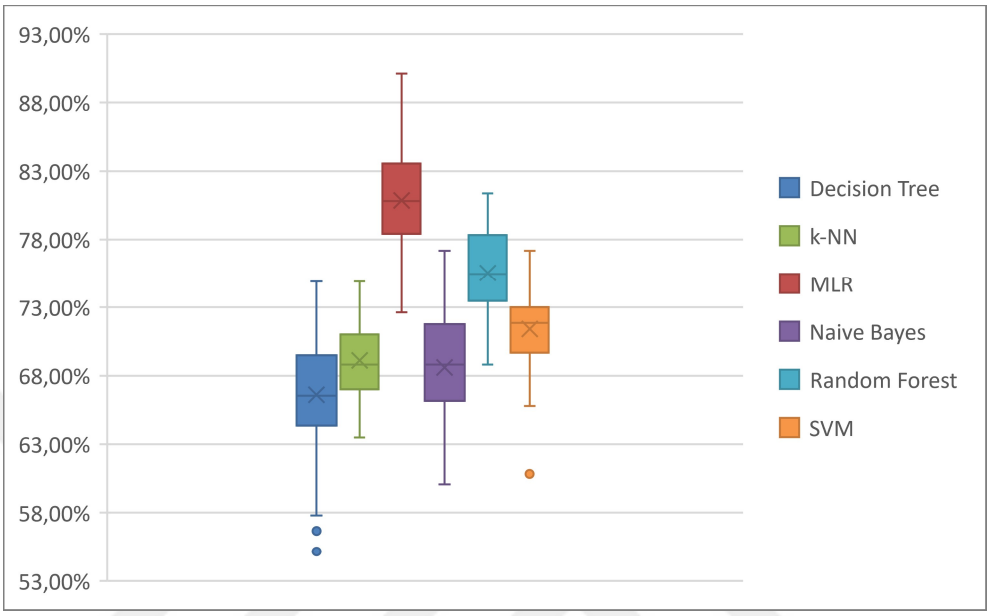
crKurtosis:	Lökosit kırmızı bant basıklığı	**ngKurtosis:**	Nükleus yeşil bant basıklığı
cgKurtosis:	Lökosit yeşil bant basıklığı	**nbKurtosis:**	Nükleus mavi bant basıklığı
cbKurtosis:	Lökosit mavi bant basıklığı	**nrStdDev:**	Nükleus kırmızı kanal standart sapması
crMean:	Lökosit kırmızı bant ortalaması	**ngStdDev:**	Nükleus yeşil kanal standart sapması
cgMean:	Lökosit yeşil bant ortalaması	**nbStdDev:**	Nükleus mavi kanal standart sapması
cbMean:	Lökosit mavi bant ortalaması	**nrEnergy:**	Nükleus kırmızı bant enerjisi
crStdDev:	Lökosit kırmızı bant standart sapması	**ngEnergy:**	Nükleus yeşil bant enerjisi
cgStdDev:	Lökosit yeşil bant standart sapması	**nbEnergy:**	Nükleus mavi bant enerjisi
cbStdDev:	Lökosit mavi bant standart sapması	**nrMean:**	Nükleus kırmızı bant ortalaması
nRadius:	Nükleus yarıçapı	**ngMean:**	Nükleus yeşil bant ortalaması
nFullness:	Nükleus doluluğu	**nbMean:**	Nükleus mavi bant ortalaması
nArea:	Nükleus alanı	**pC/pN:**	Lökosit'in nükleus çevresine oranı
nPerimeter:	Nükleus çevresi	**aC/aN:**	Lökosit'in nükleus alanına oranı

Çizelge 8.11'de eğitim ve test süreçlerinde kullanılmak üzere farklı oranlarda oluşturulan verisetleri verilmiştir. Çizelgedeki her bir veri seti $vs(Eğitim, Test)$ formatında 350 lökosit görüntüsünü farklı oranlarda eğitim ve test için rasgele olarak 100'er örneği hazırlanmıştır.

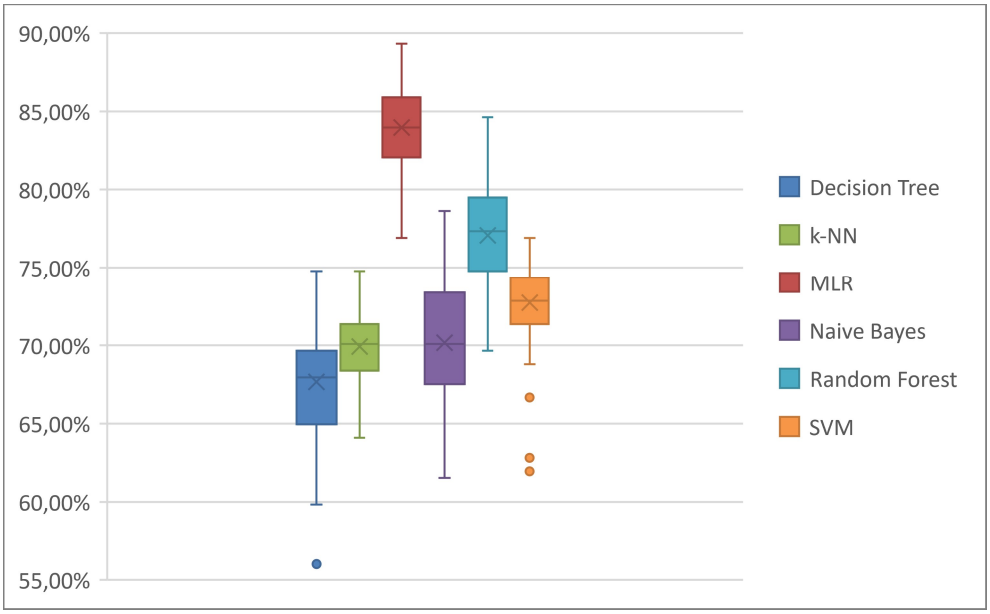
Çizelge 8.11. Oluşturulan veri setleri ve özellikleri.

Veri Seti	**Örnek Sayıları**			**Eleman Sayısı**	**Parametre Sayısı**
	Toplam	**Eğitilen**	**Test Edilen**		
$vs(25, 75)$	350	87 (%25)	263 (%75)	100	32
$vs(33, 67)$	350	116 (%33)	234 (%67)	100	32
$vs(50, 50)$	350	175 (%50)	175 (%50)	100	32
$vs(67, 33)$	350	234 (%67)	116 (%33)	100	32
$vs(75, 25)$	350	263 (%75)	87 (%25)	100	32

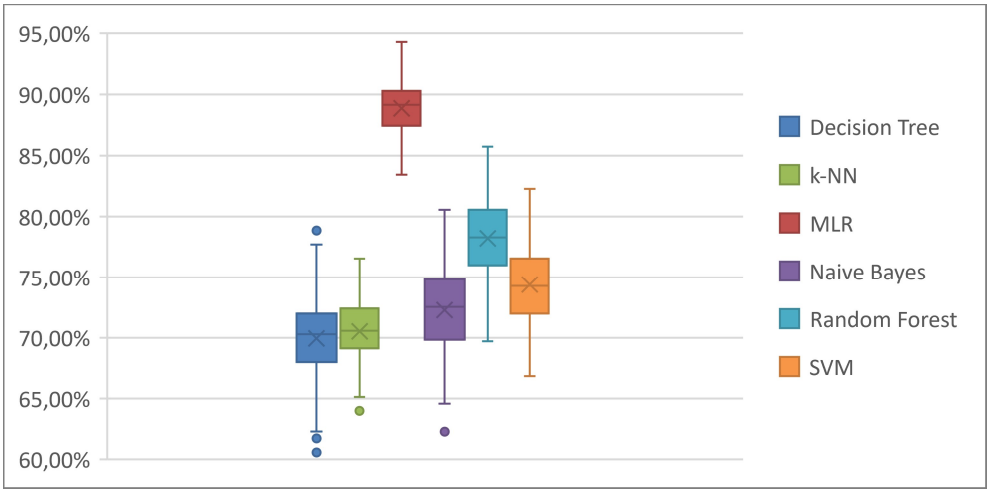
Verisetlerine göre makine öğrenme algoritmalarının tahmin sonuçlarına ait veri dağılım grafikleri sırasıyla Şekil 8.8, Şekil 8.9, Şekil 8.10, Şekil 8.11 ve Şekil 8.12'de gösterilmektedir.



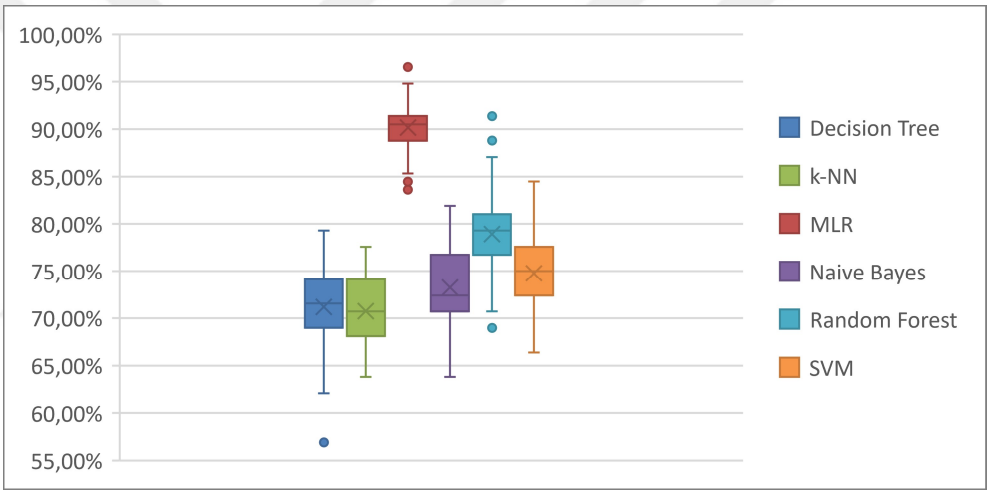
Şekil 8.8. vs(25, 75)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı.



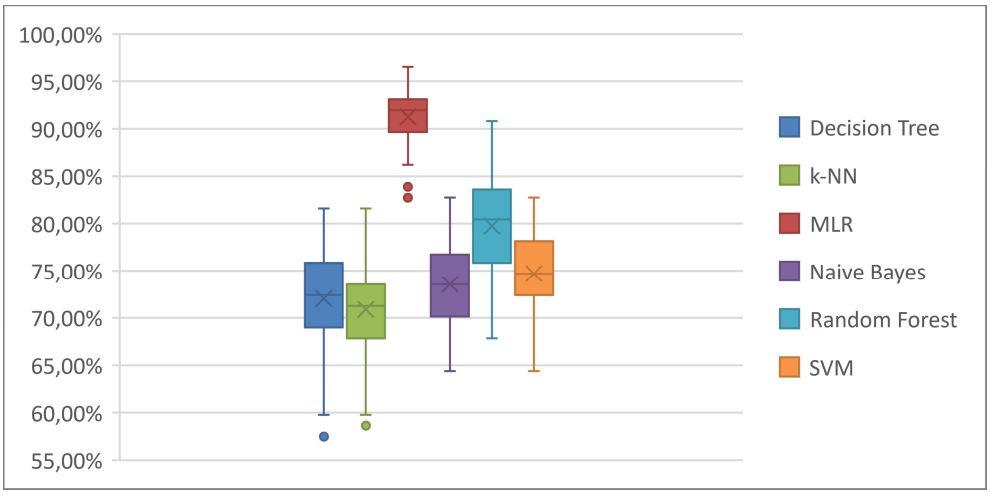
Şekil 8.9. vs(33, 67)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı.



Şekil 8.10. vs(50, 50)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı.



Şekil 8.11. vs(67, 33)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı.



Şekil 8.12. vs(75, 25)'e göre tahmin sonuçlarının veri dağılımı.

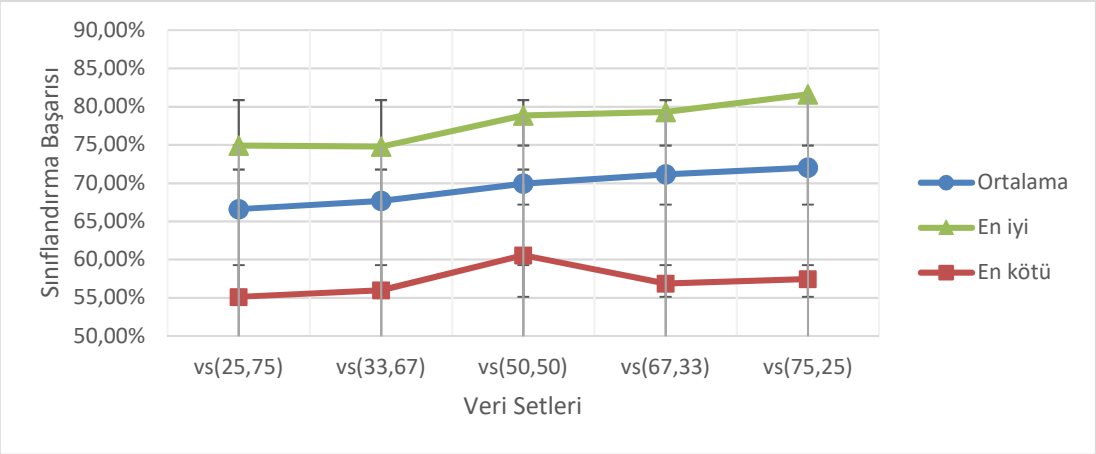
8.3.1. Decision Tree (DT) Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin Decision Tree (Karar Ağacı) algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.12'de gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %81,61 sınıflandırma başarısıyla %75'i eğitim ve %25'i test amaçlı kullanılan vs(75, 25) verisetinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.12. DT sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	%55,13	%74,90	%66,61	%3,62	%66,54	%65,78
$vs(33,67)$	%55,98	%74,79	%67,68	%3,41	%67,95	%69,66
$vs(50,50)$	%60,57	%78,86	%69,94	%3,47	%70,29	%73,71
$vs(67,33)$	%56,90	%79,31	%71,17	%4,13	%71,55	%71,55
$vs(75,25)$	%57,47	%81,61	%72,03	%4,91	%72,41	%72,41

Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde %75-%80 aralığında başarı sağladığı söylenebilir. Şekil 8.13'te DT algoritmasının verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.13. DT'nin sınıflandırma başarı oranları.

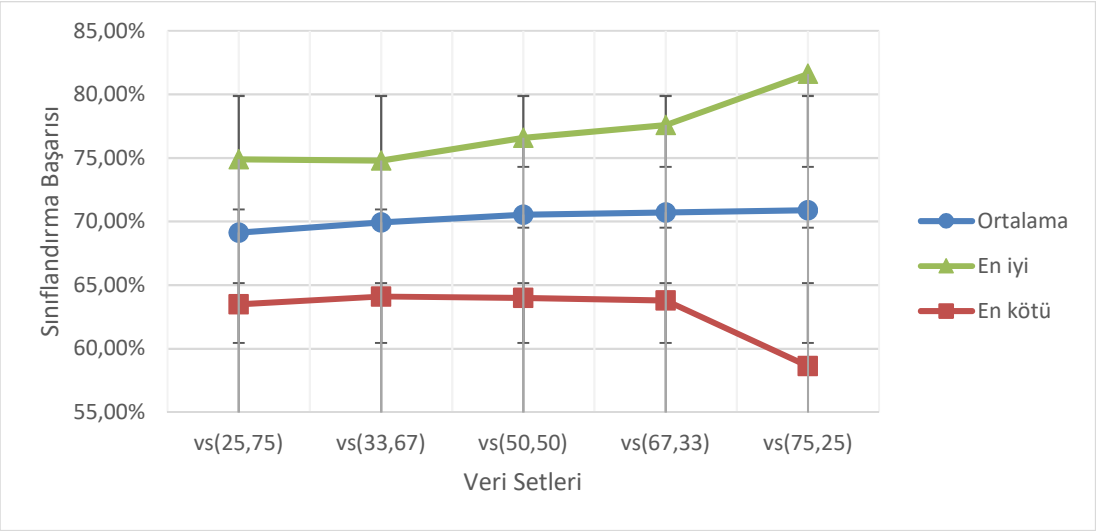
8.3.2. k-NN Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin k-NN (k- Enyakın Komşu) algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.13'de gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %81,61 sınıflandırma başarısıyla %75'i eğitim ve %25'i test amaçlı kullanılan vs(75, 25) verisetinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.13. k-NN sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	63,50%	74,90%	69,13%	2,57%	68,82%	68,06%
$vs(33,67)$	64,10%	74,79%	69,93%	2,12%	70,09%	70,51%
$vs(50,50)$	64,00%	76,57%	70,53%	2,42%	70,57%	69,71%
$vs(67,33)$	63,79%	77,59%	70,72%	3,51%	70,69%	75,00%
$vs(75,25)$	58,62%	81,61%	70,89%	4,64%	71,26%	73,56%

Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde DT algoritmasında olduğu gibi %75-%80 aralığında başarı sağladığı söylenebilir. Şekil 8.14'te k-NN algoritmasının verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.14. k-NN'nin sınıflandırma başarı oranları.

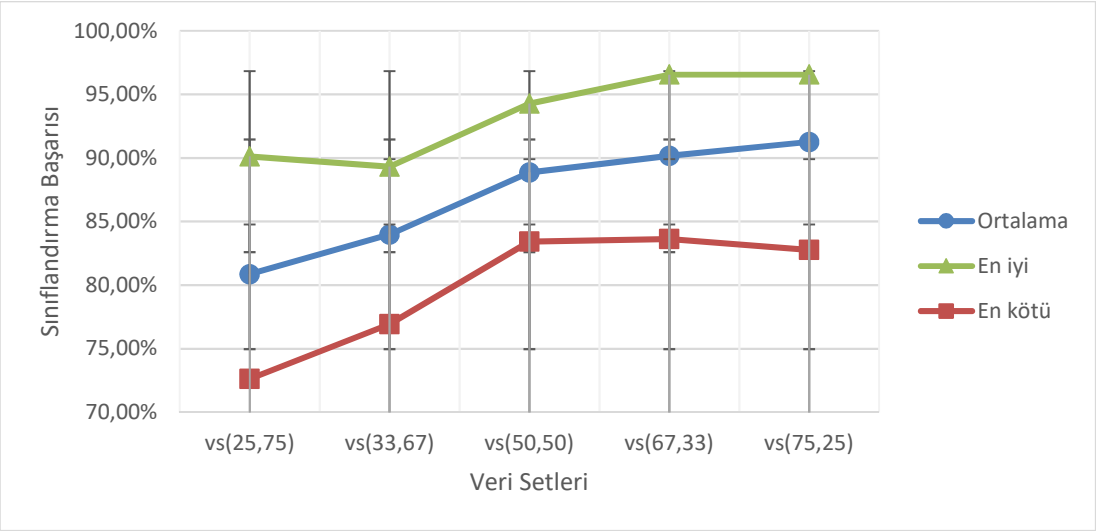
8.3.3. MLR Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin Multinomial Lojistik Regresyon (MLR) algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.14'te gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %96,55 sınıflandırma başarısıyla vs(67, 33) ve vs(75, 25) verisetlerinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.14. MLR sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	72,62%	90,11%	80,86%	3,24%	80,80%	83,65%
$vs(33,67)$	76,92%	89,32%	83,97%	2,79%	83,97%	85,90%
$vs(50,50)$	83,43%	94,29%	88,85%	2,23%	89,14%	89,71%
$vs(67,33)$	83,62%	96,55%	90,17%	2,43%	90,52%	91,38%
$vs(75,25)$	82,76%	96,55%	91,26%	2,73%	91,95%	91,95%

Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde %90-%95 aralığında başarı sağladığı söylenebilir. Bu da şu ana kadar elde edilen en büyük başarı oranıdır. Şekil 8.15'te MLR algoritmasının verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.15. MLR'nin sınıflandırma başarı oranları.

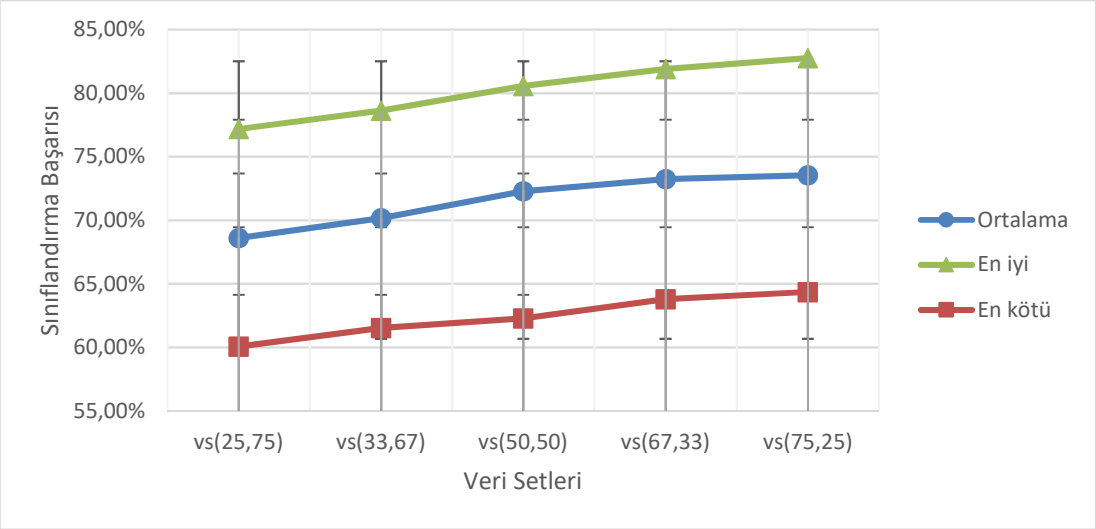
8.3.4. Naive Bayes Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin Naive Bayes algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.15'te gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %82,76 sınıflandırma başarısıyla %75'i eğitim ve %25'i test amaçlı kullanılan vs(75, 25) verisetinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.15. Naive Bayes sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	60,08%	77,19%	68,61%	3,87%	68,82%	68,82%
$vs(33,67)$	61,54%	78,63%	70,17%	4,00%	70,09%	69,23%
$vs(50,50)$	62,29%	80,57%	72,29%	3,53%	72,57%	72,00%
$vs(67,33)$	63,79%	81,90%	73,24%	4,07%	72,41%	71,55%
$vs(75,25)$	64,37%	82,76%	73,55%	4,21%	73,56%	72,41%

Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde %80 civarlarında başarı sağladığı söylenebilir. Şekil 8.16'da Naive Bayes algoritmasının verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.16. NB'nin sınıflandırma başarı oranları.

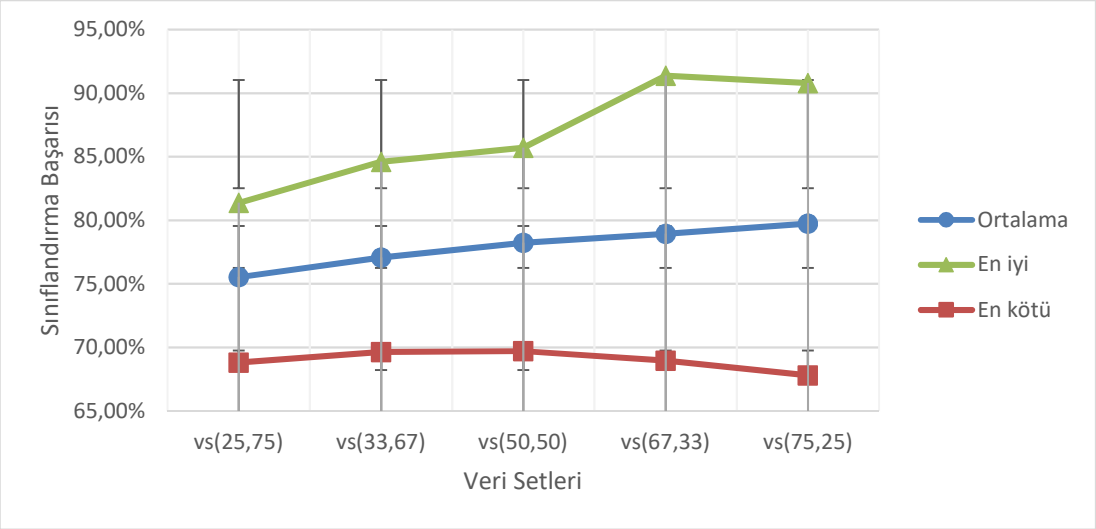
8.3.5. Random Forest Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin Random Forest algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.16'da gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %91,38 sınıflandırma başarısıyla %67'i eğitim ve %33'i test amaçlı kullanılan vs(67, 33) verisetinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.16. Random Forest sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	68,82%	81,37%	75,53%	3,16%	75,48%	74,52%
$vs(33,67)$	69,66%	84,62%	77,07%	3,01%	77,35%	80,34%
$vs(50,50)$	69,71%	85,71%	78,23%	3,42%	78,29%	78,29%
$vs(67,33)$	68,97%	91,38%	78,94%	3,99%	79,31%	78,45%
$vs(75,25)$	67,82%	90,80%	79,74%	4,66%	80,46%	80,46%

Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde %80-%90 aralığında başarı sağladığı söylenebilir. Şekil 8.17'de algoritmanın verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.17. RF'nin sınıflandırma başarı oranları.

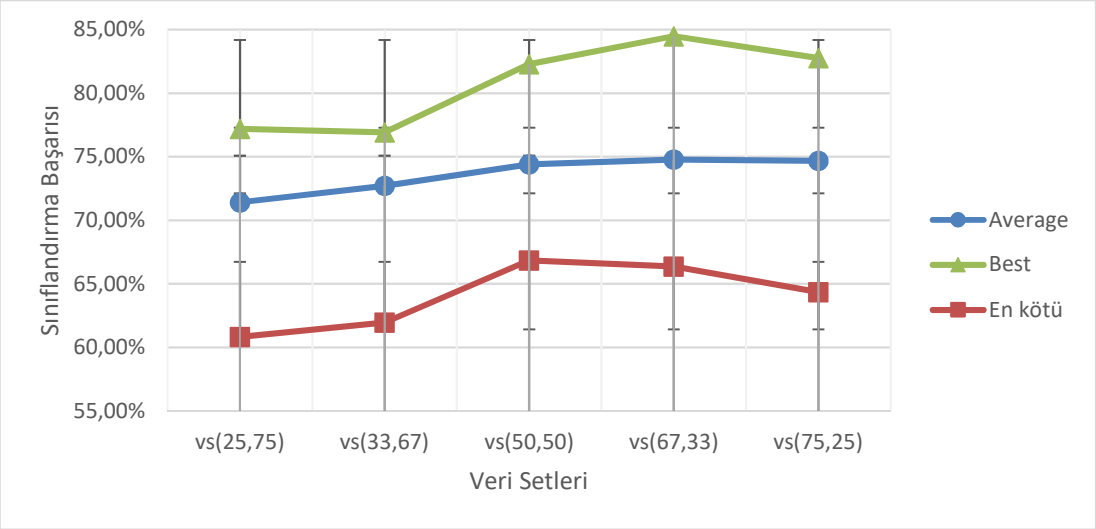
8.3.6. SVM Test Sonuçları

Lökosit verisetlerinin SVM algoritmasına göre sınıflandırma sonuçları Çizelge 8.17'de gösterilmektedir. Buna göre elde edilen en iyi sonuç %84,48 sınıflandırma başarısıyla %67'i eğitim ve %33'i test amaçlı kullanılan vs(67, 33) verisetinde görülmüştür. Çizelgeden de görüldüğü üzere eğitim verisinin oranı büyüdükçe doğal olarak sınıflandırmadaki başarı oranı artmıştır.

Çizelge 8.17. SVM sınıflandırma başarısı istatistikleri.

Veri Seti	En Kötü	En İyi	Ortalama	St. Sapma	Ortanca	Mod
$vs(25,75)$	60,84%	77,19%	71,41%	2,52%	71,86%	72,24%
$vs(33,67)$	61,97%	76,92%	72,73%	2,43%	72,86%	73,50%
$vs(50,50)$	66,86%	82,29%	74,39%	2,99%	74,29%	76,57%
$vs(67,33)$	66,38%	84,48%	74,78%	3,62%	75,00%	75,00%
$vs(75,25)$	64,37%	82,76%	74,69%	4,05%	74,71%	78,16%

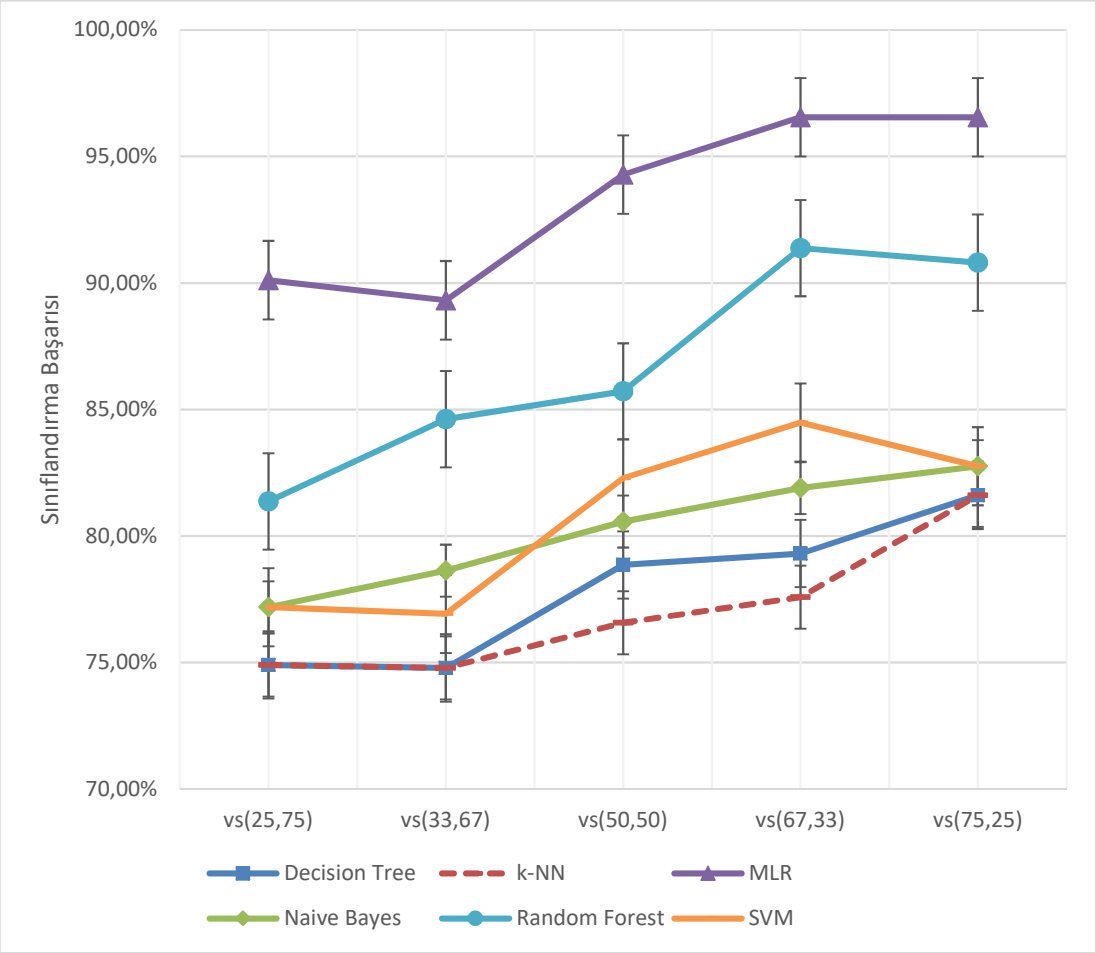
Algoritma farklı eğitim ve test oranlarına göre genel olarak değerlendirildiğinde %80 civarında başarı sağladığı söylenebilir. Şekil 8.18'de algoritmanın verisetlerine göre en iyi, en kötü ve ortalama başarı grafiği verilmiştir.



Şekil 8.18. SVM'nin sınıflandırma başarı oranları.

Lökosit hücrelerinin sınıflandırılmasında kullanılan bu 6 farklı makine öğrenme algoritması genel olarak değerlendirildiğinde, tüm veri setlerinde ve her koşulda en yüksek başarı oranı MLR algoritmasına aittir. En düşük başarı oranı ise k-NN algoritmasına ait olup, SVM ve Naive Bayes algoritmalarına yakın sonuçlar üretmiştir.

Bunların dışında Random Forest algoritması MLR'den sonra en başarılı sonuçlar veren yöntem olarak görülmektedir. Bu yöntem birden fazla karar ağacının (Decision Tree) bir araya gelmesiyle oluşturulduğundan, Decision Tree algoritmasına göre daha başarılıdır. Şekil 8.19'da tüm algoritmaların en iyi durumlarına göre karşılaştırmalı grafiği gösterilmektedir.



Şekil 8.19. Makine öğrenme algoritmalarının karşılaştırılması.

BÖLÜM 9

SONUÇLAR

Bilindiği üzere mikroskop sistemlerinde eksen hareketlerinde mikron ölçü birimine göre konumlandırma yapılır. Bu nedenle tasarımdaki hata payının milimetre düzeyinin mutlaka altında olması gerekir. Gerçekleştirilen Prototip-I üzerinde yapılan testlerde; preparat tablasının montaj yüzeyindeki mikro seviyeli eğimler nedeniyle mikroskop objektifinin belirli X ve Y adım tarama mesafesinden sonra odak noktasını kaybettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca aydınlatma sistemi 40X (40 kat büyütme) ve üzerindeki büyütme kudretine sahip objektiflerde zayıf kaldığı tespit edilmiştir. Yapılan gözlemler ve testler sonucunda buna etki eden faktörler; Işıklandırma sistemi ile preparat arasındaki mesafenin olması gerekenden uzak olduğu, çalışma tablasındaki yüzeysel eğim ve uzatma tüpünün bu değerlere bağlı olarak ışığı tam olarak kamera sensörüne iletememesi gibi durumlardır. Prototip-I olarak geliştirilen motorize mikroskop sisteminin taşınabilirliği ve çalışma ortamındaki kapladığı alan da diğer önemli konulardandır. Vücuda getirilen sistemin ağırlığı yaklaşık olarak 40 kg civarındadır. Dış yüzeylerden 50x60x50 cm ebadında olduğu da göz önüne alındığında bu cihazın bir kişi tarafından taşınması oldukça zordur. Bu nedenle tasarımda kullanılacak olan malzemenin türü ve kalınlığına bağlı olarak ağırlık hesaplamalarının önceden yapılması gerekir. Prototip-II'de tüm bu olumsuz durumlar göz önünde bulundurularak ilk duruma göre daha ideal bir sistem tasarlanmıştır. Optik ve ışıklandırma sistemi sabit bir konuma getirilerek 40X ve üzeri objektiflerde daha kaliteli sonuçlar alınmıştır.

Kamera sistemi için dinamik odak uzaklığı kontrolü, çoklu preparat haznesi, uzaktan kontrol edilebilir ve düşük maliyet olması. Bunun dışında sahip olduğu yazılım sayesinde hem cihazın uzaktan kontrolü mümkün olmakta da hem de sahip olduğu görüntü işleme yazılımı sayesinde gerçek zamanlı görüntü işlemeye olanak sağlamaktadır.

Periferik kan yayma işlemi, hemen hemen tüm sağlık kuruluşlarının klinik çalışanları tarafından hazırlanabilir olmasına rağmen, inceleme ve değerlendirilme işlemlerinin hematoloji uzmanları tarafından yapılması gerekmektedir. Ancak hematoloji uzmanlığı, dahiliye uzmanlığının bir yan dal ihtisası olması nedeniyle sadece büyük merkezlerde görevlendirilebilmektedir. Bu nedenle şehir merkezleri dışında yaşamını sürdüren hastalar ile hematoloji uzmanları arasında uzak mesafeler bulunur. Bu durumdaki hastalara ait kan örneklerinin incelenebilmesi için hastaların hematoloji uzmanının bulduğunu merkeze gelmeleri gerekmektedir. Geliştirilen sistemin uzaktan kontrol edilebilir olması bu sorunu ortadan kaldıracaktır. İlgili sağlık kuruluşu tarafından hazırlanan kan yayma örnekleri, uzaktaki bir hematoloji uzmanı tarafından internet üzerinden erişim sağlayarak analiz işlemlerini yapabilecektir.

Geliştirilen cihazın yazılımsal olarak desteklenmesi sonucu, her hastanın kayıtları bir merkez sunucuda depo edilebileceğinden Ulusal Hematoloji Hasta Takip Ağı (UHHTA) oluşturulması gibi çok büyük bir eksiği kapatacaktır. Ancak şu an için ülkemizde ne yazık ki bu şekilde bir merkez ya da benzeri bir sistem mevcut değildir. Hastaların takibi ve yeni tanı almış hastaların daha geniş bir doktor popülasyonu tarafından değerlendirilmesi ve yerinde elektronik konsültasyona müsaade edecek olması önemli bir kullanım sahası daha oluşturmaktadır.

Geliştirilen mikroskop sisteminin birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan bazılarını şu şekilde sıralayabiliriz;

1. Piyasada bulunan kan sayım cihazlarının sınırlı kapasitede hafızaya sahip olması dezavantajdır. Bu sistemde ise, veritabanı sunucusunun disk kapasitesinin büyük ve istenildiğinde genişletilebilir olmasıdır.
2. Merkezi bir veritabanı olması itibariyle, dünyanın herhangi bir internet erişim noktasından ilgili hastanın kan yayma görüntüleri ve sonuçları görülebilmektedir.
3. Eş zamanlı olarak, farklı coğrafi konumlarda bulunan birçok uzman hekim tarafından aynı hastaya ait görüntüler incelenebilmektedir.
4. Motorize sistemin ve veritabanı sunucusunun bir merkez araştırma hastanesinde bulunduğu düşünülürse, çevre illerdeki küçük ölçekli hastane ve

sağlık ocakları tarafından gönderilen kan örnekleri gerekli işlemlerden geçirildikten sonra veritabanına kaydedilerek, ilgili hekimlerin kan yayma görüntülerini ve sonuçlarını görebilmesi için sadece web ara yüzü üzerinden sisteme bağlanması yeterli olacaktır.

5. Merkezi sistem uygulaması sayesinde maliyeti önemli derecede düşürecektir.
6. Cihaz üzerinde ek yazılımların geliştirilerek entegre edilmesiyle birçok farklı alanda (sağlık, tarım, metal vb.) kullanılabilir olması.

Periferik kan yayma görüntüleri üzerindeki kan hücrelerinin segmentasyonu için önerilen yöntem, hızlı ve yüksek doğruluk oranına sahip olması nedeniyle mevcut literatürdeki birçok çalışmadan daha başarılıdır. Buna ek olarak, tam otomatik bir sisteme entegre edilebilmesi için adaptif olarak tasarlanmış olması da önemli bir konudur. Elde edilen sonuçlara göre, kan hücrelerini yüksek bir başarı oranıyla eritrosit, trobmbosit ve lökosit olmak üzere üç ana gruba ayırabilmektedir. Bir sonraki aşamada segmente edilen lökosit görüntülerini sınıflandırmak üzere geçici bir klasörde toplar ve makine öğrenme algoritmalarının test edebilmesi için otomatik olarak gönderilir. Bu segmentasyon ve sınıflandırma arasındaki proses herhangi bir müdehale gerektirmez. Makine öğrenme algoritmaları ile lökosit hücrelerini beş alt sınıfa ayırabilmek için görüntü üzerinden otomatik olarak öznitelik çıkarımı yapılmaktadır. Elde edilen parametreler, makine öğrenme algoritmaları üzerinde test edilerek hücrenin hangi lökosit alt sınıfına ait olduğuna karar verilir. Lökosit sınıflandırma işlemlerinde kullandığımız yöntemlerden en başarılı olanı MLR algoritması olmuştur. Sınıflandırma başarısının artırılabilmesi için Bagging, Boosting veya Deep Learning gibi yöntemler uygulanabilir. Böylece kan yayma görüntülerindeki başarıyı olumsuz olarak etki eden faktörler azaltılarak, global başarı oranlarının daha iyi değerlere getirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Li, Q., Wang, Y., Liu, H., He, X., Xu, D., Wang, J. and Guo, F., "Leukocyte cells identification and quantitative morphometry based on molecular hyperspectral imaging technology", ***Computerized Medical Imaging and Graphics***, 38 (3): 171-178 (2014).

2. Krzyzak, A., Fevens, T., Habibzadeh, M. and Jelen, Ł., "Application of Pattern Recognition Techniques for the Analysis of Histopathological Images", ***Advances in Intelligent and Soft Computing***, Berlin/Germany, 623-644 (2011).

3. Maji, P., Mandal, A., Ganguly, M. and Saha, S., "An Automated Method for Counting and Characterizing Red Blood Cells Using Mathematical Morphology", ***IEEE International Conference on Advances in Pattern Recognition***, Kolkata, 1-6 (2015).

4. Pandit, A., Kolhar, S. and Patil, P., "Survey on Automatic RBC Detection and Counting", ***International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering***, 4 (1): 128-131 (2015).

5. Sarrafzadeh, O., Dehnavi, A.M., Rabbani, H., Ghane, N. and Talebi, A., "Circlet Based Framework for Red Blood Cells Segmentation and Counting", ***IEEE Workshop on Signal Processing Systems (SiPS)***, Hangzhou, 1-6 (2015).

6. Nasreen, N., Kumar, C. and Nabeel, A., "Counting of RBCs Using Circular Hough Transform with Median Filtering", ***The Third National Conference on Emerging Trends in Engineering (NET 2015)***, Kozhikode, 1-4 (2015).

7. Arslan, S., Özyürek, E. and Gündüz-Demir, Ç., "A Color and Shape Based Algorithm for Segmentation of White Blood Cells in Peripheral Blood and Bone Marrow Images", ***International Society for Advancement of Cytometry (Cytometry, Part A)***, 85 (6): 480-490 (2014).

8. Mohammed, E.A., Far, B.H., Mohamed, M.M.A. and Naugler, C., "Automatic Working Area Localization in Blood Smear Microscopic Images Using Machine Learning Algorithms", ***IEEE 13th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE)***, Platanias, 43-50 (2013).

9. Rathore, S., Iftikhar, A., Ali, A., Hussain, M. and Jalil, A., "Capture Largest Included Circles: An Approach for Counting Red Blood Cells", ***Emerging Trends and Applications in Information Communication Technologies (IMTIC)***, Jamshoro, 373-384 (2012).

10. Wei, X., Cao, Y., Fu, G. and Wang, Y., "A counting method for complex overlapping erythrocytes-based microscopic imaging", ***Journal of Innovative Optical Health Sciences***, 8 (6): 1-11 (2015).

11. Sonar, S. C. and Bhagat, K. S., "An Efficient Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation", ***International Journal of Scientific & Engineering Research***, 6 (5): 172-178 (2015).

12. Saraswat, M. and Arya, K. V., "Automated microscopic image analysis for leukocytes identification: A survey", ***Micron***, 65 (2014): 20-33 (2014).

13. Rawat, J., Bhadauria, H. S., Singh, A. and Virmani, J., "Review of leukocyte classification techniques for microscopic blood images", ***2nd International Conference on Computing for Sustainable Global Development***, New Delhi, 1948-1954 (2015).

14. Xiong, W., Ong, S., Lim, J., Foong, K. W., Liu, J., Racoceanu, D., Chong, A. G. and Tan, K. S., "Automatic Area Classification in Peripheral Blood Smears", ***IEEE Transactions on Biomedical Engineering***, 57 (8): 1982-1990 (2010).

15. Tomari, R., Wan Zakaria, Jamil, M.M.A., Nor, F.M., Fahran, N. and Fuad, N., "Computer Aided System for Red Blood Cell Classification in Blood Smear Image", ***Procedia Computer Science***, 42: 206-213 (2014).

16. Venkatalakshmi, B. and Thilagavathi, K., "Automatic Red Blood Cell Counting Using Hough Transform", ***IEEE Conference on Information & Communication Technologies (ICT)***, Thuckalay, 267-271 (2013).

17. Kim, K., Jeon, J., Choi, W., Kim, P. and Ho, Y., "Automatic Cell Classification in Human's Peripheral Blood Images Based on Morphological Image Processing", ***14th Australian Joint Conference on Artificial Intelligence, Adelaide***, 225-236 (2001).

18. Arık, Ö., İleri, Y. Y. ve Kaya, B., "Sağlık Hizmetlerinde Tıbbi Cihaz Sektörü", ***Hacettepe Sağlık İdaresi Dergisi***, 19 (2): 187-202 (2016).

19. Bayhan, D., Karaca, İ. E., Akarsoy Altay, T. ve Kayalıgil, S., "Dünyada ve Türkiye'de Tıbbi Cihaz Sektörü ve Strateji Önerisi", Kiper, M., ***Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı***, Ankara, 128-135 (2013).

20. Yi-de, M., Fei, S. and Lian, L., "A New Kind of Impulse Noise Filter Based on PCNN", ***International Conference on Neural Networks and Signal Processing***, Nanjing/China, 152-155 (2003).

21. Liao, Q. and Deng, Y., "An accurate segmentation method for white blood cell images", ***IEEE International Symposium in Biomedical Imaging***, Washington DC, 245-248 (2002).

22. Gonzalez, R. C. and Woods, R. E., "Digital Image Processing 3rd ed.", ***Pearson Prentice Hall***, New Jersey, 645-647 (2008).

23. Chandrasekaran, V., Palaniswami, M. and Caelli, T. M., "Temporal Feature Extraction by Sparse Decomposition of Range Images using Gated Neurons", ***IEEE World Congress on Computational Intelligence***, Orlando FL, 4033-4037 (1994).

24. Cseke, I., "A fast segmentation scheme for white blood cell images", ***11th IAPR International Conference on Pattern Recognition***, Netherlands, 530-533 (1992).

25. Wu, X., "Adaptive split-and-merge segmentation based on piecewise least-square approximation", ***IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence***, 15 (8): 808-815 (1993).

26. Dey, R., Roy, K., Bhattacharjee, D., Nasipuri, M. and Ghosh, P., "An Automated System for Segmenting platelets from Microscopic Images of Blood Cells", ***International Symposium on Advanced Computing and Communication (ISACC 2015)***, Silchar, 1-8 (2015).

27. Madhloom, H. T., Kareem, S. A. and Ariffin, H., "An Image Processing Application for the Localization and Segmentation of Lymphoblast Cell Using Peripheral Blood Images", ***Journal of Medical Systems***, 36 (4): 2149-2158 (2011).

28. Liu, Y., Shih, H., Yang, T., Yang, H, Yang, D. and Sun, Y., "Quantitative Measurement for Pathological Change of Pulley Tissue from Microscopic Images via Color-Based Segmentation", ***4th Asian conference on Intelligent Information and Database Systems (ACIIDS 2012)***, Kaohsiung, 476–485 (2012).

29. Tareef, A., Song, Y., Cai, W., Wang, Y., Feng, D. D., & Chen, M., "Automatic nuclei and cytoplasm segmentation of leukocytes with color and texture-based image enhancement", ***IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)***, Prague, 935-938 (2016).

30. Jiang, K., Liao, Q. and Xiong, Y., "A novel white blood cell segmentation scheme based on feature space clustering", ***Soft Computing***, 10 (1): 12-19 (2006).

31. Salem, N. M., "Segmentation of white blood cells from microscopic images using K-means clustering", ***31st National Radio Science Conference (NRSC)***, Cairo, 371-376 (2014).

32. Sadr, A., Jahed, M., Salehian, P. and Eslami, A., "Leukocyte's nucleus segmentation using active contour in YCbCr colour space", ***IEEE EMBS Conference on Biomedical Engineering & Sciences (IECBES 2010)***, Kuala Lumpur, 257-260 (2010).

33. Yang, Y., Cao, Y. and Shi, W., "A method of leukocyte segmentation based on S component and B component images", ***Journal of Innovative Optical Health Sciences***, 7 (1): 1-8 (2013).

34. Sadeghian, F., Seman, Z., Ramli, A. R., Abdul-Kahar, B. H. and Saripan, M. I., "A Framework For White Blood Cell Segmentation In Microscopic Blood Images Using Digital Image Processing", ***Biological procedures online***, 11 (1): 196-206 (2009).

35. Vromen, J. and McCane, B., "Red blood cell segmentation using guided contour tracing", ***18th Annual Colloquium of the Spatial Information Research Centre***, Dunedin/New Zealand, 25-29 (2006).

36. Mahmood, N. H. and Mansor, M. A., "Red Blood Cells Estimation using Hough Transform Technique", ***Signal & Image Processing: An International Journal (SIPIJ)***, 3 (2): 53-64 (2012).

37. Gao, W., Tang, Y. and Li, X., "Segmentation of Microscopic Images for Counting Leukocytes", ***The 2nd IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering***, Shanghai, 2609-2612 (2008).

38. Abd Halim N. H., Mashor, M. Y. and Hassan, R., "Automatic Blasts Counting for Acute Leukemia Based on Blood Samples", ***International Journal of Research and Reviews in Computer Science***, 2 (4): 971-976 (2011).

39. Sharif, J. M., Miswan, M. F., Ngadi, M. A. and Salam, M. S., "Red Blood Cell Segmentation Using Masking and Watershed Algorithm: A Preliminary Study", ***International Conference on Biomedical Engineering***, Penang, 258-262 (2012).

40. Mohapatra, S., Patra, D., Kumar, S. and Satpathi, S., "Kernel Induced Rough C–Means Clustering for Lymphocyte Image Segmentation", ***4th International Conference on Intelligent Human Computer Interaction (IHCI)***, Kharagpur/India, 1-6 (2012).

41. Abbas, N., Mohamad, D., Abdullah, A. H., Saba, T., Al-Rodhaan, M. and Al-Dhelaan, A., "Nuclei segmentation of leukocytes in blood smear digital images", ***Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences***, 28 (5): 1801-1806 (2015).

42. Lim, H. N., Mashor, M. Y. and Hassan, R., "White blood cell segmentation for acute leukemia bone marrow images", ***In Proceedings of the 2012 IEEE International Conference on Biomedical Engineering (ICoBE)***, Penang/Malaysia, 357–361 (2012).

43. Rezatofighi, S. H. and Soltanian-Zadeh, H., "Automatic recognition of five types of white blood cells in peripheral blood", ***Computerized Medical Imaging and Graphics***, 35(4): 333–343 (2011).

44. Ko, B. C., Gim, J. W. and Nam, J. Y., "Automatic white blood cell segmentation using stepwise merging rules and gradient vector flow snake", ***Micron***, 42(7): 695–705 (2011).

45. Su, M., Cheng, C. and Wang, P., "A Neural-Network-Based Approach to White Blood Cell Classification", ***The Scientific World Journal***, 2014: 1-9 (2014).

46. Nazlibilek, S., Karacor, D., Ercan, T., Sazli, M. H., Kalender, O. and Ege, Y., "Automatic segmentation, counting, size determination and classification of white blood cells", ***Measurement***, 55: 58-65 (2014).

47. Sanei, S. and Lee, T. K. M., "Cell Recognition Based on PCA and Bayesian Classification", ***4th International Symposium on Independent Component Analysis and Blind Signal Separation (ICA2003)***, Nara, 239-243 (2003).

48. Sarrafzadeh, O., Rabbani, H., Talebi, A. and Yousefi-Banaem, H., "Selection of the best features for leukocytes classification in blood smear microscopic images", ***Medical Imaging 2014: Digital Pathology***, California, 1-8 (2014).

49. Gómez-Gil, P., Ramírez-Cortés, M., González-Bernal, J., Pedrero, A.G., Prieto-Castro, C., Valencia, D., Lobato, R. and Alonso, J.E., "A Feature Extraction Method Based on Morphological Operators for Automatic Classification of Leukocytes", ***7th Mexican International Conference on Artificial Intelligence***, Mexico, 227-232 (2008).

50. Ramirez-Cortes, J. M., Gomez-Gil, P., Alarcon-Aquino, V., Gonzalez-Bernal, J. and Garcia-Pedrero, A., "Neural networks and SVM-based classification of leukocytes using the morphological pattern spectrum", ***Studies in Computational Intelligence***, 312: 19-35 (2010).

51. Stadelmann, J. V. and Spiridonov, I. N., "Automated Classification of Leukocytes in Blood Smear Images", ***Biomedical Engineering***, 46 (2): 83-87 (2012).

52. Hiremath, P. S., Bannigidad, P. and Geeta, S., "Automated Identification and Classification of White Blood Cells (Leukocytes) in Digital Microscopic Images", ***International Journal of Computer Applications***, 2 (8): 59-63 (2010).

53. Xie, E., McGinnity, T. M. and Wu, Q., "Automatic Extraction of Shape Features for Classification of Leukocytes", ***IEEE International Conference on Artificial Intelligence and Computational Intelligence***, Sanya, 220-224 (2010).

54. Ko, B. C., Gim, J. W. and Nam, J. Y., "Cell image classification based on ensemble features and random forest", ***Electronics Letters***, 47 (11): 638-639 (2011).

55. Habibzadeh, M., Krzyzak, A. and Fevens, T., "Comparative study of shape, intensity and texture features and support vector machine for white blood cell classification", ***Journal of Theoretical and Applied Computer Science***, 7 (1): 20-35 (2013).

56. Ramesh, N., Dangott, B., Salama, M. E. and Tasdizen, T., "Isolation and two-step classification of normal white blood cells in peripheral blood smears", ***Journal of Pathology Informatics***, 3 (13): 1-10 (2012).

57. Ferri, M., Lombardini, S. and Pallotti, C., "Leukocyte Classification by Size Functions", ***IEEE Workshop on Applications of Computer Vision***, Sarasota, 223-229 (1994).

58. Ramoser, H., Laurain, V., Bischof, H. and Ecker, R., "Leukocyte segmentation and classification in blood-smear images", ***IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference***, Shanghai, 3371-3374 (2005).

59. Piuri, V. and Scotti, F., "Morphological Classification of Blood Leucocytes by Microscope Images", ***IEEE International Conference onComputational Intelligence for Measurement Systems and Applications***, Boston, 103-108 (2004).

60. Theera-Umpon, N. and Dhompongsa, S., "Morphological Granulometric Features of Nucleus in Automatic Bone Marrow White Blood Cell Classification", ***IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine***, 11(3): 353-359 (2007).

61. Adjouadi, M., Zong, N. and Ayala, M., "Multidimensional Pattern Recognition and Classification of White Blood Cells Using Support Vector Machines", ***Particle & Particle Systems Characterization***, 22(2): 107-118 (2005).

62. Pergad, S. N. D. and Hamde, S. T., "Review on Feature Extraction and Classification of WBC in Bone Marrow for Disease Diagnosis", ***International Journal of Innovative Research in Electrical, Electronics, Instrumentation and Control Engineering***, 4(1): 68-73 (2016).

63. Rodrigues, P., Ferreira, M. and Monteiro, J., "Segmentation and Classification of Leukocytes Using Neural Networks: A Generalization Direction", ***Studies in Computational Intelligence***, 83: 373-396 (2008).

64. Bikhet, S. F., Darwish, A. M., Tolba, H. A. and Shaheen, S. I., "Segmentation and classification of white blood cells", ***IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing***, İstanbul, 2259-2261 (2000).

65. Ravikumar, S. and Shanmugam, A., "WBC Image Segmentation and Classification Using RVM", ***Applied Mathematical Sciences***, 8(45): 2227-2237 (2014).

66. Yampri, P., Pintavirooj, C., Daochai, S. and Teartulakarn, S., "White Blood Cell Classification based on the Combination of Eigen Cell and Parametric Feature Detection", ***IEEE Conference on Industrial Electronics and Applications***, Singapore, 1-4 (2006).

67. Joshi, M. D., Karode, A. H. and Suralkar, S. R., "White Blood Cells Segmentation and Classification to Detect Acute Leukemia", ***International Journal of Emerging Trends & Technology in Computer Science (IJETTCS)***, 2(3): 147-151 (2013).

68. Theerapattanakul, J., Plodpai, J. and Pintavirooj, C., "An efficient method for segmentation step of automated white blood cell classifications", ***IEEE Region 10 Conference***, Chiang Mai, 191-194 (2004).

69. Tantikitti, S., Tumswadi, S. and Premchaiswadi, W., "Image processing for detection of dengue virus based on WBC classification and decision tree", ***13th International Conference on ICT and Knowledge Engineering***, Bangkok, 84-89 (2015).

70. Mircic, S. and Jorgovanovic, N., "Application of neural network for automatic classification of leukocytes", ***8th Seminar on Neural Network Applications in Electrical Engineering***, Serbia, 141-144 (2006).

71. Mircic, S. and Jorgovanovic, N., "Automatic Classification of Leukocytes", ***Journal of Automatic Control***, 16: 29-32 (2006).

72. Theera-Umpon, N., "White blood cell segmentation and classification in microscopic bone marrow images", ***Lecture Notes in Computer Science***, 3614: 787-796 (2005).

73. Saraswat, M. and Arya, K. V., "Feature selection and classification of leukocytes using random forest", ***Medical & Biological Engineering & Computing***, 52(12): 1041-1052 (2014).

74. Mahouy, G., Lund, P. R., Chinn, S. and Barnes, R. D., "The Use of Automated Image Analysis in Differential White Cell Counting", ***Scand J Haematol***, 10(4): 315-318 (1973).

75. Mui, J. K., Fu K. S. and Bacus, J. W., "Automated Classification of Blood Cell Neutrophils", ***J Histochem Cytochem***, 25(7): 633-640 (1977).

76. Houwen, B., "The Differential Cell Count", ***Laboratory Hematology***, 7: 89-100 (2001).

77. Campbell, R. A. A., Eifert, R. W. and Turner, G. C., "Openstage: A Low-Cost Motorized Microscope Stage with Sub-Micron Positioning Accuracy", ***PLoS ONE***, 9(2): 1-18 (2014).

78. Amirunidzam, M. Y., "Auto Focus Microscope: Motorized Microscope Focus Controller", ***University of Technology Malaysia (UTM)***, 1-5 (2014).

79. Vargas, C. and Romero, E., "A low cost and efficient prototype of a motorized microscope", ***Electronics, Robotics and Automotive Mechanics Conference (CERMA'06)***, Cuernavaca/Mexico, 1-4 (2006).

80. Mohan, N. A. P. and Otto, C. O., "Design of Automated Scanning Mechanism for Microscopic Biopsy", ***Indian Journal of Emerging Electronics in Computer Communications***, 4(1): 602-607 (2017).

81. Hamouda, A., Hedr, A.Y. and Ramadan, R.A., "Automated Red Blood Cell Counting", ***International Journal of Computing Science (IJCS)***, 1(2): 13-16 (2012).

82. Akrimi, J.A., George, L.E., Suliman, A. and Ahmad, A.R., "Classification Red Blood Cells Using Support Vector Machine", ***IEEE International Conference on Information Technology and Multimedia (ICIMU)***, Putrajaya, 265-269 (2014).

83. Tomari, R., Wan Zakaria, W.N., Ngadengon, R. and Abd Wahab, M.H., "Red Blood Cell Counting Analysis by Considering an Overlapping Constraint", ***ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences***, 10(3): 1413-1420 (2015).

84. Marieb, E.N. and Hoehn, K., "Human Anatomy & Physiology, 7th Edition", ***Pearson Benjamin Cummings***, San Francisco, CA, USA, 643-645 (2007).

85. Bain, B. J., "A Beginner's Guide to Blood Cells 2nd ed.", ***Blackwell Publishing***, London, 4-5 (2004).

86. Barnes, P. W., McFadden, S. L., Machin, S. J., Simson, E. and International consensus group for hematology, "The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis", ***Lab Hematol 2005***; 11(2): 83-90 (2005).

87. Hedberg, P. and Lehto, T., "Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer", ***Int J Lab Hematol 2009***, 31(1): 87-96 (2009).

88. Kaya, Z., "Tam kan sayım çıktılarının yorumlanması" ***Dicle Tıp Dergisi***, 40(3): 521-528 (2013).

89. Houwen, B., "Blood film preparation and staining procedures", ***Clinics in Laboratory Medicine***, 22(1): 1-14 (2002).

90. Müftüoğlu, O. E., "Periferik yaymanın yorumlanması ve tanıdaki önemi", ***8. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi***, Antalya, 1-4 (2006).

91. Bain, B., Bates, I. and Laffan, M., "Dacie and Lewis Practical Haematology 12th Ed.", ***Elsevier Limited***, China, 50-59 (2017).

92. Rodak, B. F., Fritsma, G. A. and Keohane, E. M., "Hematology, Clinical Principles and Applications 4th Ed.", ***Elsevier-Saunders in Missouri***, 195-196 (2011).

93. Adewoyin, A. S. and Nwogoh, B., "Peripheral Blood Film: A Review" ***Annals of Ibadan Postgraduate Medicine***, 12(2): 71–79 (2014).

94. İnternet: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü), "Giemsa Staining of Malaria Blood Films", ***http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_07a_rev.pdf*** (2016).

95. İnternet: T.C. Sağlık Bakanlığı, "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS)", ***http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/parazitoloji/UMS-P-TP-06-Giemsa-boyama.pdf*** (2015).

96. Kaur, N., Singh, J. and Sharma, V., "Analysis and Comprehensive Study-Image Segmentation Techniques", ***International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)***, 3 (1): 241-246 (2015).

97. Dhiman, S. R. and Talwar, R., "Image Segmentation Review a Survey of Image Segmentation Techniques", ***International Journal on Recent and Innovation Trends in Computing and Communication***, 2 (9): 2584-2589 (2014).

98. Agrawal, S. and Xaxa, D. K., "Survey on Image Segmentation Techniques and Color Models", ***International Journal of Computer Science and Information Technologies (IJCSIT)***, 5 (3): 3025-3030 (2014).

99. Candemir, S., "İstatistiksel Anlam Tabanlı Bilgisayarla Görme Uygulamaları", Doktora Tezi, ***Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü***, Gebze, 18-27 (2011).

100. Sumengen, B., Manjunath, B.S. and Kenney, C., "Image segmentation using curve evolution and flow fields", ***IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)***, 1: 105-108 (2002).

101. Sharma, N. and Aggarwal, L.M., "Automated medical image segmentation techniques", ***Journal of Medical Physics***, 35 (1): 3-14 (2010).

102. Mohamed, M., Mohamed, A. and Far, B., "A Fast Technique for White Blood Cells Nuclei Automatic Segmentation Based on Gram-Schmidt Orthogonalization", ***IEEE 24th International Conference on Tools with Artificial Intelligence***, 947-952 (2012).

103. Vyavahare, A., "Connected Component based Medical Image Segmentation", ***International Journal of Innovative Research in Electrical, Electronics, Instrumentation and Control Engineering***, 2 (8): 1808-1812 (2014).

104. Stava, O. and Benes, B.," Connected Component Labeling in CUDA" GPU Computing Gems Emerald Edition 1st ed., W.-m. W. Hwu., ***Morgan Kaufmann Publishers Inc.***, San Francisco, USA, 569-581 (2011).

105. Graham, R. L., "An Efficient Algorithm for Determining the Convex Hull of a Finite Planar Set", ***Information Processing Letters***, 1 (4): 132-133 (1972).

106. Beucher, S., "Watersheds of functions and picture segmentation", ***In Proceedings of the International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing (ICASSP)***, Paris/France, 1928–1931 (1982).

107. Liu, Z., Liu, J., Xiao, X., Yuan, H., Li, X., Chang, J. and Zheng, C., "Segmentation of White Blood Cells through Nucleus Mark Watershed Operations and Mean Shift Clustering", ***Sensors***, 15 (9): 22561-22586 (2015).

108. Beucher, S. and Lantuejoul, C., "Use of watersheds in contour detection", ***Int. Workshop Image Processing, Real-Time Edge and Motion Detection/Estimation***, Rennes, 2.1-2.12 (1979).

109. Vincent, L. and Soille, P., "Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations", ***IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence***, 13(6): 583–598 (1991).

110. Pratt, W. K., "Digital Image Processing: PIKS Inside, 3rd ed.", ***Wiley-Interscience***, New York, 563-566 (2001).

111. Lotufo, R. A., Rittner, L., Audigier, R., Machado, R.C. and Saude, A.V., "Morphological Image Processing Applied in Biomedicine", Biomedical Image Processing, Deserno, T.M., ***Springer-Verlag Berlin Heidelberg***, London, 107-129 (2011).

112. Krishnan, A. and Sreekumar, K., "A Survey on Image Segmentation and Feature Extraction Methods for Acute Myelogenous Leukemia Detection in Blood Microscopic Images", ***International Journal of Computer Science and Information Technologies***, 5 (6): 7877-7879 (2014).

113. Osowski, S., Siroic, R., Markiewicz, T. and Siwek, K., "Application of support vector machine and genetic algorithm for improved blood cell recognition", ***IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement***, 58(7): 2159–2168 (2009).

114. Tuceryan, M. and Jain, A. K., "In The Handbook of Pattern Recognition and Computer Vision 2nd Ed.", Chen, C. H., Pau, L. F. and Wang, P. S. P., ***World Scientific Publishing Co.***, 207-248 (1998).

115. Manojbhai, D. D. and Rajamenakshi, R., "Large Scale Image Feature Extraction from Medical Image Analysis", ***International Journal of Advanced Engineering Research and Science (IJAERS)***, 3(1): 62-66 (2016).

116. Rosin, P. L., "Measuring shape: ellipticity, rectangularity, and triangularity", ***Machine Vision and Applications***, 14 (3): 172-184 (2003).

117. Gurcan, M. N., Boucheron, L. E., Can, A., Madabhushi, A., Rajpoot, N. M. and Yener, B., "Histopathological Image Analysis: A Review", ***IEEE Reviews in Biomedical Engineering***, 2: 147–171 (2009).

118. Kuse, M., Sharma, T. and Gupta, S., "A Classification Scheme for Lymphocyte Segmentation in H&E Stained Histology Images", ***Recognizing Patterns in Signals, Speech, Images and Videos***, 6388: 235-243 (2010).

119. Najarian, K. and Splinter, R., "Biomedical Signal and Image Processing 2nd Ed.", ***CRC Press***, New York, 129-131 (2012).

120. Sarle, W. S., "Neural Networks and Statistical Models", ***Proceedings of the Nineteenth Annual SAS Users Group International Conference***, Texas, 1-13 (1994).

121. Quinlan, J. R., "Induction of Decision Trees", ***Machine Learning***, 1: 81-106 (1986).

122. Breiman, L., “Random Forests”, ***Machine Learning***, 45(1): 5-32 (2001).

123. Pal, M., “Random Forest Classifier for Remote Sensing Classification”, ***International Journal of Remote Sensing***, 26(1): 217–222 (2005).

124. Cover, T., and Hart, P., “Nearest Neighbor Pattern Classification”, ***IEEE Transactions on Information Theory***, 13(1): 21-27 (1967).

125. Soman, K. P., Loganathan, R. and Ajay, V., “Machine learning with SVM and other kernel methods”, ***PHI Learning Pvt. Ltd.***, Delhi/India, 1-10 (2009).

126. Jiang, Z. G., Fu, H. G. and Li, L. J., “Support Vector Machine for Mechanical Faults Classification”, ***Journal of Zhejiang University Science***, 6 (5): 433-439 (2005).

127. Ben-Hur, A. And Weston, J., “A User’s Guide to Support Vector Machines”, ***Methods in Molecular Biology***, 609: 223-239 (2010).

128. Kavzaoğlu, T. ve Çölkesen, İ., “Destek Vektör Makineleri ile Uydu Görüntülerinin Sınıflandırılmasında Kernel Fonksiyonlarının Etkilerinin İncelenmesi”, ***Harita Dergisi***, 2010(144): 73-82 (2010).

129. Burges, C. J. C., “A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition”, ***Data Mining and Jnowledge Discovery***, 2 (2): 121-167 (1998).

130. Cortes, C. and Vapnik, V., “Support-Vector Network”, ***Machine Learning***, 20(3): 273–297 (1995).

131. Osuna, E. E., Freund, R., Girosi, F., “Support Vector Machines: Training and Applications”, ***Massachusetts Institute of Technology and Artificial Intelligence Laboratory Report***, 8-10 (1997).

132. Orhan, U. and Adem, K., “The Effects of Probability Factors in Naive Bayes Method”, ***Elektrik-Elektronik ve Bilgisayar Mühendisliği Sempozyumu***, Bursa, 722-724 (2012).

133. Krishna, P. R. and De, S. K., “Naive-Bayes Classification using Fuzzy Approach”, ***Third International Conference on Intelligent Sensing and Information Processing***, Bangalore/India, 61-64 (2005).

134. Türkoğlu, F., “Melez Yaklaşımlarla Türkçe Dokümanlarda Yazar Tanıma”, Yüksek Lisans Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 15-17 (2006).

135. Harrell, F. E., “Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression and Survival Analysis”, ***Springer-Verlag***, New York, 215-267 (2001).

136. Hosmer, D. W., Lemeshow, S. and Sturdivant, R. X., “Applied Logistic Regression 3rd Ed.”, ***Wiley&Sons Publications***, Canada, 8-35 (2013).

137. Washington, S. P., Karlaftis, M. G. and Mannering, F., "Statistical and Econometric Methods For Transportation Data Analysis 2nd Ed.", ***Chapman and Hall/CRC***, Boca Raton/FL, 263-265 (2003).

138. Stock, J. H. and Watson, M. W., "Introduction to Econometrics 2nd Ed.", ***Addison-Wesley***, Boston, 389-390 (2007).

139. Leech, N. L., Barrett, K. C. and Morgan, G. A., "SPSS For Intermediate Statistics: Use and Interpretation 2nd Ed.", ***Lawrance Erlbaum Associates Publishers***, New Jersey, 109-110 (2004).

140. Arı, E., and Yıldız, Z., "Parallel Lines Assumption in Ordinal Logistic Regression and Analysis Approaches", ***International Interdisciplinary Journal of Scientific Research***, 1(3): 8-23 (2013).

141. Büyüköztürk, Ş., Çokluk Bökeoğlu, Ö. ve Şekercioğlu, G., "Sosyal Bilimler İçin Çok Değişkenli İstatistik SPSS ve LISREL Uygulamaları", ***Pegem Akademi Yayıncılık***, Ankara, 59-65 (2010).

142. Aksaraylı, M. ve Saygın, Ö., "Algılanan Hizmet Kalitesi ve Lojistik Regresyon Analizi ile Hizmet Tercihine Etkisinin Belirlenmesi", ***Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi***, 13(1): 21-37 (2011).

143. Ürük, E., "İstatistiksel Uygulamalarda Lojistik Regresyon Analizi", Yüksek Lisans Tezi, ***Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 5-6 (2007).

144. Yörükoğlu, K., "Hematoksilen-Eozin'den Moleküler Tekniklere: Patolojinin Tarihçesine Kısa Bir Bakış", ***Güncel Patoloji Dergisi***, 1(1): 1-7 (2014).

145. Ronan, C. A., "Bilim Tarihi - Dünya kültürlerinde bilimin tarihi ve gelişmesi 4. Baskı", Ekmeleddin İhsanoğlu, Feza Günergun, ***TÜBİTAK Yayınları***, Ankara, 437-439 (2003).

146. Masters, B. R., "History of the optical microscope in cell biology and medicine", Encyclopedia of Life Sciences (ELS), ***John Wiley & Sons***, 1–8 (2008).

147. Ünal Baş, A., "Mikroskop Kullanımında Ortaöğretim Öğrencilerinin Öz Yeterlilik İnançlarının İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 23-39 (2013).

148. Jambhekar, N. D., "Red Blood Cells Classification using Image Processing", ***Science Research Reporter***, 1 (3): 151-154 (2011).

149. Mohamed, M. and Far, B., "An enhanced threshold based technique for white blood cells nuclei automatic segmentation", ***IEEE 14th International Conference on e-Health Networking, Applications and Services (Healthcom)***, Beijing/China, 202-207 (2012).

150. Otsu, N., "A threshold selection method from gray-level histograms", ***IEEE Transactions on Systems, Man, And Cybernetics***, 9 (1): 62-66 (1979).

151. Kohler, R., "A segmentation system based on thresholding", ***Computer Graphics Image Processing***, 15 (4): 319-338 (1981).

152. Madhloom, H. T., Kareem, S. A., Ariffin, H., Zaidan, A. A., Alanazi, H. O. and Zaidan, B. B., "An automated white blood cell nucleus localization and segmentation using arithmetic and automated threshold", ***Journal of Applied Science***, 10 (11): 959-966 (2010).

153. Scotti, F., "Robust segmentation and measurements techniques of white cells in blood microscope images", ***In Proceedings of the IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference (IMTC 2006)***, Sorrento/Italy, 43-48 (2006).

154. Liu, Y., Shih, H., Yang, T., Yang, H, Yang, D. and Sun, Y., "Quantitative Measurement for Pathological Change of Pulley Tissue from Microscopic Images via Color-Based Segmentation", ***4th Asian conference on Intelligent Information and Database Systems (ACIIDS 2012)***, Kaohsiung, 476–485 (2012).

155. Gu, G. and Cui, D., "Polar Angle Detection and Image Combination Based Leukocyte Segmentation for Overlapping Cell Images", ***Computing and Informatics***, 30: 189–199 (2011).

156. Prinyakupt, J. and Pluempitiwiriyawej, C., "Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers", ***BioMedical Engineering OnLine***, 14 (63): 1-19 (2015).

157. Alomari, Y.M., Abdullah, S.N.H.S., Azma, R.Z., and Omar, K., "Automatic Detection and Quantification of WBCs and RBCs Using Iterative Structured Circle Detection Algorithm," ***Computational and Mathematical Methods in Medicine***, 2014: 1-17 (2014).

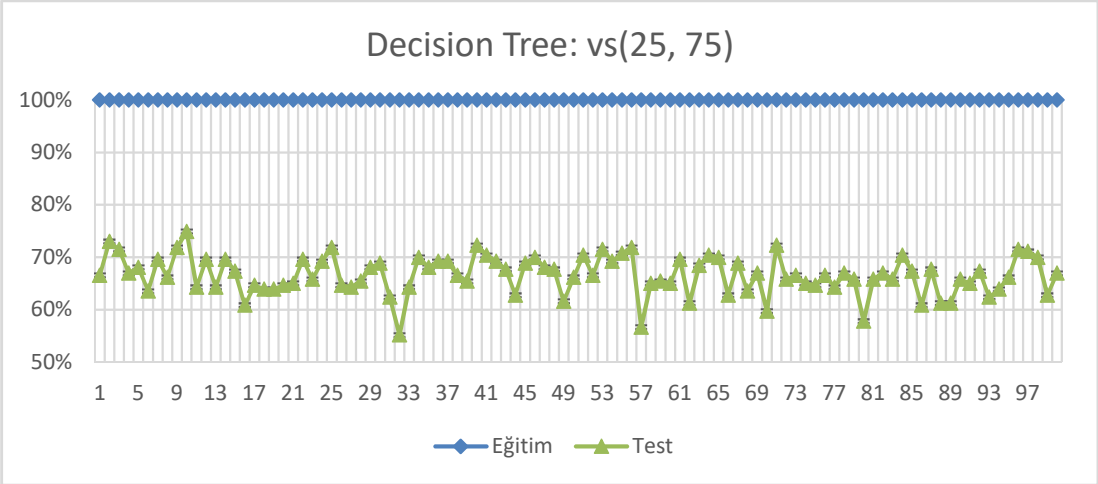
158. Vale, A. M. P. G., Guerreiro, A. M. G., Neto, A. D. D., Junior, G. B. C., Leitão, V. C. and Martins, A. M., "Automatic segmentation and classification of blood components in microscopic images using a fuzzy approach", ***Revista Brasileira de Engenharia Biomédica***, 30 (4): 341-354 (2014).

159. Khajehpour, H., Dehnavi, A. M., Taghizad, H., Khajehpour, E. and Naeemabadi, M., "Detection and Segmentation of Erythrocytes in Blood Smear Images Using a Line Operator and Watershed Algorithm", ***Journal of Medical Signals and Sensors***, 3 (3): 164-171 (2013).

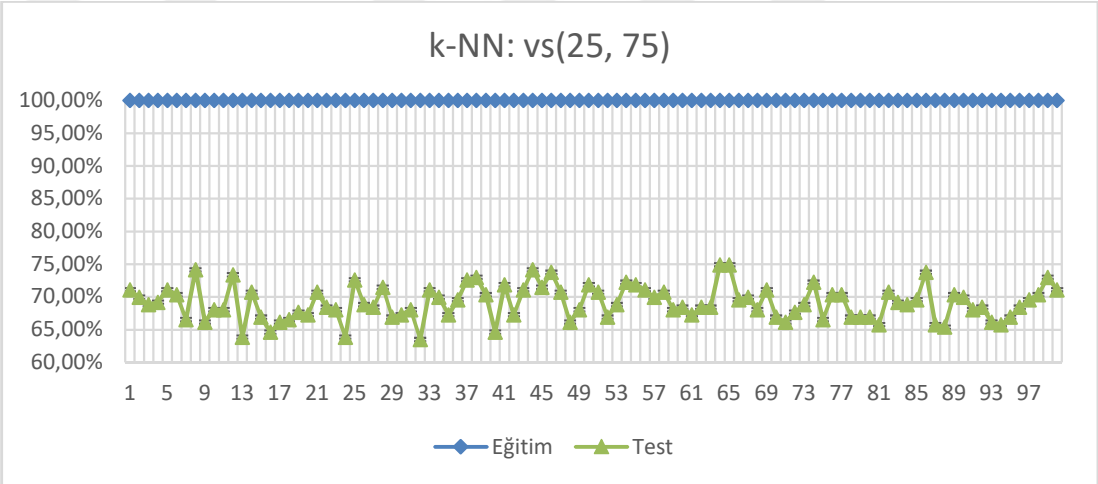
160. Angulo, J. and Flandrin, G., "Automated Detection of Working Area of Peripheral Blood Smears Using Mathematical Morphology", ***Analytical Cellular Pathology: the Journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology***, 25 (1): 37-49 (2003).

EK AÇIKLAMALAR A.

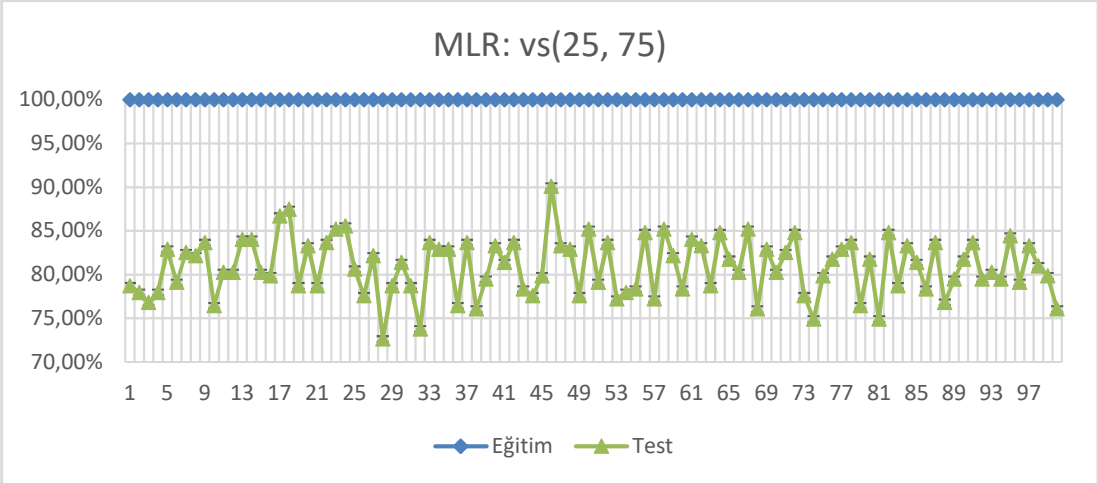
SINIFLANDIRMA ALGORİTMALARININ EĞİTİM VE TEST BAŞARI ORANLARI



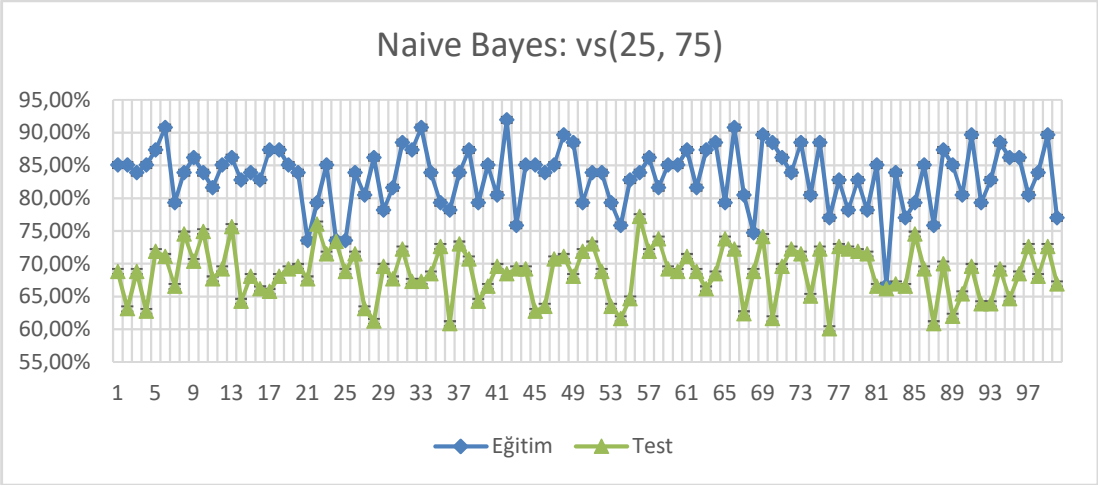
Şekil Ek A.1. DT'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



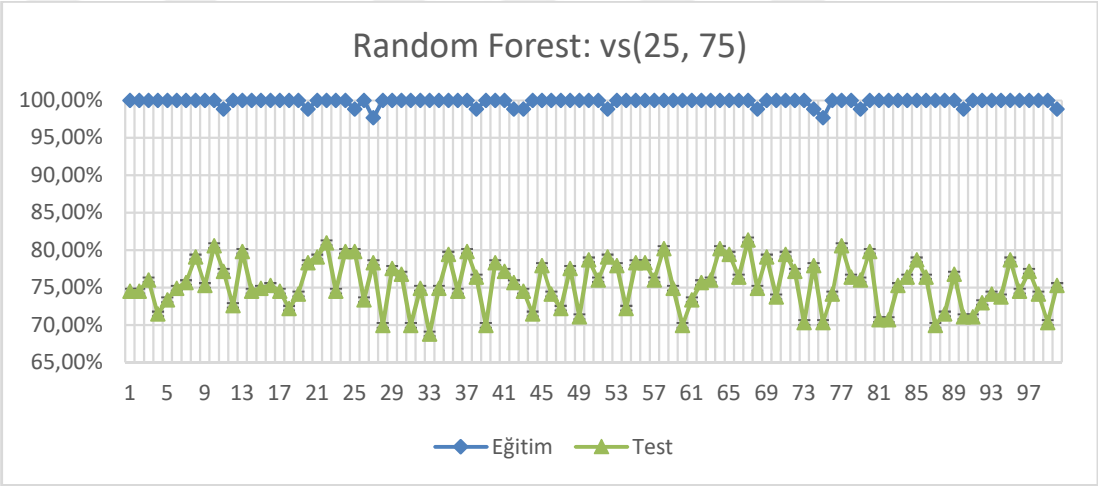
Şekil Ek A.2. k-NN'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



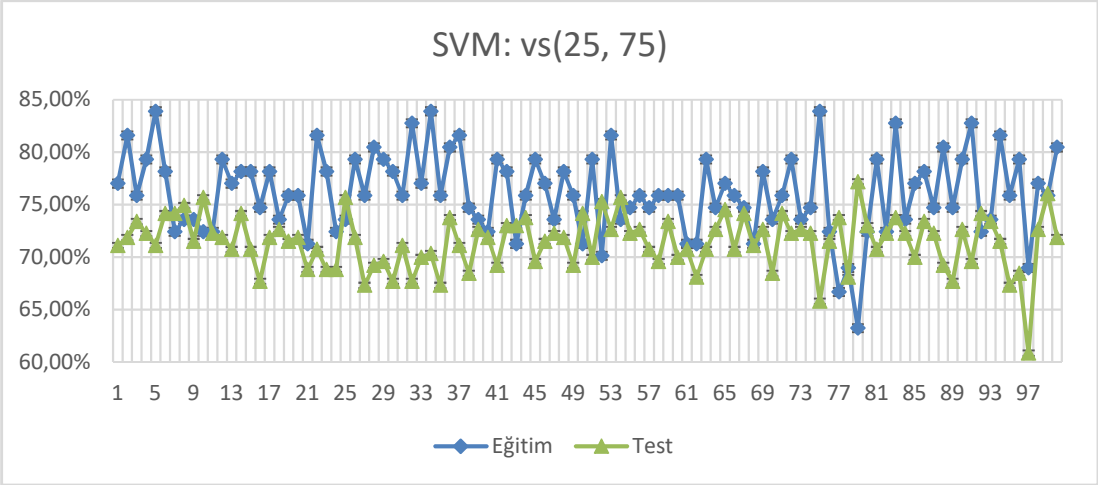
Şekil Ek A.3. MLR'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



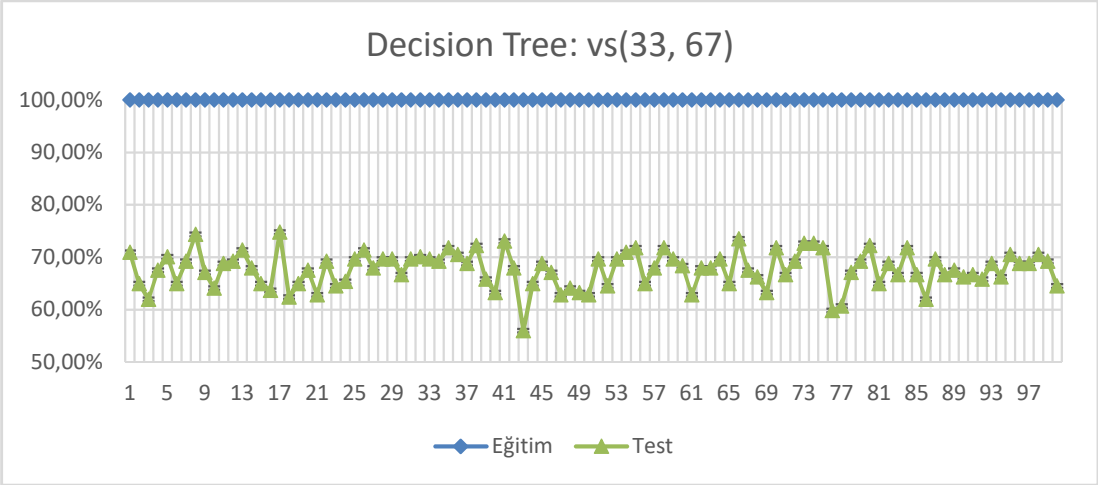
Şekil Ek A.4. NB'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



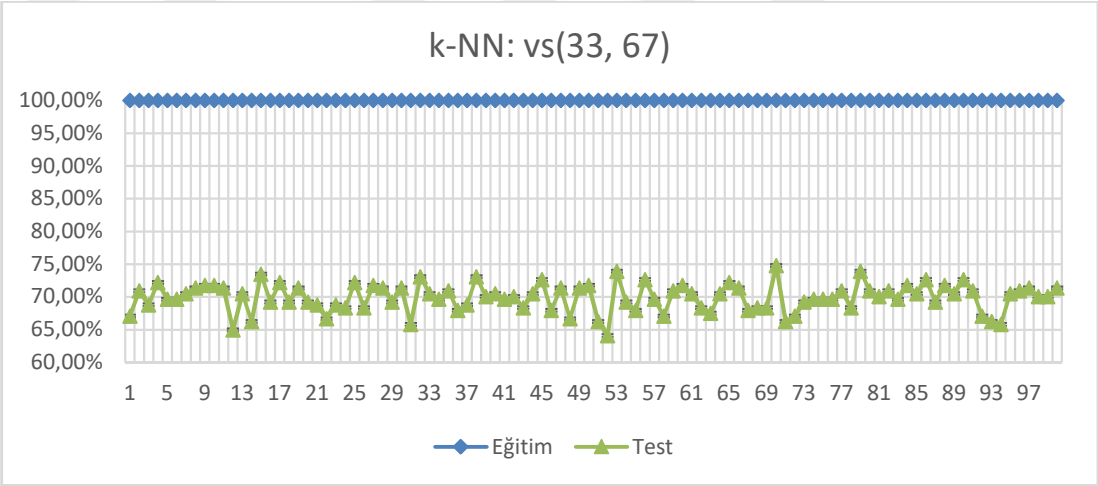
Şekil Ek A.5. RF'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



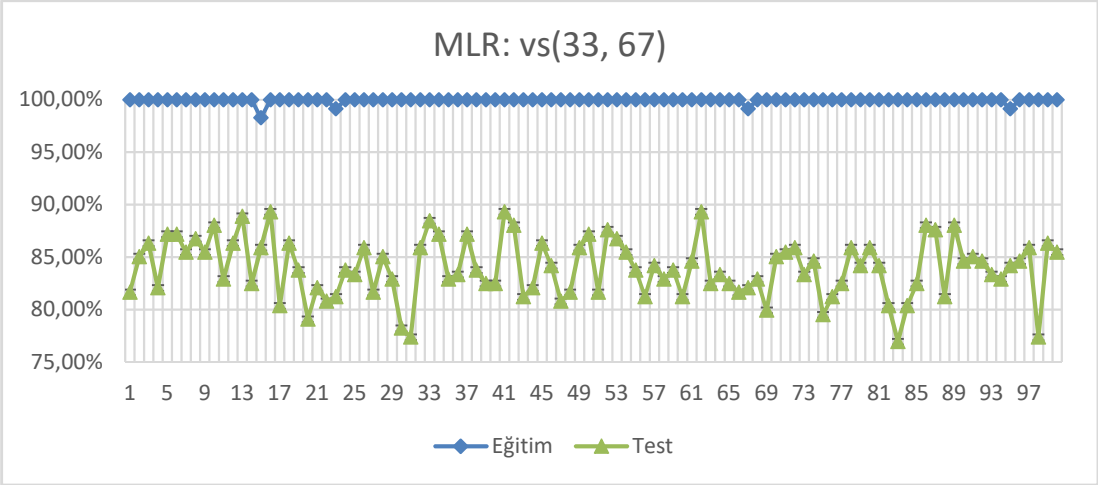
Şekil Ek A.6. SVM'nin vs(25, 75)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



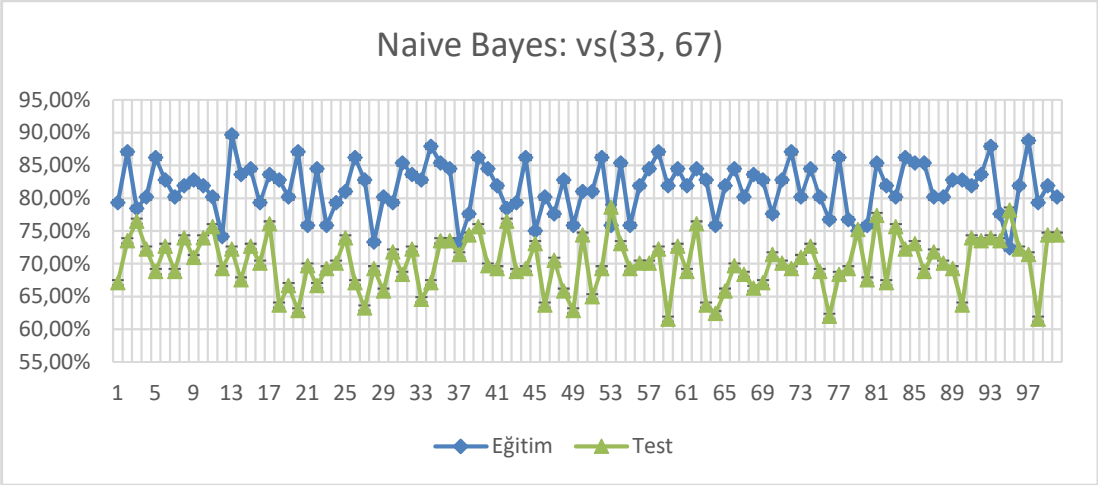
Şekil Ek A.7. DT'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



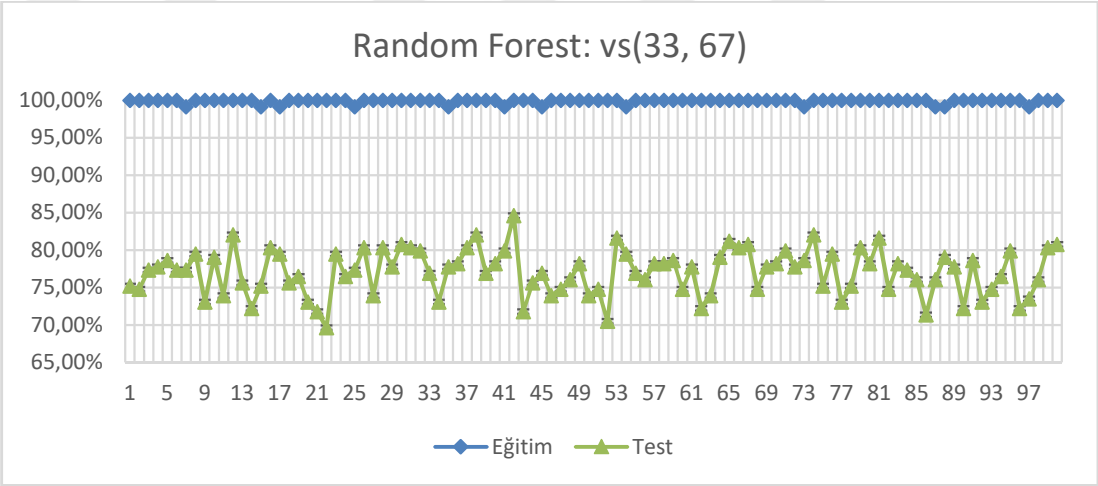
Şekil Ek A.8. k-NN'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



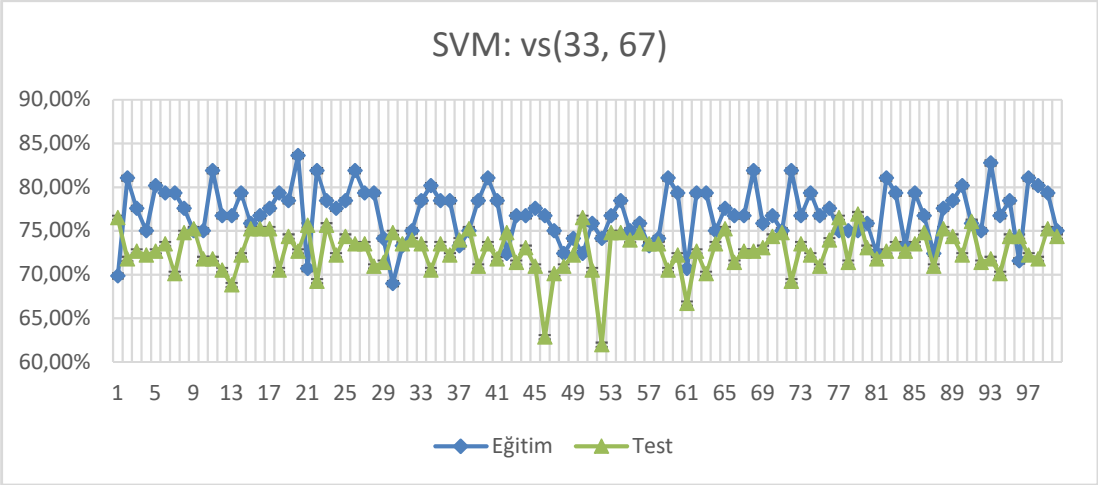
Şekil Ek A.9. MLR'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



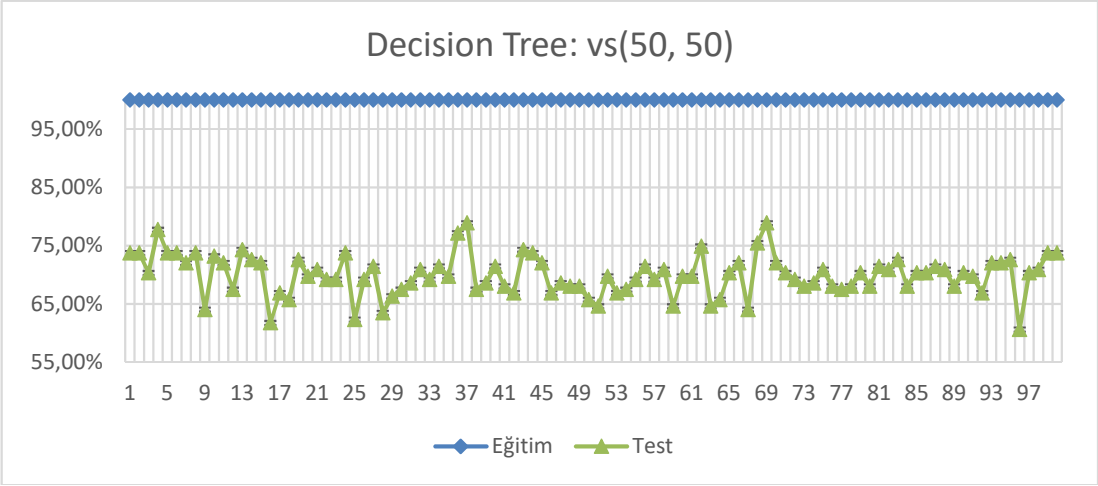
Şekil Ek A.10. NB'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



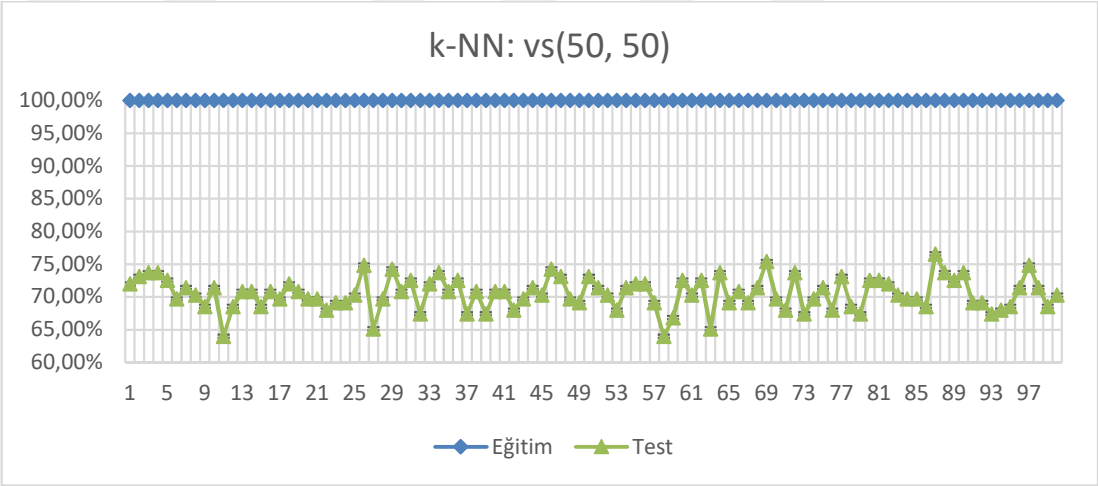
Şekil Ek A.11. RF'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



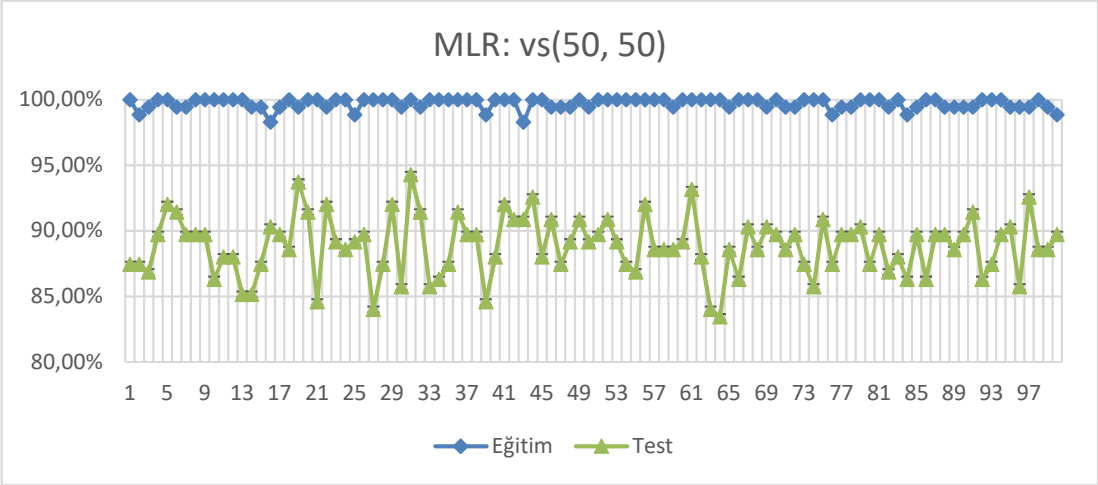
Şekil Ek A.12. SVM'nin vs(33, 67)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



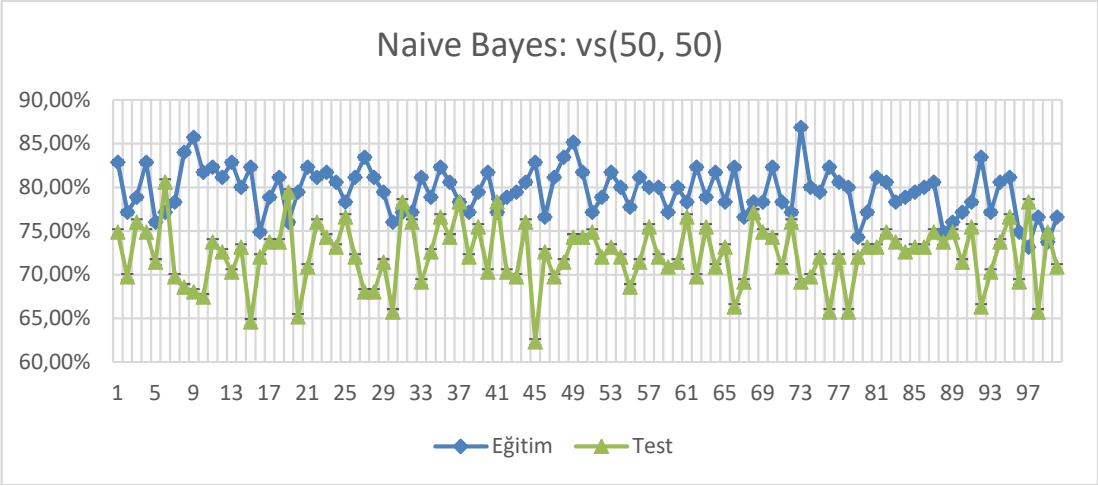
Şekil Ek A.13. DT'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



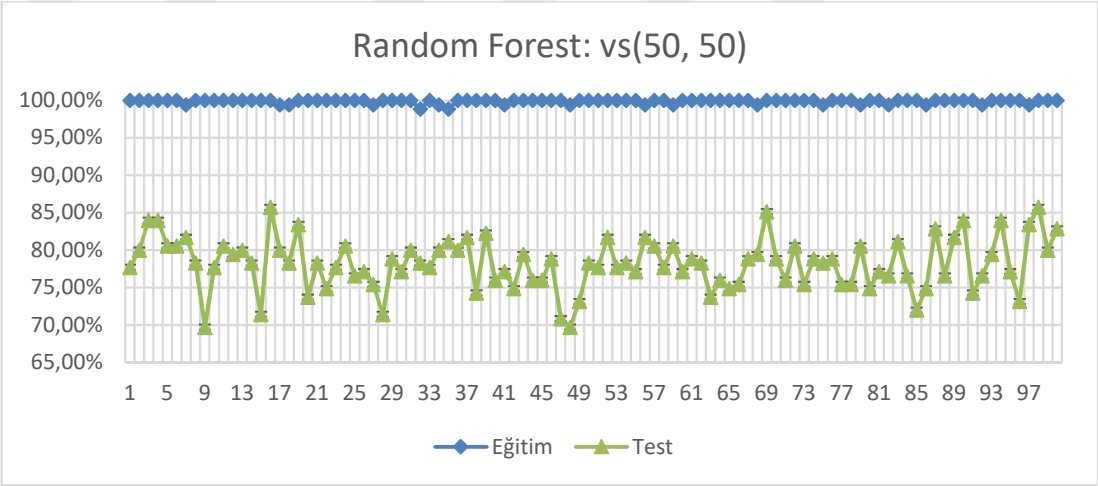
Şekil Ek A.14. k-NN'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



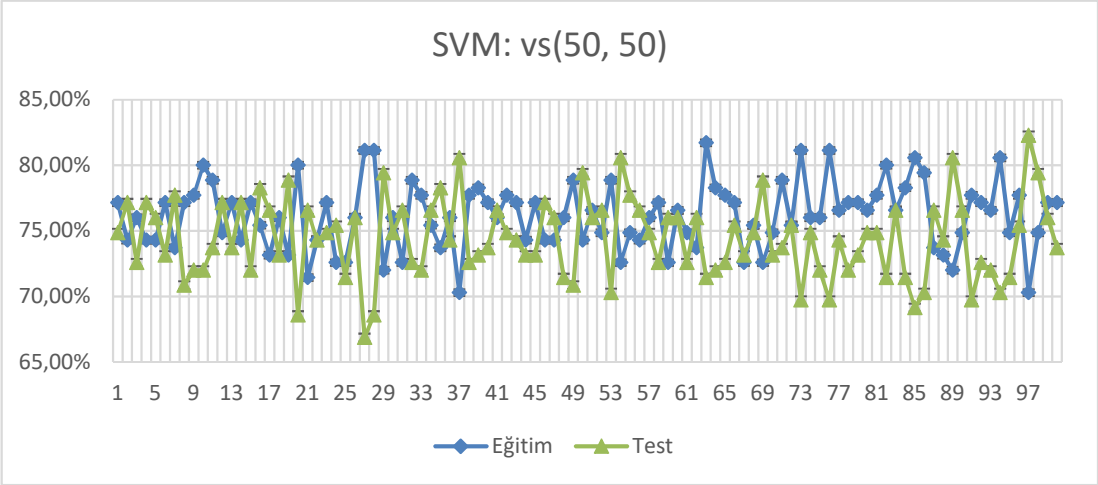
Şekil Ek A.15. MLR'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



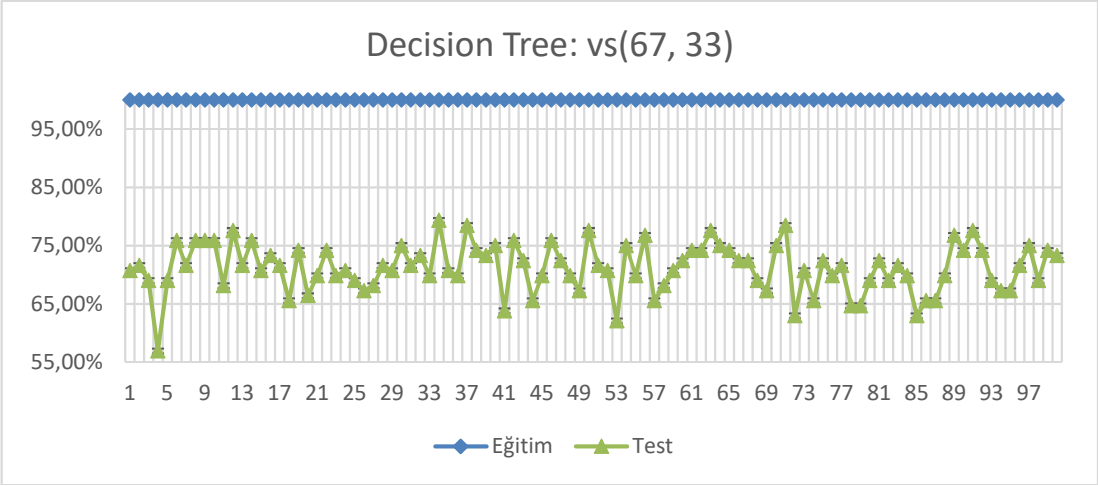
Şekil Ek A.16. NB'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



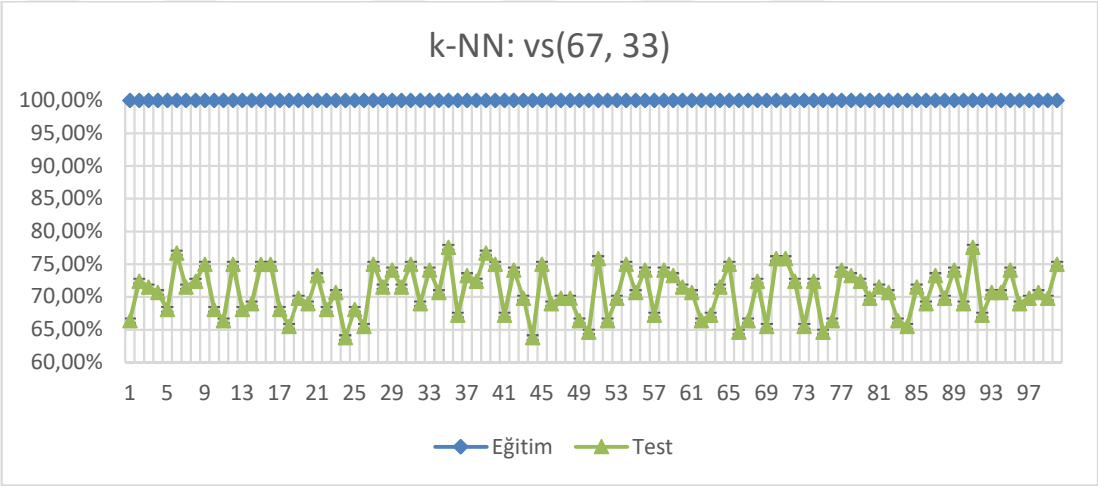
Şekil Ek A.17. RF'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



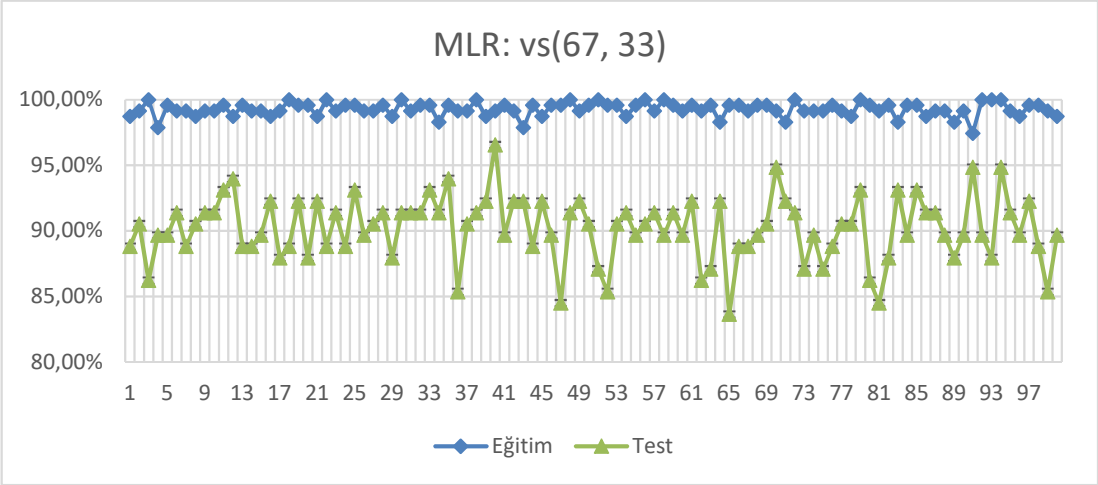
Şekil Ek A.18. SVM'nin vs(50, 50)'ye göre eğitim ve test başarı oranları.



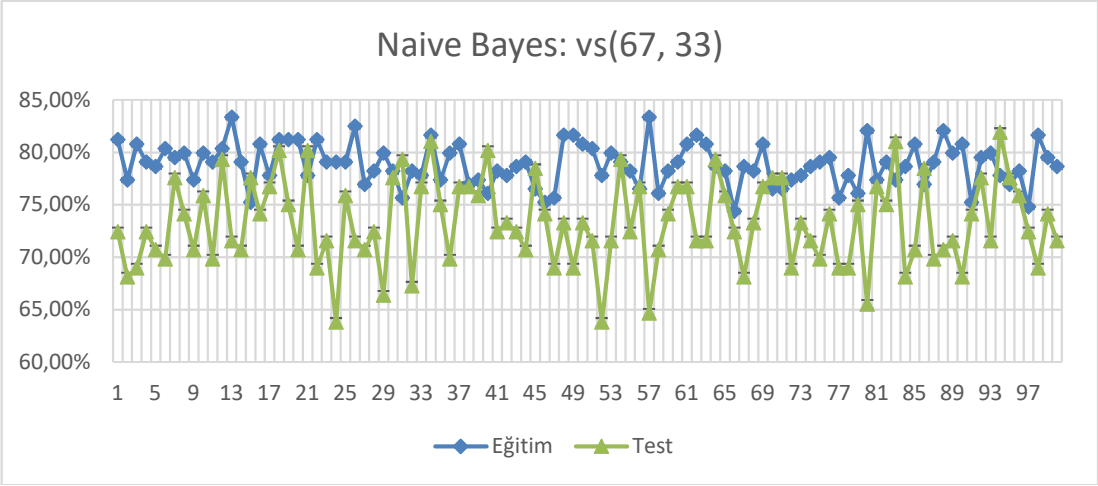
Şekil Ek A.19. DT'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



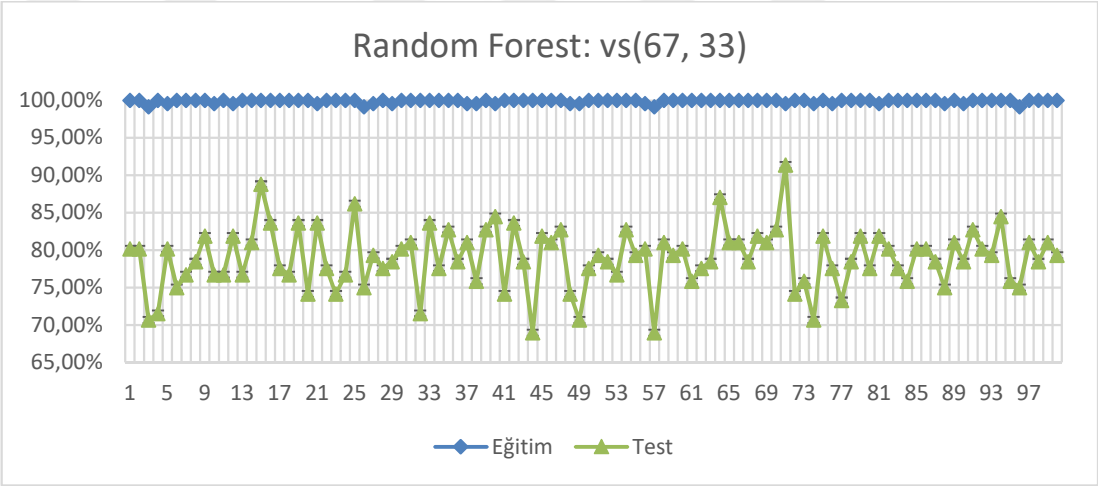
Şekil Ek A.20. k-NN'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



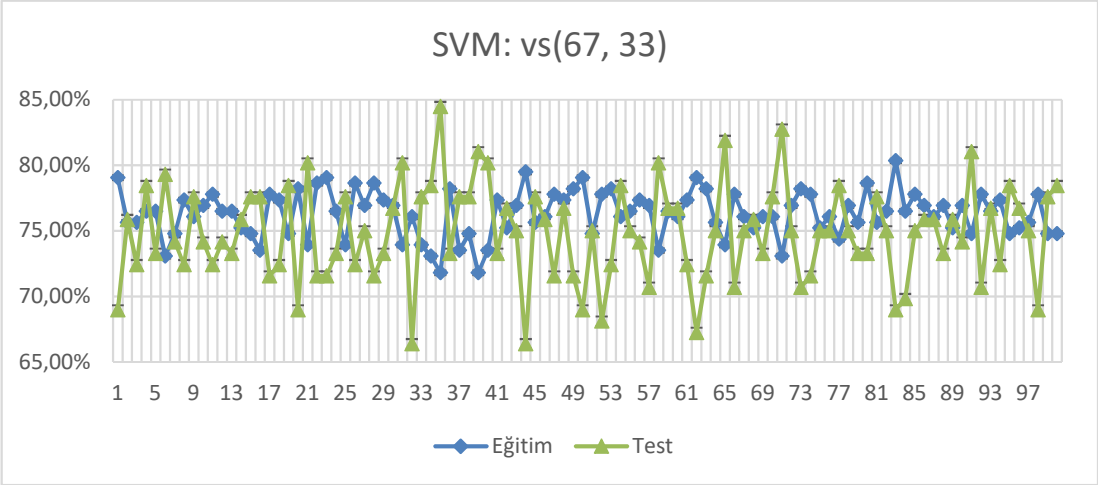
Şekil Ek A.21. MLR'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



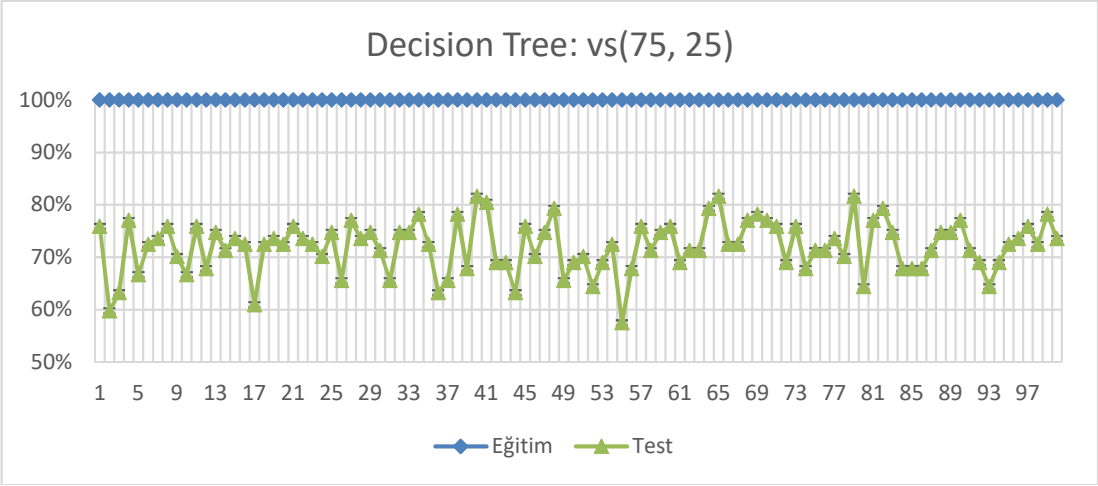
Şekil Ek A.22. NB'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



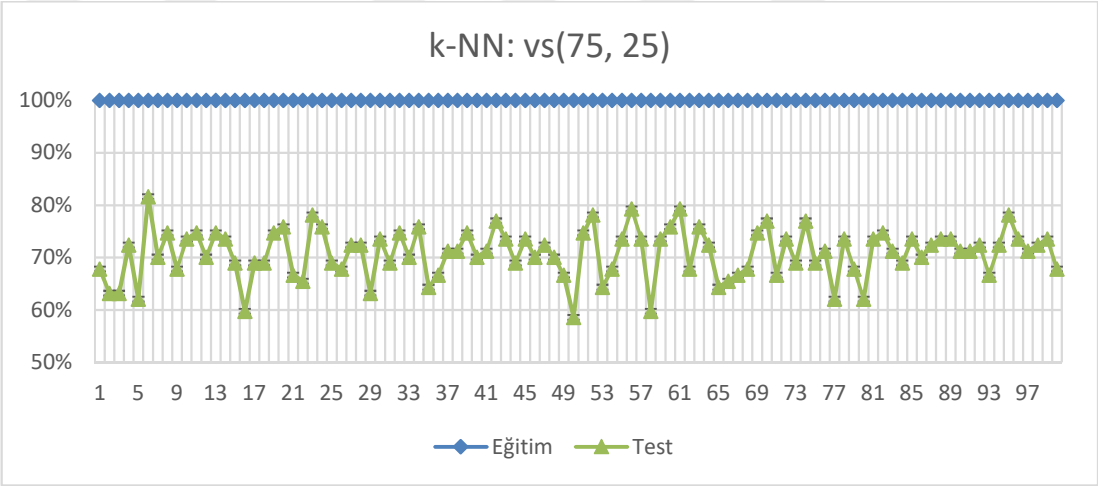
Şekil Ek A.23. RF'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



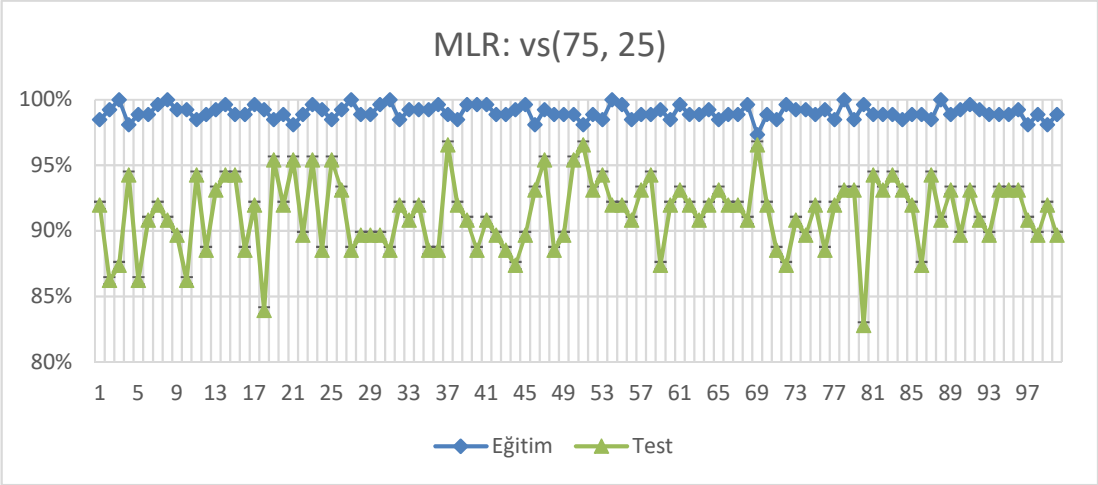
Şekil Ek A.24. SVM'nin vs(67, 33)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



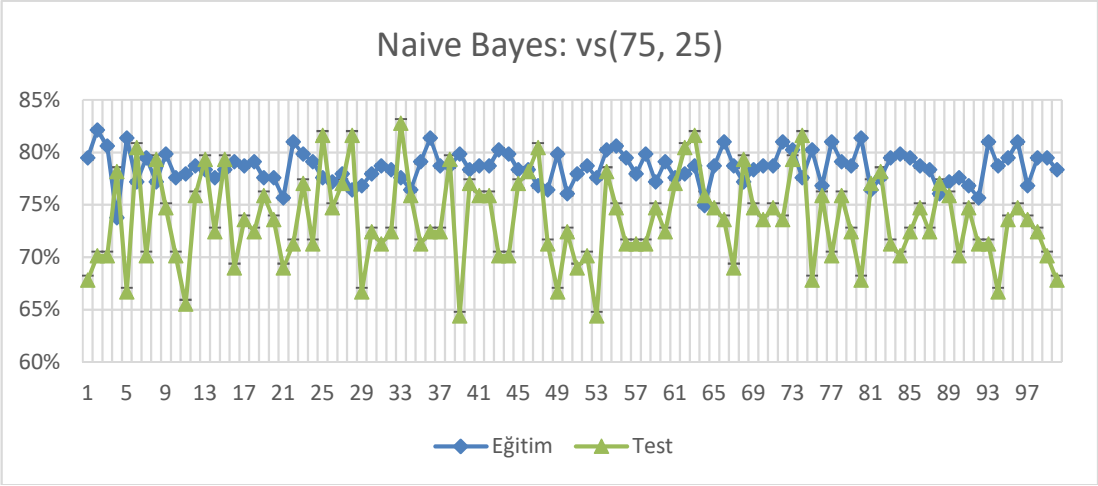
Şekil Ek A.25. DT'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



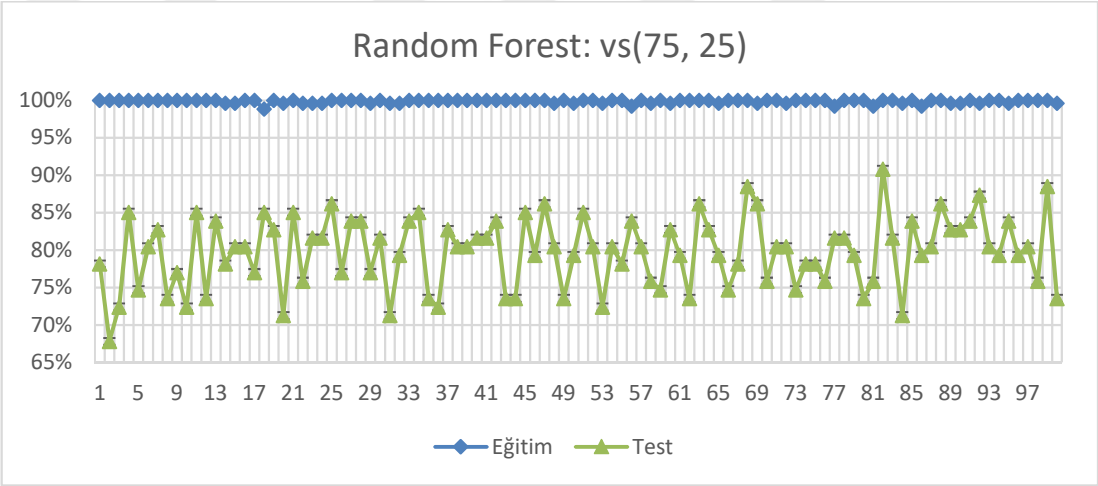
Şekil Ek A.26. k-NN'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



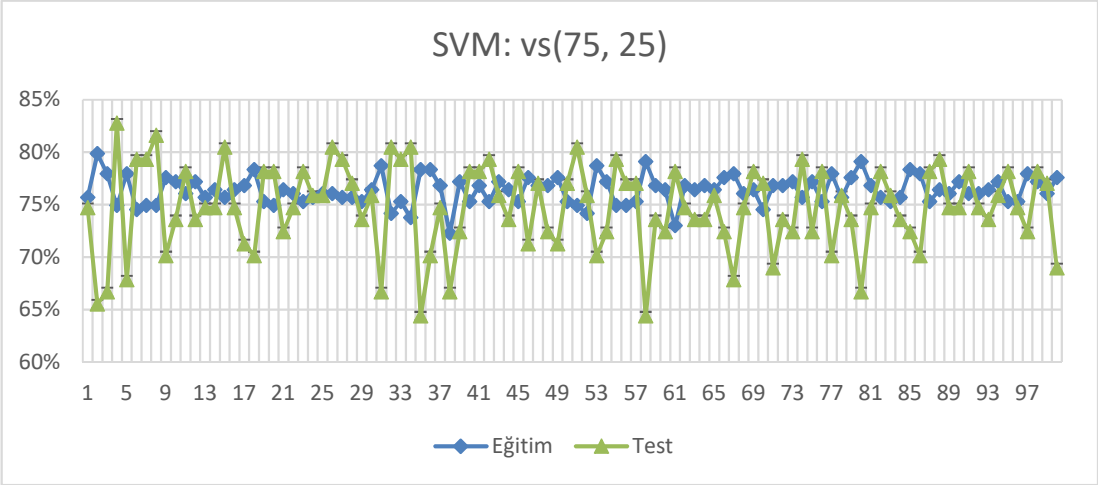
Şekil Ek A.27. MLR'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



Şekil Ek A.28. NB'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



Şekil Ek A.29. RF'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.



Şekil Ek A.30. SVM'nin vs(75, 25)'e göre eğitim ve test başarı oranları.

ÖZGEÇMİŞ

Abdullah ELEN, 1981 yılında Bursa'da doğdu; ilk ve orta öğrenimini aynı şehirde tamamladı. Tophane Anadolu Meslek Lisesi Bilgisayar Donanım Bölümü'nden 2001 yılında mezun oldu ve aynı yıl Uludağ Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu Bilgisayar Donanımı Önlisans Programı'nda öğrenime başlayıp 2003 yılında iyi derece ile mezun oldu. 2003–2005 yılları arasında çeşitli firmalarda tekniker ve programcı olarak görev yaptı. 2005–2008 yılları arasında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Bilgisayar Öğretmenliği programını tamamlayarak 2009 yılında Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Elektronik ve Bilgisayar Eğitimi Anabilim Dalı'nda Yüksek lisansa başladı ve aynı yıl Karabük Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı ve halen aynı yerde çalışmaya devam etmektedir.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Karabük Üniversitesi
Fen Bilimler Enstitüsü
Balıklarkayası Mevkii / KARABÜK
Tel : (507) 923 9116
E-posta : aelen@karabuk.edu.tr