

**FARE TESTİSİ MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİNDEN
YAPAY ZEKÂ TEKNİKLERİ İLE TÜBÜL VE
SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE TESPİTİ**

**DETECTING TUBULES AND SPERMATOGONIAL STEM
CELLS IN MOUSE TESTIS MICROGRAPHS BY USING
ARTIFICIAL INTELLIGENCE TECHNIQUES**

BURAK KAHVECİ

PROF. DR PETEK KORKUSUZ

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ FUAT AKAL

Yardımcı Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

FARE TESTİSİ MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİNDEN YAPAY ZEKÂ TEKNİKLERİ İLE TÜBÜL VE SPERMATOGONYAL KÖK HÜCRE TESPİTİ

Burak KAHVECİ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Yardımcı Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fuat AKAL

Ocak 2021, 57 Sayfa

Spermatogonyal kök hücreler fertilitiyi sağlayan az sayıdaki sperm öncülleri olup saptanmaları zordur. Puberte öncesi testis hasarıyla gelişen infertilitede spermatogonyal kök hücre havuzunun sayıca belirlenmesi klinik için önemlidir. Görüntü işleme ve yapay zekâ alanındaki bölütleme ve öznitelik çıkartma yöntemleri ile somatik ve germ hücreleri saptanarak sayılabilmektedir. Bu çalışmada bölütleme, öznitelik çıkarımı ve derin öğrenme (YOLOv4) yöntemleriyle testis kesit mikrograflarındaki verilerle seminifer tübülleri ve spermatogonyal kök hücrelerin hızlı, pratik ve güvenli bir şekilde tanımlanması ve sayılmasını sağlayan bir biyomühendislik sistemi geliştirileceği varsayılmıştır. Bu varsayımı test etmek için C57BL/6 yeni doğan farelerin testis parafin bloklarının seri kesitlerinde hematoksilin-eozin ve spermatogonyal kök hücre belirteci SALL4 ile işaretlenmiştir. 66 dijital mikrografta aktif kontur modeliyle elde edilen seminifer tübül veri setlerinde makine öğrenmesi yöntemleri; destek vektör makineleri,

karar ağacı, rastgele orman, naive bayesian, k en yakın komşu ve lojistik regresyon kullanılarak sınıflandırma işlemi gerçekleştirildiğinde sırasıyla %96,5, %96,5, %97,1, %90,4, %89,1 ve %96,5 oranında tespit sağlanmıştır. YOLOv4 tekniğinde kullanılmak üzere seminifer tübül için 12734 adet veri, spermatogonyal kök hücre için 9889 adet veri kullanılarak veri seti oluşturulmuştur. Buna göre seminifer tübülleri %94, spermatogonyal kök hücreler %93 oranında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yeni doğan erkek fare testis kesitlerinden elde edilen mikrogramlarla oluşturulan bu yapay zekâ teknikleri ile spermatogonyal kök hücrelerin tespitini sağlayarak başarıyla çalışmış olup, elde edilen sonuçlar ileri çalışmalarla geliştirildiğinde, deneysel hayvan modellerinde spermatogonyal kök hücre havuzunun hesaplanması için ve prepubertal testis biyopsisi alınan çocuklarda biyopsi etkinliğini belirlemek üzere kliniğe aktarılacak yeni ürünler oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Testis, spermatogonyal kök hücre, görüntü işleme, makine öğrenmesi, derin öğrenme

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından (TYL-2019-18375) desteklenmiştir. Burak Kahveci TÜBİTAK 1001 programı tarafından (218S421) bursiyer olarak desteklenmiştir.

ABSTRACT

DETECTING TUBULES AND SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN MOUSE TESTIS MICROGRAPHS BY USING ARTIFICIAL INTELLIGENCE TECHNIQUES

Burak KAHVECİ

Master of Science, Department of BIOENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Co- Supervisor: Asst. Prof. Dr. Fuat AKAL

January 2021, 57 pages

Spermatogonial stem cell that provide male fertility, are few in number and difficult to detect. The cells numbers detection is critical in infertility due to prepubertal testicular damage. Several cell types can be counted by segmentation and feature extraction methods by image processing and artificial intelligence technique. In this study, we hypothesized to develop a bioengineering system that allows rapid, safe and easy quantification of spermatogonial stem cells by using segmentation, feature extraction and deep learning methods (YOLOv4). To test this hypothesis, paraffin serial sections were obtained from C57BL / 6 type newborn male mice testes and stained with hematoxylin eosin and SALL4 that is a spermatogonial stem cells marker. Classification process was performed using machine learning methods, support vector machines, decision tree, random forest, naive bayesian, k nearest neighbor, and logistic regression and

seminiferous tubule data sets were obtained with active contour model in 66 digital micrographs, the detection rate was calculated as 96,5%, 96,5%, 97,1%, 90,4%, 89,1%, and 96,5% for respectively support vector machines, decision tree, random forest, naive bayesian, k nearest neighbor, and logistic regression. A data set was created using 12734 and 9889 data by YOLOv4 for seminiferous tubules and spermatogonial stem cell respectively. The detection rate was 94% and 93% for seminiferous tubules and spermatogonial stem cells respectively. In conclusion, a new artificial intelligence technique has been created by using testicular section micrographs and it has been successfully worked for detecting spermatogonial stem cells. This new bioengineering product has a potential to be translated into in vivo experimental animal models in order to calculate spermatogonial stem cell pool number and then to be used in prepubertal children testicular biopsies in future.

Keywords: Testis, spermatogonial stem cell, image processing, machine learning, deep learning

This thesis was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Project Coordination Unit, (#TYL-2019-18375) TÜBİTAK 1001 program supported Burak Kahveci as a scholar (#218S421)

TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca yapmak istediğim çalışmalarda beni cesaretlendiren, özgür ve geniş çalışma olanağı sağlayan, çalışma disiplinimi geliştirip, her zaman yol gösterici olan sayın danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a; yapay zekâ çalışmalarına kolay adapte olmamı sağlayan, çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen değerli yardımcı tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fuat Akal'a; tez çalışmam sürecinde hem laboratuvar teknikleri ile ilgili kendisinden birçok şey öğrendiğim ve her zaman yanımda olan Arş. Gör. Selin Önen'e; laboratuvarda deneylerim sırasında her zaman destek olan Arş. Gör. Sefa Burak Çam ve Eda Çiftçi Dede'ye; her konuda bana desteklerini esirgemeyen takım arkadaşlarım Arş. Gör. Özge Boyacıoğlu, Merve Gizer ve Oya Elif Daldal'a; yüksek lisans sürecim boyunca zorlu zamanlarımda her zaman yanımda olan ve birlikte eğlenebildiğim dostlarım Ahmet Meneviş ve Büşra Can'a; sevgilerini ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen dedem, anneannem, babaanneme; hayatım boyunca beni hep destekleyen, bana her zaman güvenen kazandığım başarıların en önemli nedenleri olan canım annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve arkadaşlarıma değerli katkıları için minnettarım.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca TÜBİTAK (Proje No: 218S421) tarafından sağlanan finansal destek için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yapılmasına maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (TYL-2019-18375) teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLO DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Testis ve Spermatogonyal Kök Hücreler.....	6
2.1.1. Spermatogonyal Kök Hücreler	6
2.1.2. Spermatogenez	6
2.1.3. Spermatogonyal Kök Hücre Nişinin Hücresel Bileşenleri	8
2.1.4. Spermatogonyal Kök Hücreler ve Sertoli Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri	9
2.2. Görüntü İşleme ve Makine Öğrenmesi.....	10
2.2.1. Bölütleme	10
2.2.2. Öznitelik Çıkarma	11
2.2.3. Sınıflandırma.....	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	17
3.1. C57BL/6 türü yeni doğan erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle Spermatogonyal kök hücre nişi bileşenlerinin işaretlenmesi.....	17
3.1.1. Histokimyasal yöntemle fare testis örneklerinin işaretlenmesi.....	17
3.1.2. İmmünohistokimyasal işaretleme ile spermatogonyal kök hücrelerin immün işaretlenmesi	17

3.2. Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda testis mikrograflarının elde edilmesi	18
3.3. Testis mikrograflarında yer alan seminifer tübüllerdeki spermatogonyal kök hücrelerin manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanıp etiketlenmiş veri setinin oluşturulması	18
3.4. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine öğrenmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritmasının geliştirilmesi. Geliştirilen algoritmanın etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların değerlendirilmesi	19
3.4.1. Testiste bulunan seminifer tübülleri ayırt eden bir sistemin geliştirilmesi	19
3.4.2. Bazal membrandaki hücrelerin ayırt edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin Sertoli hücrelerinden ayrımı	19
3.4.3. Görüntü işleme sürecinden geçmiş görüntüler kullanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilmesi	20
3.5. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması. Kurulan bu modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması....	21
4. SONUÇLAR	22
4.1. C57BL/6 türü yeni doğan erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle Spermatogonyal kök hücre nişi bileşenlerinin işaretlenmesi ve dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda testis mikrograflarının elde edilmesi	22
4.2. Testis mikrograflarında yer alan seminifer tübüllerdeki spermatogonyal kök hücrelerin manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanıp etiketlenmiş veri setinin oluşturulması	23
4.3. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine öğrenmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritmasının geliştirilmesi. Geliştirilen algoritmanın etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların değerlendirilmesi	24
4.3.1. Testiste bulunan seminifer tübülleri ayırt eden bir sistemin geliştirilmesi	24

4.3.2.	Bazal membrandaki hücrelerin ayırt edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin Sertoli hücrelerinden ayrımı	25
4.3.3.	Görüntü işleme sürecinden geçmiş görüntüler kullanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilmesi.....	26
4.4.	Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması. Kurulan bu modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	30
4.4.1.	Seminifer tübüllerin YOLOv4 yöntemi ile saptanması	30
4.4.2.	Spermatogonyal kök hücrelerin YOLOv4 yöntemi ile saptanması	36
5.	TARTIŞMA.....	42
6.	YORUM	53
	KAYNAKLAR.....	54
	EKLER	58
	EK 1: Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu Karar Yazısı	58
	Orijinallik Raporu	60
	ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çalışmanın hedefleri çerçevesindeki iş akış şeması verilmiştir.	5
Şekil 2.1. Fare ve insanda spermatogenezin aşamaları gösterilmiştir.	7
Şekil 2.2. Spermatogonyal kök hücre nişi gösterilmiştir. GDNF: Gliyal Hücre Türevi Nörotropik Faktör, IGF1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü, FGF2: Fem-3 Bağlayıcı Faktör 2, CSF1: Koloni Uyarıcı Faktör 1.	8
Şekil 2.3. Testisin mikroskopik parçaları ve burada bulunan, spermatogenezde rol olan hücreler gösterilmiştir.	9
Şekil 2.4. Yenidoğan fare testis mikrogramında K-Means ile yapılan bir bölütleme örneği gösterilmiştir. A’da ham görüntü B’de bölütleme ile tabandan ayrılan seminifer tübül hücrelerine ait mikrogram görülmektedir. (A, B) x630 Hematoksilen Eozin.....	11
Şekil 2.5. Testis seminifer tübül mikrogramında öznitelik olarak kullanılabilecek çıktılarına örnekler verilmiştir. A’da seminifer tübüllerin öznitelik olarak kullanılabilecek kısmaları verilmişken B’de SKH’lerin öznitelik olarak kullanılabilecek kısmı gösterilmiştir. x630, Hematoksilen Eozin	12
Şekil 2.6. Örnek bir sınıflandırma süreci gösterilmiştir. Buna göre X ve Y mavi, yeşil, bordo tanecikler birbirinden farklı sınıfları ifade etmektedir.	13
Şekil 2.7. Sınıflandırma süreci, verilerin toplanması, veri ön işleme, öznitelik çıkarımı eğitim ve test veri seti olarak ayrılması, sınıflandırma ve değerlendirme aşamaları gösterilmektedir.	14
Şekil 3.1. Ölçüm metriklerinin formülleri verilmiştir.....	20
Şekil 4.1. C57BL/6 türü altı günlük fare testisine ait tüm kesitin, x630 büyütmesine mikrogramlar birleştirilerek elde edildiği mikroskop görüntüsünde seminifer tübüller ve bunları döşeyen hücreler izlenmektedir. x630, Hematoksilen Eozin	22
Şekil 4.2. Altı günlük C57BL/6 türü fare testis kesitinin indirekt immünperoksidaz yöntemiyle SALL4 antikoru için immün işaretlendiği mikrogramlardır. İmmün işaretleme yapılan seminifer tübüllerden bazıları oklarla işaretlenmiştir. (A) x100, (B) x200. Kromojen DAB, çekirdek hematoxilen.....	23

- Şekil 4.3. C57BL/6 türü altı günlük fare testis kesitinden elde edilen mikrograflara geliştirilen aktif kontur temelli sistemin uygulanması sonucu elde edilen çıktılar görülmektedir. (A) Hematoksilen eozin boyalı kesitten elde edilmiş mikrograftır. (B)'de sistemin seminifer tübülü tanımlaması için kırmızı kesikli çizgi ile çizilen sınırlar gösterilmiştir. (C)'de sınırların içinde sistem tarafından seminifer tübül mavi çizgi belirlenmiştir. (D)'de kesikli çizgiyle çizilen sınırlar kaldırılıp seminifer tübül tespitinin tamamlandığı mikrograftır. (A-D) x630, Hematoksilen Eozin.....25
- Şekil 4.4. C57BL/6 türü altı günlük fare testis kesitinin hematoksilen eozin boyalı kesitinden elde edilen mikrograflara geliştirilen hücre tespit ve sayım sisteminin uygulanması sonucu elde edilen çıktılar şematize edilmiştir. Yeşil çizgiler tespit edilen hücreleri göstermektedir. (B) kısmında tespitin yeterli olmadığı görülmektedir. (A) x630, (B) x630. Hematoksilen eozin.....26
- Şekil 4.5. Çeşitli makine öğrenmesi yöntemleriyle yapılan deneyler sonucu oluşan hata matrisleri verilmiştir28
- Şekil 4.6. Makine Öğrenmesi yöntemlerinin performanslarını yansıtan doğruluk, fl skoru, hassasiyet ve kesinlik skorları karşılaştırılmıştır.30
- Şekil 4.7. Döngü sayılarına göre mAP ve kayıp değerlerinin kıyaslanması verilmiştir. Yatay eksen döngü sayısını, dikey eksen ise kayıp değerini göstermektedir. Mavi çizgiler kayıp değeri, kırmızı çizgiler mAP değerini ifade etmektedir. 3000 döngü sayısına sahip süreçte ortalama kayıp değeri 1,93 ile sonuçlanırken, mAP ise %94 değerine ulaştığı görülmektedir.....31
- Şekil 4.8. Yenidoğan C57BL/6 fare testis kesitlerinde bir kısmı mikrograf dışında yer almasına rağmen tespit edilen seminifer tübüller verilmiştir. Tamamı mikrografta yer almamasına rağmen sistem tarafından tespit edilen seminifer tübüller okla işaretlenmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği dörtgen üzerinde verilen sayı değerleri tespitin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A-E) x630, Hematoksilen Eozin33
- Şekil 4.9. Uygun seminifer tübül yer almayan mikrografların YOLOv4 ile denenmesi sonucu elde edilen çıktılar verilmiştir. Sistemin burada herhangi bir tespit yapmaması onun yüksek mAP skorunu doğrular niteliktedir. (A-E) x630, Hematoksilen Eozin.....34

Şekil 4.10. Algoritma tarafından tespit edilemeyen seminifer tübüllerin bulunduğu mikrograflar verilmiştir. Mikrograflardaki tespit edilemeyen seminifer tübüller okla işaretlenmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespitinin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A-F) x630, Hematoksilen Eozin	35
Şekil 4.11. Algoritma tarafından uygun seminifer tübüllerin tespit edildiği mikrograflar arasından örnekler verilmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespitinin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A-F) x630, Hematoksilen Eozin.....	36
Şekil 4.12. Döngü sayılarına göre mAP ve kayıp değerlerinin kıyaslanması verilmiştir. 4000 döngü sonucunda kayıp değeri 6,42 ile sonuçlanırken mAP değeri ise %93'e ulaşmıştır.....	38
Şekil 4.13. C57BL/6 yenidoğan fare testis kesitlerinde uygun olmayan seminifer tübülünden seçilen SKH'ler oklarla gösterilmiştir. Hücrelerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespitinin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A, B) x630, Hematoksilen Eozin	39
Şekil 4.14. Algoritmanın tespit ettiği SKH sayılarının düşük olduğu örnekler verilmiştir. Hücrelerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespitinin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A, B) x630, Hematoksilen Eozin	40
Şekil 4.15. Algoritmanın yüksek oranda tespit ettiği SKH'ler bulunan örnek mikrograflar verilmiştir. (A-I) x630, Hematoksilen Eozin	41

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.1 Makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemlerinin çeşitli doku ve hücrelerde olan uygulamaları özetlenmektedir.....	1
Tablo 4.1. Makine öğrenmesi yöntemlerinin performanslarını yansıtan doğruluk, f1 skoru, hassasiyet ve kesinlik skorları verilmiştir.....	29
Tablo 4.2. Etiketlenmiş seminifer tübül mikrogramları ile eğitilen YOLOv4 algoritmasının test skorları verilmiştir.....	32
Tablo 4.3. Etiketlenmiş SKH mikrogramları ile eğitilen YOLOv4 algoritmasının test skorları verilmiştir. Yöntemin %93 ile kabul edilebilir bir mAP skoruna ulaştığı görülmektedir.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μm Mikrometre

Kısaltmalar

A_{al}	<i>A aligned spermatogonyum</i>
AB	Adaboost
A_{d}	<i>A dark spermatogonyum</i>
AKM	Aktif Kontur Modeli
A_{p}	<i>A pale spermatogonyum</i>
A_{pr}	<i>A paired spermatogonyum</i>
A_{s}	<i>A single spermatogonyum</i>
AUC	Eğri Altında Kalan Alan
BRISK	İkili Sağlam Bağımsız Temel Öznitelikler
CLAHE	Kontrast Sınırlı Adaptif Histogram Eşitleme
Ç-ESA	Çift Evrişimsel Sinir Ağları
ÇKA	Çok Katmanlı Algılayıcı
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DKA	Derin Kalıntı Ağı
DVM	Destek Vektör Makineleri
DİA	Derin İnanç Ağları
ESA	Evrişimsel Sinir Ağları
Faster R-CNN	Daha Hızlı Bölgesel Tabanlı Sinir Ağları
GPU	Grafik İşlemci Birimi

KNN	K En yakın Komşu
KA	Karar Ağacı
LR	Lojistik Regresyon
mAP	Ortalama Hassasiyet
NB	Naive Bayes
RGB	Kırmızı Yeşil Mavi
RAM	Rastgele Erişimli Bellek
SKH	Spermatogonyal Kök Hücreler
TEA	Tam Evrişimli Ağ
UKSB	Uzun Kısa Süreli Bellek
YOLO	<i>You Only Look Once</i>
YEOK	Yığınllı Evrişimli Otomatik Kodlayıcılar
YOK	Yığınlanmış Otomatik Kodlayıcılar

1. GİRİŞ

Yapay zekânın gelişim ivmesinin artmasıyla birlikte özellikle medikal alanda etkisi de hızla güçlenmektedir [1]. Yapay zekâ, makine öğrenmesi ve derin öğrenme gibi teknikleri içinde barındırır. Makine öğrenmesi konuşmayı metne dönüştürme, haberleri veya e-ticaret sitelerindeki ürünleri ilgili kişilerle eşleştirme ve görüntülerde bulunan nesneleri tanıma gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır [2]. Ancak, makine öğrenmesi yöntemleri veri boyutunun artması sonucunda yetersiz kalır ve iyi sonuçlar vermemeye başlar. Derin öğrenme ham verilerin öğrenilmesi açısından geleneksel makine öğrenmesi yöntemlerinden farklıdır ve öğrenmek için sinir ağlarına dayanan çoklu işlem katmanlarına sahip hesaplama modellerini kullanır [3]. Makine öğrenmesinin veri işleme sınırlamaları nedeniyle özellikle görüntü tanıma gibi yüksek boyutlu ve karmaşık verilerin bulunduğu alanlarda derin öğrenme kullanımı yaygınlaşmaktadır [2]. Yapay zekâ temelli medikal uygulamalar, tanı ve tedavi protokollerinde kullanılabilir. Bu uygulamalar tıpta yapay zekâ teknikleri, veri madenciliği, tıbbi uzman sistemler, makine öğrenmesi temelli sistemler, medikal sinyal ve görüntü işleme tekniklerini kapsar [4].

Klinikte dokularda bulunan bazı hücrelerin belirli koşullardaki tespiti, ilgili dokulardaki hastalıkların tanısının konulmasında kritik rol oynar. Bu tespitler makine öğrenmesi ve derin öğrenme teknikleri ile yapılabilir. Makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemlerinin farklı doku ve hücre tiplerindeki çalışmaları Tablo 1.1’de özetlenmiştir.

Tablo 1.1 Makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemlerinin çeşitli doku ve hücrelerde olan uygulamaları özetlenmektedir.

Veri Seti	Sonuçlar	Kaynaklar
Fare testis kesiti	Tübül tiplerini sınıflandırmak için YEOK'lara dayanan hiper katman eklenmiş yeni bir mimari kullanılmıştır ve %98 doğruluk elde etmiştir.	[5]
	Seminifer tübüllerin tespiti, çoklu hücre bölütlemesi ve çoklu bölge bölütlemesi için ResNet ve TEA	[6]

	kullanılmıştır ve sırasıyla %94,40, %91,26, ve %93,47 doğruluk değerleri elde edilmiştir.	
	Seminifer tübül, spematojenik hücre tipleri, çoklu bölge bölütlemesi için U-net kullanılmıştır ve sırasıyla %91,20, %92,95 ve %91,08 doğruluk değeri elde edilmiştir.	[7]
Sıçan testis kesiti	U-net temelli derin öğrenme modeliyle spematojenik evrelemesi tanımlanmıştır ve U-net ile %98,4 doğruluk değeri elde edilmiştir.	[8]
Sperm	Tümörü infiltre eden lenfositleri tespit için derin öğrenme algoritması kullanılmıştır ve bu hücrelerin manuel tespit edilen sayıları ile %89 korele olarak bulunmuştur.	[9]
	Gasohole maruz kalan yetişkin erkek sıçanların sperm kalitesinin değerlendirildiği çalışmada ESA, bayes sınıflandırıcısı, KNN, DVM ve optimum-yol ormanı sınıflandırıcıları kullanılmıştır. Bunlar arasından en iyisi DVM olup bu yöntemle %90 doğruluk elde etmiştir	[10]
	Sperm başı sınıflandırması için kullanılan VGG16 ile %94 doğruluk elde edilmiştir.	[11]
	Sperm parçalarının sınıflandırılmasında kullanılan ESA baş, akrozom ve çekirdek sınıflandırmasında sırasıyla %90,4, %77,3, %78,8 Dice benzerlik katsayısı elde etmiştir.	[12]
	İnsan spermlerinin farklı kısımlarını tespit etmesi kullanılan ESA ile akrozom, baş ve koful için doğruluk değeri sırasıyla %76,67, %77 ve %91,33 olarak elde edilmiştir.	[13]
İnsan Over dokusu	Hematoksilen eozin ile boyanmış over doku kesitinin epitel ve stromal bölge ayrımı için	[14]

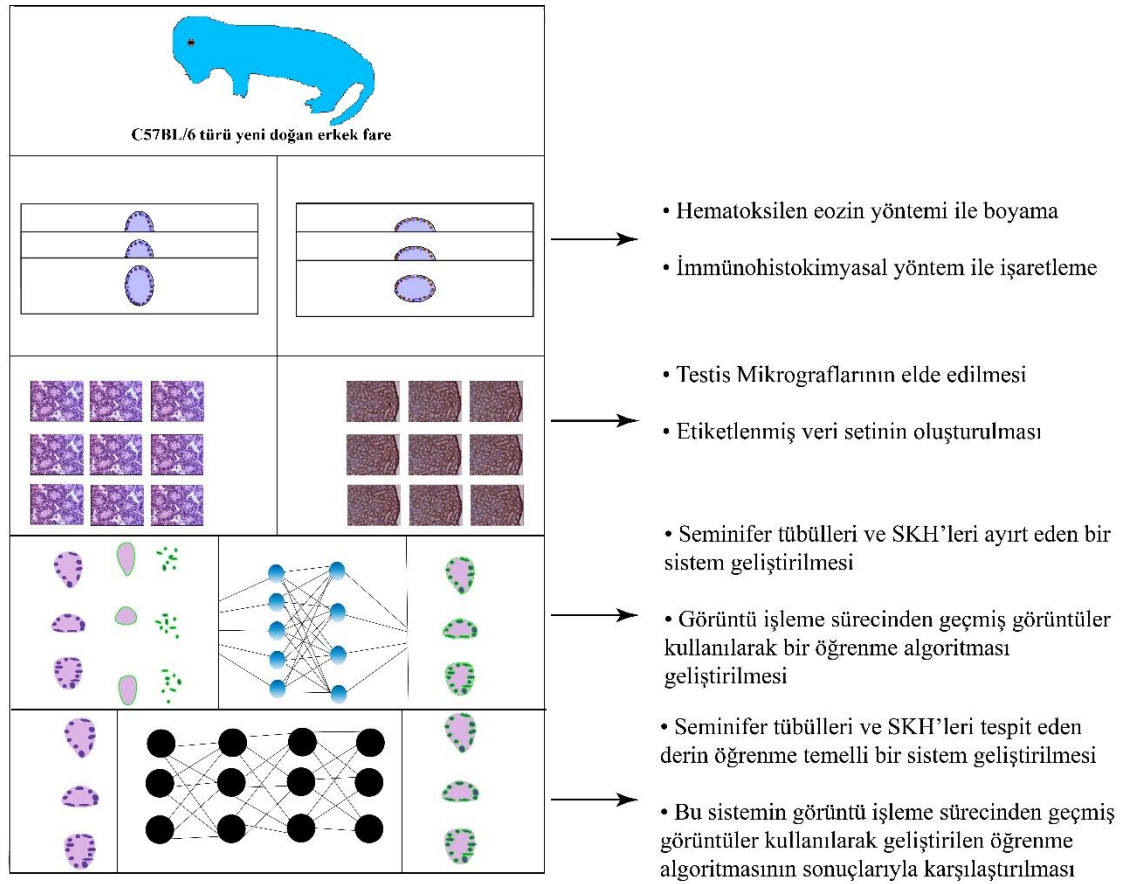
	GoogleLeNet ile birlikte kullanılan ESA %90,2 doğruluk değeri elde etmiştir.	
	Yumurtalık kanseri türlerini sınıflandırmak için AlexNet'i temel alan bir ESA kullanılarak %78,20 doğruluk elde edilmiştir.	[15]
İnsan indüklenmiş pluripotent kök hücresi	İnsan pluripotent kök hücresi kökenli kardiyomiyositlerin nitelik belirlenmesi için ESA kullanılmıştır ve %89 fl-skoru elde edilmiştir.	[16]
Sıçans indüklenmiş pluripotent kök hücresi	İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin sağlıklı ve sağlıklı kolonilerinin ayrımını yapmak için kullanılan sınıflandırıcılar için doğruluk değerleri DVM için %91,6, RO için %87,5, ÇKA için %73,3, KA için %83,3 ve AB için %87,5 olarak elde edilmiştir.	[17]
İnsan kan ve kemik iliği yayma görüntüleri	Lökosit tespiti ve sınıflandırması için ESA kullanılmıştır ve bu yöntemle %92,8 doğruluk değeri elde edilmiştir.	[18]
	Akut lenfoblastik löseminin otomatik tespiti için yapılan çalışmada ESA ile sırasıyla L1, L2, L3 ve normal tipi için %99,06, %93,33, %93,75 ve %98,11 doğruluk değerleri elde edilmiştir.	[19]
	Beyaz kan hücrelerinin tanımlanması için kullanılan ESA %96,1 doğruluk değeri elde etmiştir.	[20]
	Beyaz kan hücresi tespitinde YOLOv4 Alexnet ile birlikte kullanıldığında %98 mAP değerine ulaşmıştır.	[21]

Spermatogonyal kök hücreler (SKH) erişkin erkek genital sisteminde testiste yerleşik, fertilitayı sağlayan az sayıdaki sperm öncülleri olup mikroskopik yapısal özellikleriyle saptanmaları zorluk arz eder [22]. Puberte öncesi testis hasarıyla gelişen infertilitede seminifer kordlardaki SKH'lerin saptanması ve sayılarının belirlenmesi klinik için

önemlidir. Görüntü işleme ve yapay zekâ alanındaki bölütleme ve öznitelik çıkartma yöntemleriyle somatik ve germ hücreleri saptanarak sayılabilmektedir [23-26]. Bu çalışmanın amacı bölütleme ve öznitelik çıkarımı gibi yöntemlerle görüntülerin işlenip etiketli veriler üretilerek mikroskop görüntülerindeki seminifer tübüllerinde bazal membranda tutunan SKH'lerin morfolojik farklılıklar kullanılarak hızlı, pratik ve güvenli bir şekilde tanımlanması ve sayılmasına olanak sağlayabilmesidir. Bu varsayımı test etmek üzere spermatogenezin başlamadığı yenidoğan fare testis kesitlerinden elde edilen mikrograflarda bölütleme ve öznitelik çıkarımı yöntemleri uygulanıp SKH'leri morfolojik öznitelik temelli olarak saptayan; hücrelerin güvenli ve hızlı sayımını sağlayacak biyomühendislik çerçevesinde yapay zekâ temelli yenilikçi bir analiz sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç kapsamında aşağıdaki araştırma hedefleri tamamlanmıştır (Şekil 1.1).

1. C57BL/6 türü 6 günlük erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle SKH nişi bileşenlerinin işaretlenmesi;
2. Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda testis mikrograflarının elde edilmesi;
3. Testis mikrograflarında yer alan seminifer tübüllerdeki SKH'lerin manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanıp etiketlenmiş veri setinin oluşturulması;
4. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine öğrenmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritmasının geliştirilmesi ve test edilmesi;
5. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması; kurulan modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi ve sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması;



Şekil 1.1. Çalışmanın hedefleri çerçevesindeki iş akış şeması verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis ve Spermatogonyal Kök Hücreler

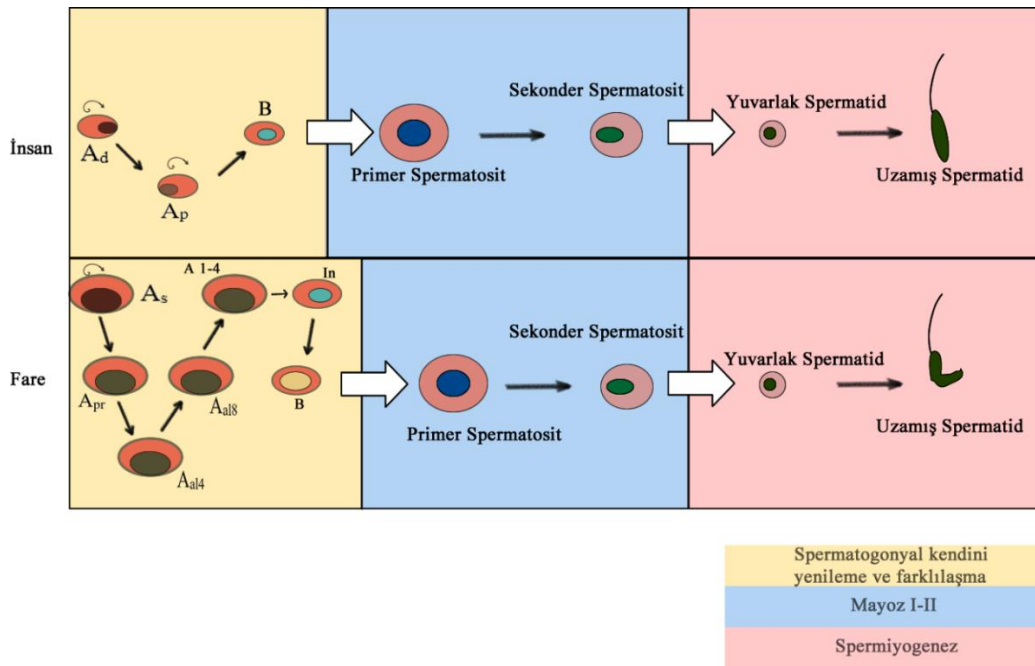
2.1.1. Spermatogonyal Kök Hücreler

Testis, sperm oluşumunu sağlayan ve sekonder erkek karakterlerinin oluşumunu destekleyen organdır. Spermatogonyal kök hücreler erkek fertilitesi için gerekli temel öncül hücre havuzunu oluşturmaktadır [27, 28]. Bu hücreler unipotenttir ve sadece olgun sperm hücrelerine farklılaşabilir [29]. Spermatogonyal kök hücrelerin görevi genetik ve epigenetik bilgileri gelecek nesillere taşımak amacıyla spermatozoon olmaktır. Spermatogonyal kök hücreler, puberteye kadar sessiz kalıp spermatogonyum olarak farklılaşabilir [30]. **İnsanda** SKH'ler, A_{pale} (A_p) ve A_{dark} (A_d) spermatogonyumlardan oluşur. A_p ve A_d spermatogonyum temelde benzer hücrelerdir ancak hücre döngüsünün farklı evrelerinde bulunur [31]. **Farede** SKH'leri A_{single} (A_s), A_{paired} (A_{pr}) ve $A_{aligned}$ (A_{al}) spermatogonyumlar oluşturur. Spermatogonyal kök hücreler farklılaşarak spermatogonyal seri hücreleri ve son adımda olgun, fertil spermatozoonları oluşturur [28].

2.1.2. Spermatogenez

Spermatogenez, puberte ile başlangıç gösteren, seminifer tübüllerde meydana gelen ve olgun gamet üretimiyle sonuçlanan süreçtir. Bu süreç, spermatogonyal faz, spermatosit fazı ve spermatid fazı olmak üzere 3 bölüme ayrılır [32]. Spermatogonyal faz, spermatogonyumun çoğalmasıyla başlayıp spermatositlerin farklılaşmasıyla sona erer. Ardından, spermatositlerden ($2n$) spermatid (n) üretiminin gerçekleştiği spermatosit fazı başlar. Oluşan spermatidlerin yuvarlak spermatidlere olgunlaştığı morfolojik dönüşüm sürecine spermatid fazı (spermiyogenez) adı verilir. Bu süreçte, spermatitlerin polaritesi belirlenir ve flagellum oluşumu başlar. Ardından, akrozomal vezikül düzleşir ve golgi aygıtı spermatidin boyun bölgesine göç eder. Spermatid yeniden yönlendirilerek flagellumun lümene uzanması ve akrozomun bazal laminaya doğru dönmesi sağlanır. Çekirdek düzleşir ve uzar. Sonrasında, akrozomal granül, farklılaşan akrozomal zarın tamamına yayılır. Spermiyasyondan hemen önce, son aşama olan testis seminifer tübül lümeni içinde özelleşmiş spermatozoonların salınması gerçekleşir [33]. Şekil 2.1'de görüldüğü üzere insanda spermatogenez sırasında diploit kromozoma sahip A_d spermatogonyumlar asimetrik bölünme ile A_p spermatogonyumları oluşturur. A_p

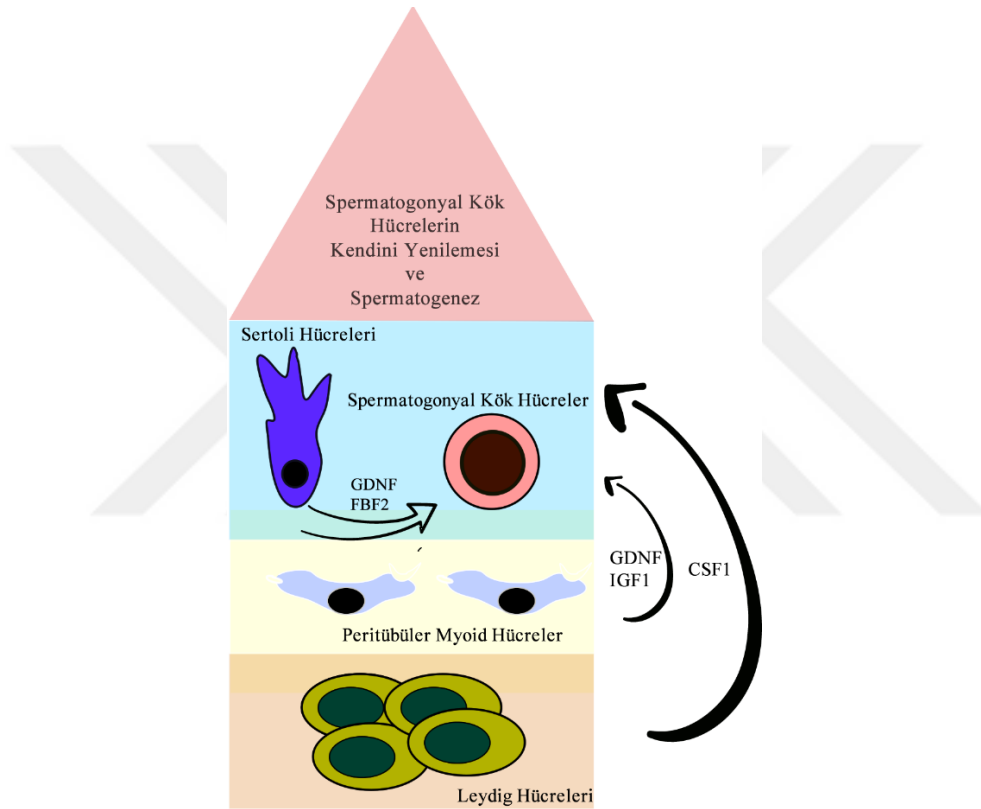
spermatogonyum bölünerek seminifer tübül bazal membranı üzerinde veya yakında daha büyük boyutlarıyla bulunan tip B spermatogonyumu oluşturur [28]. Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermatositleri oluşturur. Spermatositler (leptoten, zigoten, pachyten ve diploten), ergenlikte mayozun başlamasıyla seminifer tübüllerde oluşturulmaya başlanır. Mayoz bölünme sırasında, primer spermatositler sekonder spermatositleri; sekonder spermatositler yuvarlak spermatidleri oluşturur [34]. Ardından, spermiyogenez sürecinde yuvarlak spermatidlerden morfolojik transformasyon ile spermatozoon oluşumu gerçekleşir. Doğum sonrası fare testisindeki SKH aktivitesi her üç günde bir bölünen A_s spermatogonyumdan gelmektedir. Şekil 2.1’de görüldüğü üzere A_s spermatogonyumların mitotik bölünmesi sonucunda ya iki yeni A_s spermatogonyum oluşur ya da dörtlü A_{al} spermatogonyum üretilir. $A_{aligned}$ spermatogonyumların daha büyükleri $A1$ spermatogonyumlara farklılaşır. Tip A spermatogonyum mitotik bölünmelerle tip $A1$, $A2$ $A3$ veya 4 hücrelerine farklılaşır. Tetraploid primer spermatositler ise B tipi hücrelerden mitozla üretilir. Daha sonra mayoz bölünme sonucunda iki sekonder spermatositten iki haploid spermatid oluşturulur. Bu süreçte yer alan germ hücreleri sürecin başından sonuna gelindiğinde seminifer tübüllerde bazal membrandan lümene doğru hareket eder. Spermatid oluşumunun ardından spermatogenezin son evresi olan spermiyogenez süreci başlar. Burada akrozom oluşumunun ardından spermilere hareket yeteneğini kazandıran flagellum oluşur ve sperm oluşumu tamamlanır [28, 35].



Şekil 2.1. Fare ve insanda spermatogenezin aşamaları gösterilmiştir.

2.1.3. Spermatogonyal Kök Hücre Nişinin Hücresel Bileşenleri

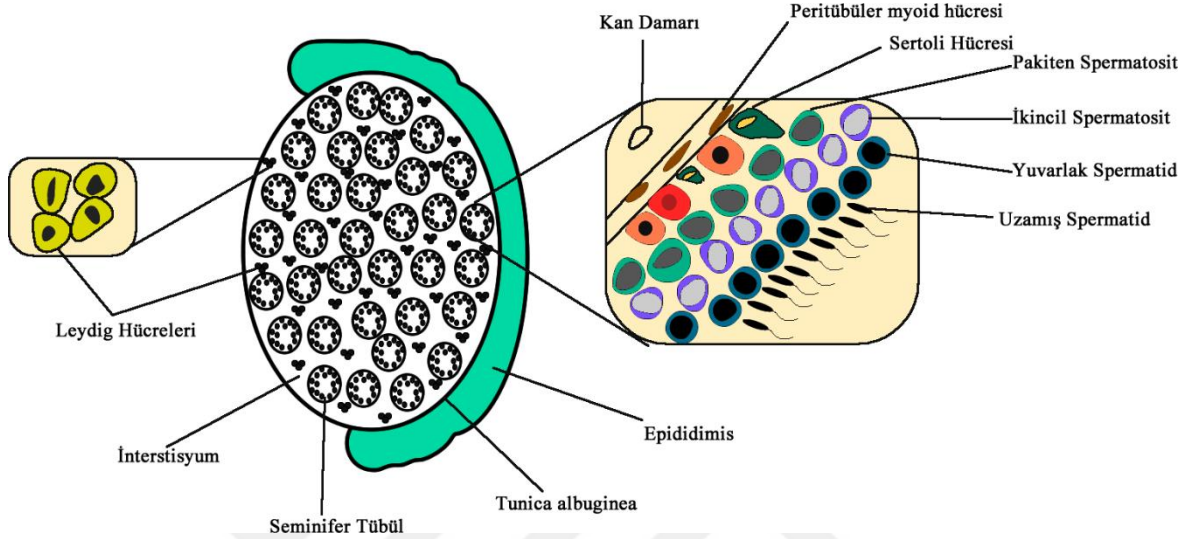
Spermatogonyal kök hücre nişi testiste kök hücelere yataklık eden, komşu hücrelerin sinyalleriyle proliferasyonlarını ve farklılaşmalarını kontrol eden fiziksel ve kimyasal bir mikroçevredir [36]. Spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma dengesi otokrin ve parakrin regülatör sinyaller aracılığıyla sağlanır [36]. Spermatogonyal kök hücreler; Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, peritübüler myoid hücreleri, peritübüler ve interstisyel makrofajlar ve damar endoteli hücreleri ile birlikte fiziksel ve hormonal bir mikroçevre (niş) içinde bulunur. Bu niş Şekil 2.2’de şematize edilmiştir [36].



Şekil 2.2. Spermatogonyal kök hücre nişi gösterilmiştir. GDNF: Gliyal Hücre Türevi Nörotropik Faktör, IGF1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü, FBF2: Fem-3 Bağlayıcı Faktör 2, CSF1: Koloni Uyarıcı Faktör 1.

Sertoli Hücreleri, SKH’ler ile birlikte seminifer tübül bazal membranında yerleşim gösteren ve spermatogenez süreci boyunca SKH ve tüm spermatojenik seri hücreleri ile fiziksel temas halinde olan destek hücreleridir [36]. Sertoli hücreleri histomorfometrik inceleme sırasında seminifer tübülde bazal membrana lokalize olma, poligonal hücre şekli, iri ve dağınık sitoplazmik uzantıları ve belirgin nükleolleri ile diğer hücrelerden

ayrıt edilir. Şekil 2.3’de görüldüğü üzere Leydig hücreleri, kan damarları ve seminifer tübüller arasında konumlanan, poligonal şekle sahip, kan damarı ve makrofajlarla birlikte intersitisyel dokuyu oluşturan primer testosteron kaynağı hücrelerdir [30]. Peritübüler myoid hücreler, kesintili hücre katmanlarından oluşan, yassı, mezenkimal kökenli hücrelerdir [30].



Şekil 2.3. Testisin mikroskobik parçaları ve burada bulunan, spermatogenezde rol olan hücreler gösterilmiştir.

2.1.4. Spermatogonyal Kök Hücreler ve Sertoli Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri

Sertoli hücrelerinin morfolojik çalışmaları ilk olarak ışık mikroskobu düzeyinde başlayıp daha sonra organellerin ve membranın daha detaylı görüntülerinin alınabildiği elektron mikroskobu incelemeleriyle devam etmiştir. Son dönemlerde ise immünokimyasal ve immüno Floresan teknikleri ile testiste spesifik protein lokalizasyonu ve Sertoli hücreleriyle germ hücrelerinin etkileşimleri 3 boyutlu görüntülenmiştir [37]. Bu hücrenin çekirdek şekli, ince sitoplazmik uzantıları, germ hücreleriyle karmaşık fiziksel birleşme durumu, spermatid ayrılma kompleksi gibi hücre morfolojik özellikleri üzerine incelemeler Sertoli hücreleri ilgili bilgileri artırmıştır. Büyük ve ökromatik çekirdekli bu hücreler seminifer tübül döngüsü boyunca şekil değiştirebilir [37]. Sertoli hücrelerinin çekirdekçikleri büyüktür ve yoğun bir biçimde boyanır. Çekirdekleri ise genellikle bazal membrana yakın şekilde konumlanır [37]. Hücre zarında derin girintiler ve yarıklar Sertoli hücrelerinin olgunlaşma belirtileridir. Sertoli hücrelerindeki uzun sitoplazmik kollar germ hücrelerini sarar ve bu durum Sertoli hücre plazma zarının yüzey alanını artırır. Bu

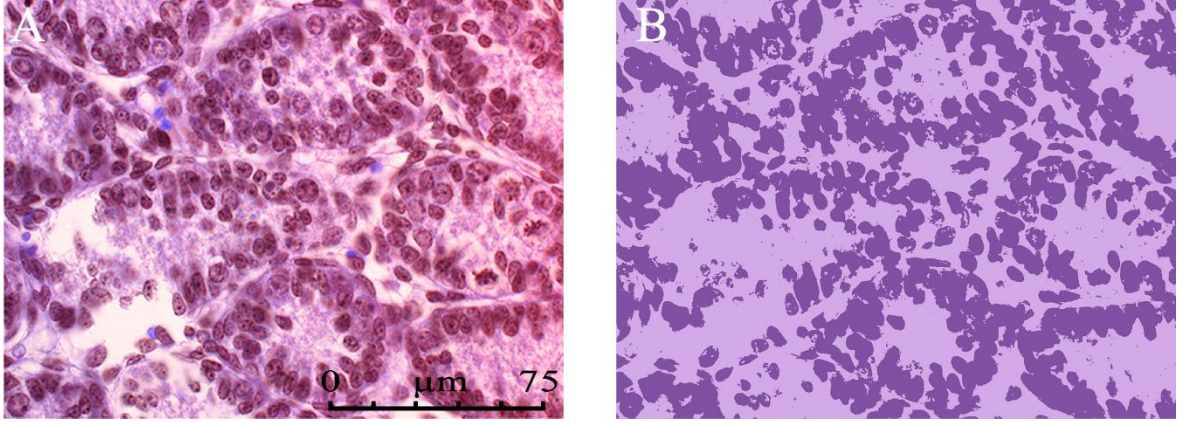
ise çok sayıda organelin yerinin değişmesinde ve farklı protein sınıflarının spesifik işlevler için seminifer epitel döngüsü boyunca spesifik bölgelere taşınmasını sağlar [37]. Spermatogonyal kök hücrelerde A_d spermatogonyum çekirdeği hematoksilin ile yoğun boyanan, küçük, küresel şekle sahip hücreler olup boyama sonrası çekirdeğin ortasında boyanmayan bir bölge görülür [28, 31]. A_{pale} spermatogonyumda ise zayıf ve homojen bir boyama görülür ve bu hücreler daha büyük ve oval hücrelerdir [28]. Sertoli hücreleri ve SKH'ler şekil olarak büyük oranda farklılıklar gösterir. Spermatogonyal kök hücreler daha ovalken Sertoli hücreleri poligonaldır. Ayrıca Sertoli hücrelerinin hücre döngüsü boyunca şekilleri değişir ve sahip oldukları sitoplazmik uzantıları onların hücre zarlarının yüzey alanlarını artırmasını sağlar. Sertoli hücrelerinin çekirdekçikleri büyüktür ve yoğun biçimde boyanır. Öte yandan, SKH'lerde çekirdekçik belirgin olmasına rağmen A_p spermatogonyumda zayıf boyanma görülürken A_d spermatogonyum yoğun boyanır.

2.2. Görüntü İşleme ve Makine Öğrenmesi

Girdi olarak seçilen görüntünün kullanıldığı, çeşitli tekniklerle çıktı olarak bu görüntünün daha geliştirilmiş halinin elde edildiği sürece görüntü işleme denir [38]. Görüntü işlemede görüntülerin sınıflandırılması ve tanınması için faydalı olacak öznitelikler önemli rol oynar. Özniteliklerin eldesinden önce, görüntüye ikilileştirme (*Binarization*), eşikleme (*Thresholding*), yeniden boyutlandırma (*Resizing*) ve normalizasyon (*Normalization*) gibi ön işlemler uygulanır [39]. Burada elde edilen öznitelikler ileri işlemler için kullanılır.

2.2.1. Bölütleme

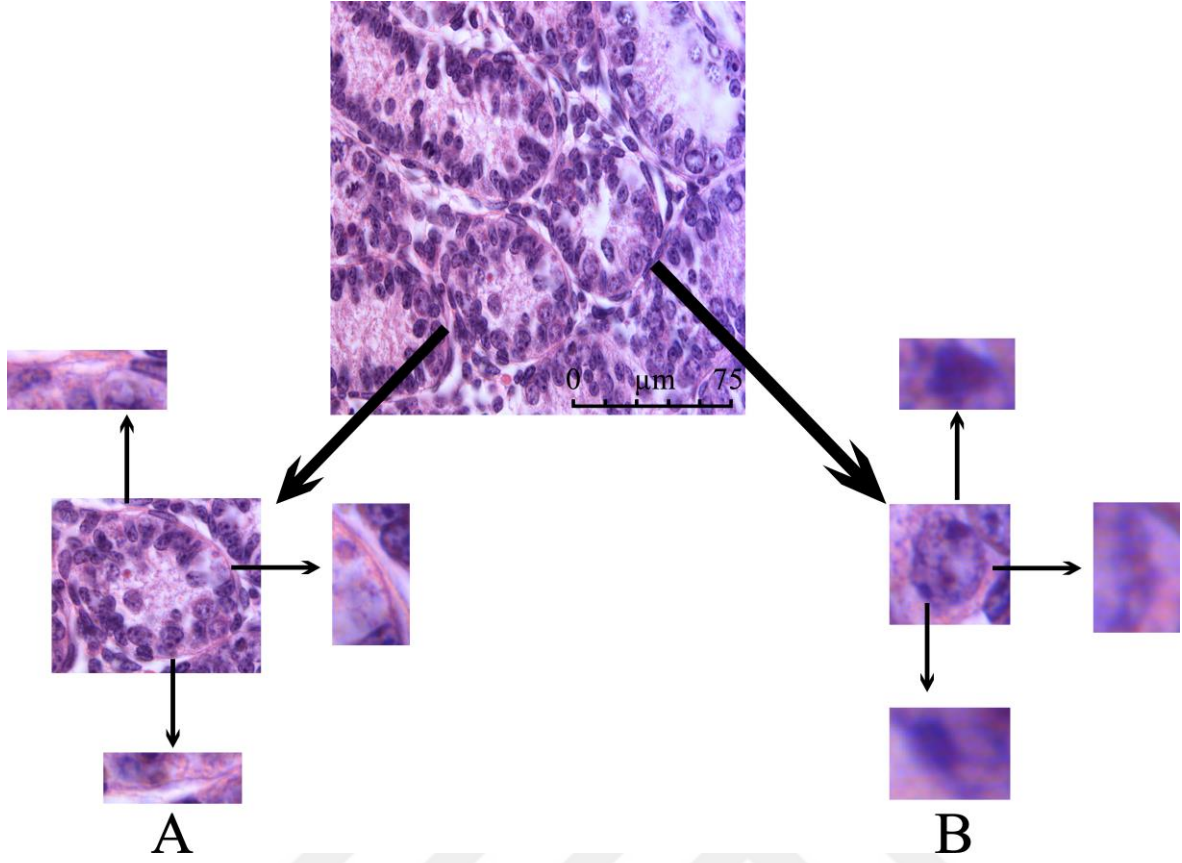
Bölütleme (*Segmentation*), bir görüntüdeki bölgeleri veya nesneleri alt bölümlere ayırıp bölmektir [40]. Bölütleme ile detay seviyesi artırılarak görüntünün daha iyi anlaşılması amaçlanır. Bölütleme farklı şekillerde gerçekleştirilebilir ve çeşitli alt başlıklara ayrılabilir. Bunlar çizgi saptama (*Line Detection*), ayırıt saptama (*Edge Detection*), eşikleme, ve bölge tabanlı bölütleme (*Region-Based Segmentation*) kullanarak bölütlemektir [40]. Tez çalışması kapsamında yenidoğan fare testis seminifer tübülleri bölütlenerek tübül içindeki tübülü döşeyen SKH'ler görünür hale getirilmiştir. Bölütleme işlemi, SKH'lerin koyu mor renkli çekirdeklerini belirgin hale getirmiştir. Bu işlemle hücreler tabandan ayrılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Yenidoğan fare testis mikrogramında K-Means ile yapılan bir bölütleme örneği gösterilmiştir. A’da ham görüntü B’de bölütleme ile tabandan ayrılan seminifer tübül hücrelerine ait mikrogram görülmektedir. (A, B) x630 Hematoksilen Eozin

2.2.2.Öznitelik Çıkarma

Öznitelik çıkarma ham verilerden en değerli bilgileri alma işlemi olup bu kritik işlem ön işleme aşamasından sonra yapılır [39]. Desen tanımlamada ilk olarak girdi deseni alınır ve sonra çıktı sınıflarından birine doğru şekilde atılmaya çalışılır. Bu işlem öznitelik seçimi ve sınıflandırma olarak ikiye ayrılır. Seçilen öznitelikler sınıflandırıcının tanıyabileceği öznitelikler olmalıdır. Öznitelikler sınıfların ayırt edilmesini sağlayacak bilgileri içermelidir. Öznitelik çıkarma ile her bir sınıfın karakteristik öznitelikleri çıkartılır [39]. Böylece sınıflar arası ayırım sağlanabilir. Bu ayırımı sağlamak üzere kullanılabilecek olası özniteliklere dair örnekler Şekil 2.5’te verilmiştir.



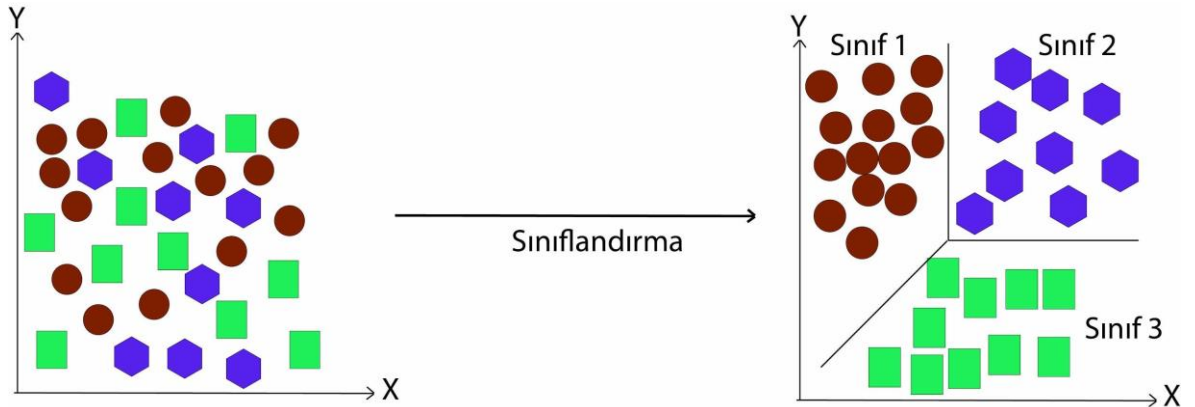
Şekil 2.5. Testis seminifer tübül mikrografında öznitelik olarak kullanılabilecek çıktılarına örnekler verilmiştir. A’da seminifer tübüllerin öznitelik olarak kullanılabilecek kısımları verilmişken B’de SKH’lerin öznitelik olarak kullanılabilecek kısmı gösterilmiştir. x630, Hematoksilen Eozin

Şekil 2.5’te görüldüğü üzere objelerin kenar sınırları gibi farklılıklar içeren yapılar öznitelik olarak kullanılabilir. Makine öğrenmesi yöntemleri bunları objeyi tanımakta kullanır. Öznitelikler tespit edilmesi amaçlanan objenin diğer alanlardan farklı, ayırt edilebilen bölümleri olmalıdır. Bu bölümlere en iyi örneklerden birisi tespit edilmesi amaçlanan objenin kenar kısımlarıdır. Bu kısımlar obje ile obje dışındaki kısmı ayıran sınır bölgeleridir. Bu nedenle objeyi tespit etme ihtimali bu kısımlar sayesinde artar. Şekil 2.5 A’da seminifer tübülün öznitelik olarak kullanılabilecek kenar kısımları gösterilmiştir. Ayrıca öznitelikler objenin bulunduğu zeminden onu ayırtılabilecek renk tonu farkları da olabilir. Bu bağlamda, Şekil 2.5 B’de ise SKH’lerin öznitelik olarak kullanılabilecek kısımları gösterilmiştir. Öznitelik çıkarmada karakterin kesin ve benzersiz bilgilerinin olduğu küme elde edilmelidir. Bu işlem için yaygın olarak şablon eşleştirme (*Template Matching*), deforme edilebilir şablonlar (*Deformable Template*),

üniter görüntü dönüşümleri (*Unitary Image Transformations*), projeksiyon histogramları (*Projection Histograms*), kontur profilleri (*Contour Profiles*), geometrik moment değişmezleri (*Geometric Moment Invariants*), Zernike momentleri (*Zernike Moments*), Fourier tanımlayıcıları, gradyan, gabor özellikleri ve BRISK (*Binary Robust invariant scalable keypoints*) [41] gibi öznelik çıkarma yöntemleri kullanılır [39]. Bir öznelik çıkarma yönteminin öznelik seçimi, yüksek tanıma performansı için en önemli etkidir.

2.2.3. Sınıflandırma

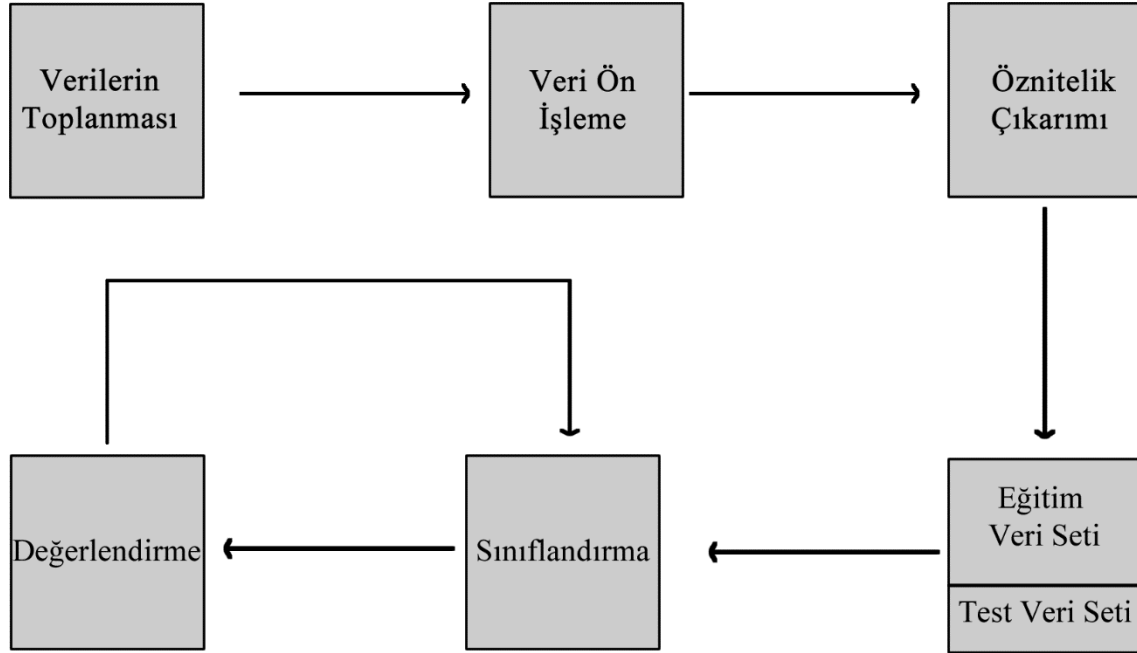
Sınıflandırma, bir görüntünün uygun kategorilerden birine eklenmesi için önceden tanımlanmış veri tabanında karşılaştırılmasını içeren bir süreçtir. Şekil 2.6'da gösterildiği gibi sınıflandırma birçok tipte verinin bulunabildiği veri setinden uygulanan yöntemle göre çeşitli yaklaşımlar kullanarak birbiri ile aynı veya yakın özneliklere sahip verilere bir sınıf etiketi atanması işlemidir. Burada her bir şekil farklı bir veri tipine karşılık gelir. Sınıflandırma yöntemleri ise bu farklı tipte verilerin oluşturduğu veri setlerinde sınıfları uygun şekilde atmayı amaçlar. Sınıflandırma yöntemlerinin her biri farklı yaklaşımlarla sınıflandırma işlemlerini yapar. Bu yöntemlerin başarısı veri setleri ile yöntemin birbirine uygunluğu, en uygun parametrelerin tespit edilmesi ve veri setinin büyüklüğü ile ilişkilidir. Bu süreç Şekil 2.6'da örneklenmiştir.



Şekil 2.6. Örnek bir sınıflandırma süreci gösterilmiştir. Buna göre X ve Y mavi, yeşil, bordo tanecikler birbirinden farklı sınıfları ifade etmektedir.

Sınıflandırma süreci verilerin toplanmasıyla başlar. Ardından, veri ön işleme basamağıyla öznelik çıkarımına hazırlanır. Öznelik çıkarımı sonrası veri seti, eğitim veri seti ve test

veri seti olarak ayrılır. Bu veri setiyle sınıflandırma gerçekleşir. Sınıflandırma sonrası değerlendirme aşamasında süreç değerlendirilerek eğer gerekirse tekrarlanır.



Şekil 2.7. Sınıflandırma süreci, verilerin toplanması, veri ön işleme, öznitelik çıkarımı eğitim ve test veri seti olarak ayrılması, sınıflandırma ve değerlendirme aşamaları gösterilmektedir.

Şekil 2.7’de görüldüğü üzere veriler yapılacak projeye göre sensörler, veri tabanları, mikroskoplar gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir. Ardından, veri seti belirli oranlarda eğitim seti ve test seti olarak ikiye ayrılır. Eğitim için ayrılan veri seti ile sınıflandırma algoritması eğitilir ve test veri seti ile test edilir. Sonra değerlendirme aşamasına geçilir. Değerlendirme sonrası eğer sonuçlar yeterli değil ise sınıflandırma süreci optimize edilerek tekrar gerçekleştirilir. Sınıflandırma sürecinde yapay zekâ yöntemlerinden yararlanılır.

Yapay zekâ, insanlar tarafından yapılan ve zekâ gerektiren işlevleri yapan makineler oluşturma sanatıdır [42]. Bu alanın amacı, şu anda insanların daha iyi yaptığı işleri bilgisayarların nasıl yapacağını incelemektir. Yapay zekâ, makine öğrenmesi ve derin öğrenme gibi teknikleri kapsar. Makine öğrenmesi, bilgisayarların veriler üzerinden öğrenmesinin incelendiği, bilgisayar ve matematik bilimlerinin ortak kesişiminde çok sayıda veri içeren veri setleri için algoritmalarla istatistiksel modeller oluşturma

araştırıldığı bir teknikler bütünüdür [43]. Derin öğrenme ise sinir ağlarına dayanan çoklu işlem katmanlarına sahip hesaplama modelleri kullanarak öğrenme işlemini gerçekleştirir [3]. Klasik makine öğrenmesi teknikleri halihazırda birçok alandan çok çeşitli problemlerin çözümünde kullanılsa da bu tekniklerin doğal verileri temel formlarında işleme yetenekleri sınırlı olduğundan özellikle yüksek boyutlu ve karmaşık verilerin incelenmesinde çok iyi olan derin öğrenmenin kullanımı, görüntü tanıma gibi alanlarda yaygınlaşmaktadır [2].

Lojistik regresyon (LR), destek vektör makineleri (DVM), karar ağaçları (KA), k en yakın komşu yöntemi (KNN), aktif kontur modelleri (AKM) ve evrimsel sinir ağları (ESA) görüntü sınıflandırmada sık kullanılan sınıflandırma yöntemlerindendir. **Lojistik regresyon (LR)** nesne sınıflandırmasında yaygın olarak kullanılan ikili bir modeldir. Hem doğrusal regresyon hem de ikili çıktı oluşturabilen bir sigmoid fonksiyonuna sahiptir [44]. **Karar ağacı (KA)** sınıflandırma ve regresyonda kullanılan ve parametrik olmayan bir başka yöntemdir [45]. Veri özneliklerinden çıkarılan kurallara göre sonuca giden bir tahmin modeli oluşturur. Veri kümesini tek tip alt kümelerle tekrar tekrar bölerek bir değer atar ve hiyerarşik sınıflandırıcı her aşamada sınıf etiketlerinin kabulü ve reddi yönünde karar verir. Ağaçtaki düğümlerin ayrıştırılması, yaprak (uç) düğümlerinin tespiti ve sınıf etiketlerinin terminal nodlara dağıtımı olarak 3 kısımdan oluşur. **Destek vektör makineleri** ise özellikle küçük örneklerde etkin şekilde sınıflandırma yapan parametrik olmayan bir sınıflandırma tekniği olup temelde verileri iki gruba ayırmayı amaçlar [46]. Bu özelliğiyle ikili ayrımlar için ideal olsa da çoklu grup sınıflandırma ve yarı denetimli öğrenme gibi diğer durumlar için de kullanılabilir [47]. Bu yöntemle hem sınıflandırma hem de regresyon problemleri ele alınabilir [47]. **K en yakın komşu** yöntemi biyoinformatik, görüntü işleme ve benzeri alanlarda kullanılan klasik bir yöntem olup örnekleri en yakın komşuya göre sınıflandırır [48]. Parametrik olmayan bir yöntemdir. K değerinin optimal olması durumunda iyi performans verir [49]. Bilinmeyen bir girdi verildiğinde, KNN bilinmeyen bağlantı noktasına en yakın eşik olan k değeri için bir model arar. K en yakın komşu oldukça basit, yüksek verimliliğe sahip ve kolay uygulanabilir olsa da boyutluluk sorunu, hesaplama maliyeti, k değeri belirleme gibi dezavantajları vardır. Yine de KNN yöntemi, görüntü sınıflandırmada çokça kullanılan uygun ve basit bir yöntemdir [50]. Görüntü sınıflandırma iki temel sürece ayrılır. Birincisi benzerlik hesaplamayken ikincisi k en yakın örneği aramadır [50].

Görüntüden obje tespitinde kullanılan **Aktif kontur modelleri (AKM)** görüntünün yoğunluk ve gradyan bilgisine sahip ön tanımlı bir enerji ile karakterize edilir [51]. Aktif kontur modelleri görüntünün sınır bilgilerini kullanan Kenar Tabanlı AKM ve bölge yoğunluğunu kullanarak konturları belirleyen Bölge tabanlı AKM olarak ikiye ayrılır [52].

Evrişimsel sinir ağları görüntü sınıflandırmasında ve görüntülerdeki nesnelerin ve bölgelerin tanımlanması, bölünmesi ve algılanmasında yaygın olarak kullanılmakta olan nöron ağlarıdır [2, 53]. Bu tür ağlarda bir katmandaki nöronlar önceki ve sonraki katmanlardaki nöronlarla bağlıdır [53]. Evrişimsel sinir ağları, çok sayıda dizi biçimindeki verileri işlemek için tasarlanmıştır. Bu ağların en önemli avantajlarından birisi ayrı bir ön işleme ve öznitelik çıkarma aşamasına ihtiyaç duymaksızın ham verileri alıp bu işlemleri kendisinin gerçekleştirmesidir. Genel öğrenme süreci hayvan görsel korteks organizasyonunu taklit eden bu ağın mimarisi evrişimli, havuzlayıcı katmanlar ve tamamen bağlı katmanlardan oluşur. Evrişimli katman, ayırt edici kenarlar, çizgiler ve diğer görsel öğeleri tespit eder [54]. Bu kısım filtreleri barındırır ve bu filtrelerle öznitelik haritaları oluşturulur. Her filtre görsel üzerinde gezinen kareler olarak düşünülebilir ve sonuçta öznitelik haritaları elde edilir. Evrişimli katman uygulamaları sınıflandırma ve bölütleme için çok önemlidir. Ardından öznitelik haritalarının boyutlarının azaltıldığı görüntüler için önemli anlamsal özniteliklerin korunduğu havuzlama katmanı gelir. Tamamen bağlı katmanlar ise gelen tüm öznitelikleri bütünleştirip sonucu verir [54].

Nesne tespit performansı kolayca optimize edilebilen tek bir ağ üzerinde bulunan **YOLO** (*You Only Look Once*) oldukça hızlı bir mimaridir [55]. Hız ve hassasiyet konusunda yine evrişimsel sinir ağı temelli bir teknik olan Daha Hızlı Bölgesel Tabanlı Sinir Ağına (*Faster R-CNN*) göre daha üstündür [56]. Alternatifleriyle karşılaştırıldığında bu mimari yüksek bir lokalizasyon hatasına sahip olsa da yanlış tahmin oranı oldukça azdır [55]. YOLO ile yapılan nesne tespitleri genellikle şehir içi yaşam görüntüleri, kedi, köpek gibi hayvanlar ve günlük hayatta kullanılan diğer eşyalar üzerinedir [57, 58]. YOLO aktif olarak geliştirilen bir mimari olup 2020 yılında dördüncü (YOLOv4) versiyonu yayınlanmıştır. YOLOv4'e diğer versiyonlarından farklı olarak yeni özellikler eklenmiştir ve bu özellikler onu diğer versiyonlarından daha iyi bir tespit seviyesine ulaştırmıştır [59].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deney Tasarımı: Çalışma; gözlemsel, disiplinlerarası, rastgele seçilmiş (randomize), kontrol grubu içeren deneysel araştırma şeklinde planlanmıştır. Bağımlı değişkenler; çalışmanın ölçüm parametreleri (SKH ve seminifer tübül sayısı), bağımsız değişkenler; ölçüm yöntemi (immünohistokimyasal işaretli kesitler üzerinde gözle sayım tekniği ve histolojik boyama üzerinde yapay zekâ temelli görüntü analiz sistemi ile ölçüm tekniği) olmak üzere çalışmaya ait ölçüm parametreleridir. Tüm deneyler daha önce TYL-2018-17531 nolu proje için alınan 04.09.2018 tarihli 52338575-96 sayılı Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu belgesi kapsamında kullanılmasına izin verilen C57BL/6 türü yenidoğan erkek fare testis bloklarından elde edilen kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir (EK 1). Tez sürecinde, görüntülerin elde edilip bir öğrenme algoritması oluşturulması sürecini kapsayan bölümlerde aşağıdaki aşamalar izlenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan program kodlarına GitHub¹ deposundan erişilebilir.

3.1. C57BL/6 türü yeni doğan erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle Spermatogonyal kök hücre nişi bileşenlerinin işaretlenmesi

3.1.1. Histokimyasal yöntemle fare testis örneklerinin işaretlenmesi

C57BL/6 türü yenidoğan farelerden elde edilen testisler, Bouin çözeltisiyle fiks edilip sabit vakumlu doku takip cihazında (Leica, Almanya) dereceli alkollerden geçirilip parafin istasyonunda (Leica, Almanya) parafine gömülmüştür. Ardından kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) 3 µm'lik seri kesitler alınmıştır. Kesitler etüvde 60 °C'de bir gece süreyle deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerle rehidrate edilip hematoksilen-eozin yöntemiyle boyanmıştır.

3.1.2. İmmünohistokimyasal işaretleme ile spermatogonyal kök hücrelerin immün işaretlenmesi

C57BL/6 türü yenidoğan farelerden elde edilen testisler, Bouin çözeltisiyle fiks edilip sabit vakumlu doku takip cihazında dereceli alkollerden geçirilip parafin istasyonunda parafine gömülmüştür. Ardından kızaklı mikrotomda 3 µm'lik seri kesitler alınmıştır.

¹ <https://github.com/burakkahveci/tubulandspermatogonialstemcelldetect.git>

Kesitler etüvde 60 °C’de bir gece süreyle deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerle rehidrate edilip ısı ile antijen geri çağırma yöntemi uygulanmıştır. Bu doğrultuda, kesitler içinde sitrat tamponu çözeltisi (pH=6.5) (Abcam, ABD) bulunan düdüklü tencerede kaynatılıp 5-10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından, kesitler yıkandıktan sonra sekonder antikorun hazırlandığı keçi serumuyla (Abcam, ABD) 10 dakika boyunca protein blokajı yapılmıştır. Bu işlem oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından kesitler oda sıcaklığında ve nemli odacıkta sıçan anti fare SALL4 (Abcam, ABD) primer antikoruna ile 15-30 dk inkübe edilmiştir. Yıkamanın ardından, 15 dk süreyle keçi anti sıçan IgG-HRP sekonder antikoruna (Abcam, ABD) ile oda sıcaklığında inkübe edilen kesitlerle DAB kromojeni uygulama aşamasına geçilmiştir. DAB kromojeninin damlatılması ardından inkübasyon sürecinde, ışık mikroskobu altında negatif ve pozitif kontrol kesitlerinin işaretlenme takibi yapılmıştır. Bu süreç 5-7 dk boyunca oda sıcaklığında gerçekleşmiştir. Negatif kontrol olarak primer antikorun damlatılmadığı dokular kullanılırken pozitif kontrol için ise primer antikor damlatılan dokular kullanılmıştır. DAB ile inkübasyon ve yıkama adımlarından sonra kesitler 30 saniye boyunca hematoksilende bekletilmiştir. Sonrasında, kesitler yıkanıp dereceli alkoller ile dehidrate edilip entellan ile kapatılmıştır.

3.2. Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobunda testis mikrograflarının elde edilmesi

Hematoksilen eozin boyası ile boyanan kesitlerden dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu (Leica DM 6000 DM, Almanya) ile kesitin tamamını kapsayacak, 3264x2448 ve 1920x1940 çözünürlük değerlerine sahip seminifer tübül görüntüleri elde edilmiş ve görüntü analiz sistemi (LASv3 Leica, Almanya) kullanılarak 35 adet kesit mikrografi sayısallaştırılmıştır.

3.3. Testis mikrograflarında yer alan seminifer tübüllerdeki spermatogonyal kök hücrelerin manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanıp etiketlenmiş veri setinin oluşturulması

SALL4 antikoruna ile SKH’lerin immün işaretlendiği kesitler, ışık mikroskobu (Leica DM 6000 BM, Almanya) ile incelenip LASv3 yazılımı kullanılarak 18 adet kesitte kahverengi işaretlenmiş SKH’lerin sayımı manuel olarak yapılarak, 1920x1940 çözünürlük değerine sahip seminifer tübül görüntülerinde sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen bu mikrograflarda her seminifer tübüldeki SKH’ler hematoksilin eozin boyanmış seri

kesitinde etiketlenmek üzere tespit edilmiştir. Kesitlerde tek sayılı olanlar hematoksinle eozin ile boyanırken çift sayılı olanlar ise SALL4 antikoru ile işaretlenip tek sayılı kesitlerdeki etiketlenecek SKH'lerin belirlenmesini sağlamıştır.

3.4. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine öğrenmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritmasının geliştirilmesi. Geliştirilen algoritmanın etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların değerlendirilmesi

3.4.1. Testiste bulunan seminifer tübülleri ayırt eden bir sistemin geliştirilmesi

Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerdeki uygun seminifer tübüllerin tespiti x63 orijinal büyütmedeki 3264x2448 ve 1920x1940 boyutundaki mikrograflarda yapılmıştır. Bu doğrultuda 5 ayrı kesitten elde edilen 66 mikrografa görüntü işleme tekniği uygulanmıştır. Testiste bulunan seminifer tübüllerin tespiti için Python programlama dilinin *OpenCV*, *Matplotlib*, *Pandas*, *Numpy* ve *Scikit-image* kütüphaneleri kullanılarak aktif kontur modeli temelli bir sistem geliştirilmiştir. Bu doğrultuda, öncelikle kesitler üzerinde seminifer tübüllerin yer aldığı ilgi alanları belirlenmiştir. İlgi alanlarını görüntü üzerinde sınırlamak için girilen koordinatlar doğrultusunda seminifer tübül şekline göre daire veya elips oluşturacak bir fonksiyon kullanılmıştır. Ardından *Scikit-image* kütüphanesinin bir fonksiyonu olan aktif kontur fonksiyonu ile seminifer tübül tespiti gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Bazal membrandaki hücrelerin ayırt edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin Sertoli hücrelerinden ayrımı

Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu ile x63 orijinal büyütmede elde edilen 3264x2448 ve 1920x1940 piksel boyutundaki görüntülerdeki uygun seminifer tübüllerin bazal membranında bulunan SKH'lerin tespiti için SKH'ler ve Sertoli hücrelerinin arasındaki morfolojik farklardan yararlanılması amaçlanmıştır. Burada bahsedilen morfolojik farklar uygulanacak yöntemlerin hücreleri tespit etmesi için gerekli olan özniteliklerdir. Bu öznitelikler hücrenin şekli ve yoğunluğu gibi bir hücrenin diğerinden ayırt edilmesini sağlayan bilgileri barındırmaktadır. Bu özniteliklerin görüntülerden elde edilmesi işlemi görüntülerin en değerli ve ayırt edici bilgilerinin çıkartılması olup, bu kısma öznitelik çıkartma denmektedir. Bu doğrultuda, Python programlama dilinin *OpenCV*, *Matplotlib*, *Numpy* ve *Scikit-image* kütüphaneleri kullanılarak bir algoritma geliştirilmiştir. Öznitelik çıkartma çalışmalarına RGB renk modeliyle (*Red Green Blue*

Color Model) başlanmış, tatmin edici sonuçlar alınamadığı için XYZ renk modeline (*CIE 1931 color spaces*) geçilmiştir. Görüntülerin transformasyonu *OpenCV* kullanılarak yapılmıştır. Ardından medyan ve gaussian filtreler uygulanıp Kontrast Sınırlı Adaptif Histogram Eşitleme (*CLAHE*) tekniği uygulanmıştır. Sonrasında sırasıyla ikili eşikleme Otsu eşiklemesi ve morfolojik operasyonlar uygulanmıştır. Elde edilen çıktılardan ilgi alanı bölgesi kırılarak ikinci bir morfolojik operasyon uygulaması yapılmıştır.

3.4.3. Görüntü işleme sürecinden geçmiş görüntüler kullanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilmesi

Görüntü işleme sürecinden geçen 66 mikrograftan seminifer tübül ve seminifer tübül olmayan 512 ilgi alanı elde edilmiştir. Bu mikrograflar 106 megabayt yer kaplamaktadır. Bu mikrograflara uygulanan veri artırma (*Data Augmentation*) işlemleri sonucu veri sayısı 4908 adete yükselmiştir. Bunların boyutu ise 74 megabayttır. Bunlar %80 oranında eğitim veri seti, %20 oranında test veri seti olarak ayrılmıştır. Bu veri seti kullanılarak DVM, KA, RO, NB, KNN ve LR metotları ile sınıflandırma algoritmaları geliştirilmiştir. İlk olarak resmin belirleyici özniteliklerin toplanması tanımlayıcı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Tanımlayıcı olarak *Binary Robust Invariant Scalable Keypoints* (BRISK) öznitelik dedektörü kullanılmıştır. Toplanan kilit noktaları K-means algoritmasıyla gruplanıp sıklıklarının tespiti için histogram ile şematize edilmiştir. Histogramdaki öznitelikler matematiksel olarak vektörlerle ifade edilip makine öğrenmesi metotlarının kullanabileceği hâle dönüştürülmüştür. Elde edilen çıktılar kullanılarak makine öğrenmesi metotları eğitilip test edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğruluk, f-1, kesinlik ve hassasiyet skorları ile değerlendirilmiştir. Bu skorlar doğru pozitif (DP), doğru negatif (DN), yanlış pozitif (YP) ve yanlış negatif (YN) değerlerinin çeşitli şekilde hesaplanmalarıyla elde edilir. Skorların formülleri Şekil 3.1’de verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Doğruluk} &= \frac{DN + DP}{DN + YP + DP + YN} & \text{Kesinlik} &= \frac{DP}{DP + YP} \\ \text{Hassasiyet} &= \frac{DP}{DP + YN} & \text{F-1 Skoru} &= 2 \times \frac{\text{Kesinlik} \times \text{Hassasiyet}}{\text{Kesinlik} + \text{Hassasiyet}} \end{aligned}$$

Şekil 3.1. Ölçüm metriklerinin formülleri verilmiştir.

3.5. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması. Kurulan bu modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu ile elde edilen 3264x2448 ve 1920x1940 piksel boyutundaki görüntülerden x63 orijinal büyütmeyle elde edilen mikrograflar kullanılarak derin öğrenme temelli seminifer tübül ve SKH tespiti YOLO (*You Only Look Once*) modelinin dördüncü versiyonuyla (YOLOv4) yapılmıştır. Python programlama dili kullanılarak YOLOv4 mimarisi oluşturulmuştur ve *Google Colaboratory* vasıtasıyla bulut üzerinde eğitilmiştir.

Seminifer tübül tespiti için 35 kesitten 586 mikrograf elde edilmiştir. Bunlar 5,9 gigabayt boyuta sahiptir. Bu mikrograflar ilk olarak LabelImg programı [60] ile etiketlenmiştir ve ardından 600x600 çözünürlüğe yeniden boyutlandırma ve veri artırma işlemi uygulanmıştır. Yeniden boyutlandırma ve veri artırma işlemi Roboflow uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir [61]. Bu işlemin sonunda toplam olarak 12734 adet görüntüden oluşan bir veri seti elde edilmiştir. Bu veri seti %80'e %20 oranı kullanılarak ikiye bölünmüş, sırasıyla 10187 ve 2547 adet görüntüden oluşan eğitim ve test veri setleri oluşturulmuştur. Mikrografların tamamının büyüklüğü 858 megabayttır.

Spermatogonyal kök hücre tespiti için ise 18 kesitten 342 mikrograf elde edilmiştir. Bu mikrograflar toplam büyüklüğü 3,8 gigabayttır. Daha sonra bu mikrograflar LabelImg programı ile etiketlenmiştir, 600x600 çözünürlüğe yeniden boyutlandırma ve veri artırımı uygulanmıştır. Tübül tespiti için kullanılan 35 kesitin tamamının kullanılamamasının sebebi SKH tespiti için yapılan immünohistokimya boyaması sonucu bazı kesitlerin arzu edilen şekilde boyanmamasıdır. Veri artırımı sonrasında elde edilen SKH veri seti yine %80'e %20 oranı kullanılarak ikiye bölünmüştür, sırasıyla 7911 ve 1978 görüntüden oluşan eğitim ve test veri setleri elde edilmiştir. SKH veri setinin tamamının büyüklüğü 709 megabayttır.

4. SONUÇLAR

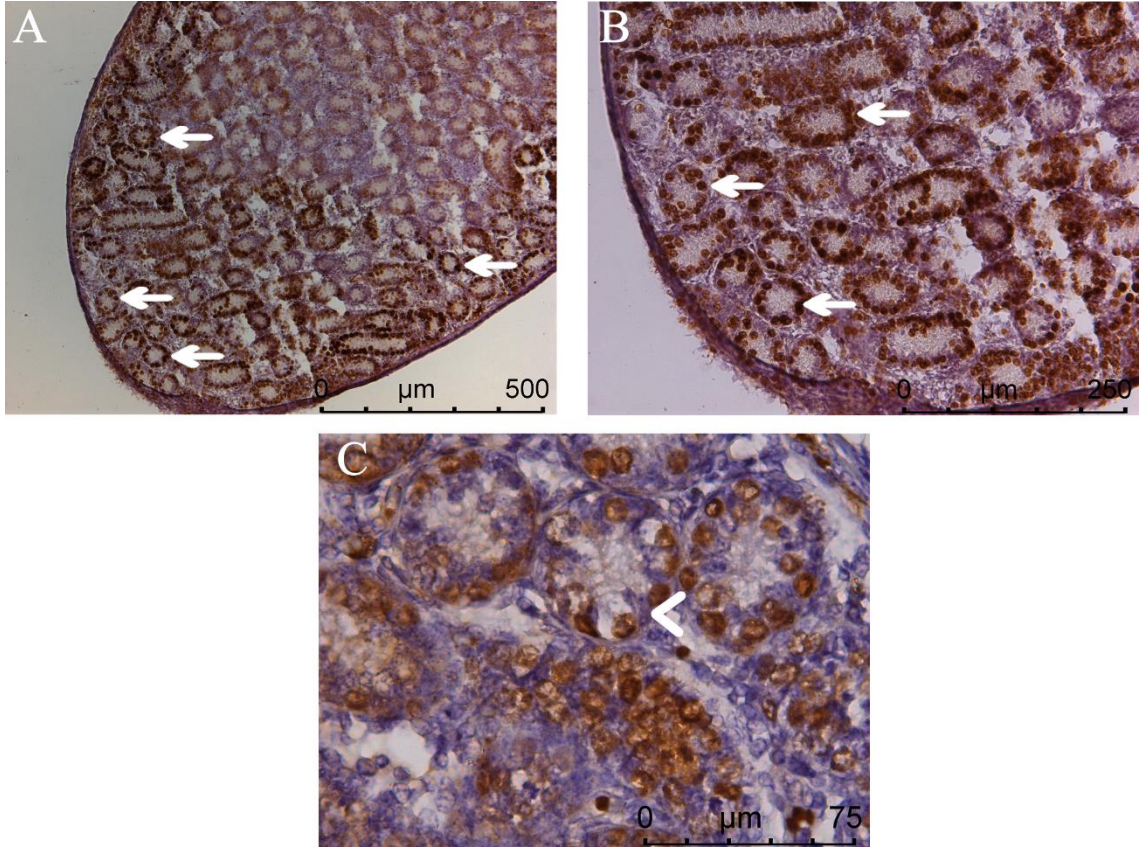
4.1. C57BL/6 türü yeni doğan erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle Spermatogonyal kök hücre nişi bileşenlerinin işaretlenmesi ve dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobunda testis mikrograflarının elde edilmesi

C57BL/6 türü altı günlük farelerden elde edilen testis kesitleri hematoxilen eozinle boyandıktan sonra histolojik yapı açısından incelenmiştir. Mikrograflarda henüz kanalize olmamış seminifer tübüllerin büyük piramit biçimli Sertoli hücreleri ve bazal membrana yerleşik yuvarlak biçimli ökromatik çekirdekli SKH'lerden oluştuğu saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. C57BL/6 türü altı günlük fare testisine ait tüm kesitin, x630 büyütmesine mikrograflar birleştirilerek elde edildiği mikroskop görüntüsünde seminifer tübüller ve bunları döşeyen hücreler izlenmektedir. x630, Hematoxilen Eozin

C57BL/6 türü altı günlük farelerden elde edilen testis kesitlerinde indirekt immünperoksidaz yöntemiyle SALL4 antikoru ile işaretlenen SKH'ler bazal membrana yerleşik olarak Sertoli hücrelerinin komşuluğunda görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Altı günlük C57BL/6 türü fare testis kesitinin indirekt immünperoksidaz yöntemiyle SALL4 antikoru için immün işaretlendiği mikrograflardır. İmmün işaretleme yapılan seminifer tübüllerden bazıları beyaz oklarla Sertoli hücresi ise beyaz ok ucu ile işaretlenmiştir. (A) x100, (B) x200, (C) x630. Kromojen DAB, çekirdek hematoxilen

4.2. Testis mikrograflarında yer alan seminifer tübüllerdeki spermatogonyal kök hücrelerin manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanıp etiketlenmiş veri setinin oluşturulması

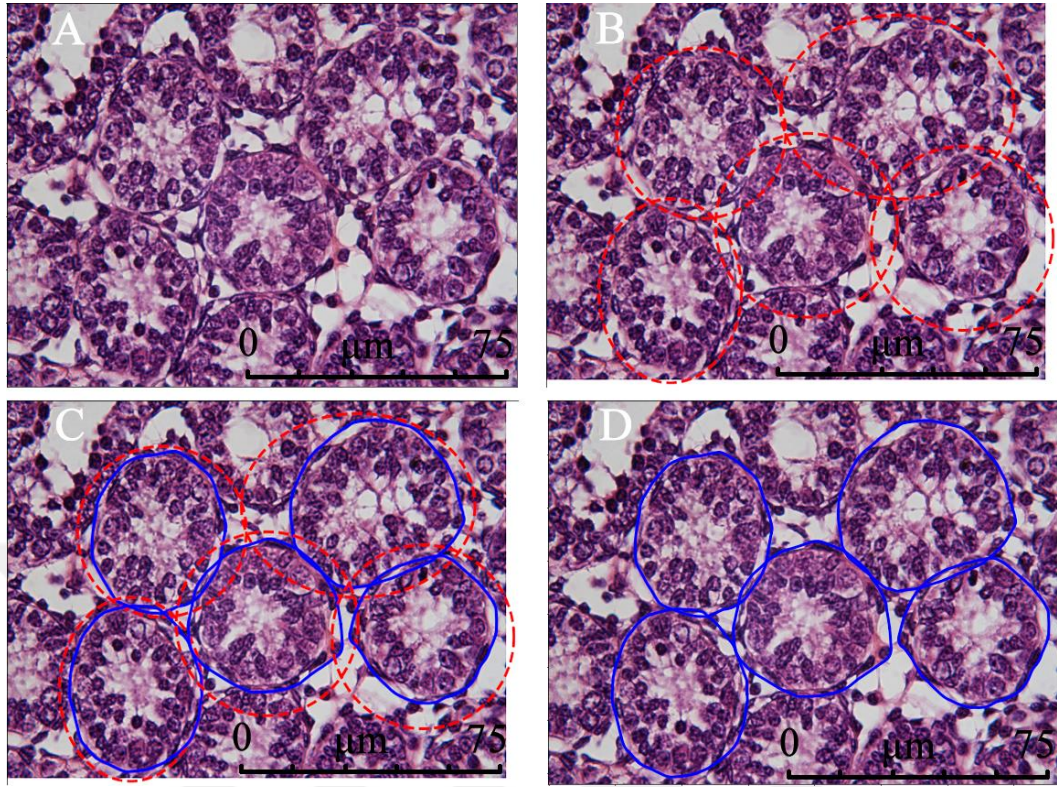
SALL4 antikoru ile SKH'lerin immün işaretlendiği kesitlerden, invertte ışık mikroskobu ile 1920x1440 piksel çözünürlükte mikrograflar elde edilmiştir. LabelImg ile yapılan etiketleme işlemi sonucundan SALL4 ile işaretlenmiş mikrograflarda doğrulanmış SKH hematoxilen eozin boyanmış seri kesitlerde 342 mikrograf etiketlenmiştir. Ardından, veri artırımı ve yeniden boyutlandırma işlemi gerçekleştirilerek veri seti elde edilmiştir.

Elde edilen etiketli mikrograflar ile SKH'lerin tespit edilip derin öğrenme algoritmasının eğitiminde kullanılacak eğitim veri seti ve testi için kullanılacak test veri seti oluşturulmuştur.

4.3. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine öğrenmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritmasının geliştirilmesi. Geliştirilen algoritmanın etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların değerlendirilmesi

4.3.1. Testiste bulunan seminifer tübülleri ayırt eden bir sistemin geliştirilmesi

Kurulan aktif kontur temelli sistem ile tüm testis kesit mikrograflarındaki seminifer tübüller elle seçilerek işaretlenmiştir. Elde edilen çıktılar içinden bir örnek Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.3 A'da x630 büyütme hematoxilen eozin boyalı kesitten elde edilen mikrograf görülmektedir. Şekil 4.3 B'de seminifer tübül çevresinde oluşturulan kullanıcı tanımlı sınır kırmızı kesikli çizgiyle görülmektedir. Şekil 4.3 C'de ise kullanıcı tanımlı sınır içerisine sistem tarafından *Scikit-image* kütüphanesinin bir fonksiyonu olan aktif kontur fonksiyonunun ilgili parametreleri optimize edilerek çizilen mavi düz çizgi ile seminifer tübüllerin tespiti gerçekleştirilmiş mikrograf görülmektedir. Şekil 4.3 D'de kullanıcı tanımlı sınırın kaldırılmasıyla seminifer tübül tespiti son halini almıştır.

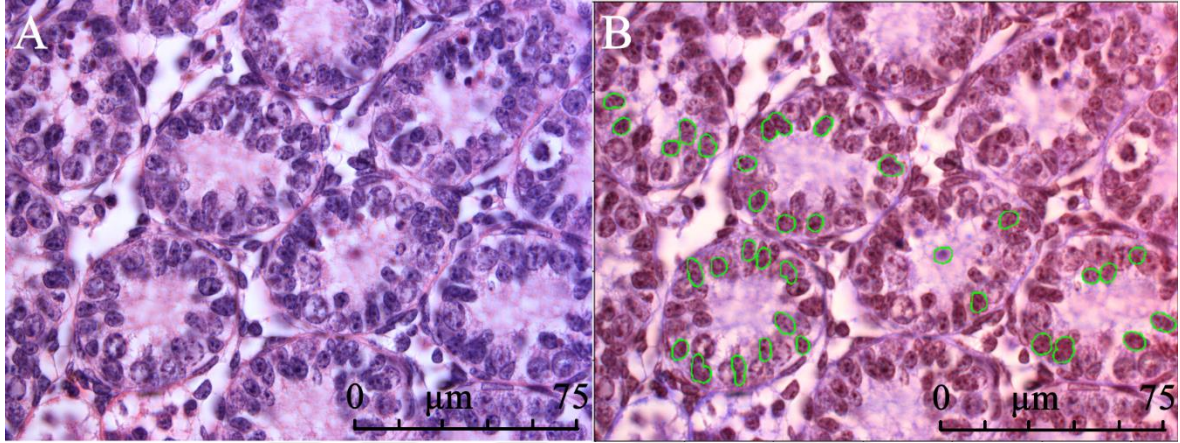


Şekil 4.3. C57BL/6 türü altı günlük fare testis kesitinden elde edilen mikrograflara geliştirilen aktif kontur temelli sistemin uygulanması sonucu elde edilen çıktılar görülmektedir. (A) Hematoksilen eozin boyalı kesitten elde edilmiş mikrograftır. (B)'de sistemin seminifer tübülü tanımlaması için kırmızı kesikli çizgi ile çizilen sınırlar gösterilmiştir. (C)'de sınırların içinde sistem tarafından seminifer tübül mavi çizgi belirlenmiştir. (D)'de kesikli çizgiyle çizilen sınırlar kaldırılıp seminifer tübül tespitinin tamamlandığı mikrograftır. (A-D) x630, Hematoksilen Eozin

4.3.2. Bazal membrandaki hücrelerin ayırt edilmesi ve spermatogonyal kök hücrelerin Sertoli hücrelerinden ayrımı

Spermatogonyal kök hücrelerin tespitini yapacak bir öğrenme algoritması oluşturmak amacıyla dijital kamera atışmanlı ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerdeki ortalama 56 μm genişlik ve 58 μm yüksekliğe sahip seminifer tübüller kullanılmıştır. Bu ölçüler fare testisi kesitlerinden elde edilen mikrograflarda bulunan dairesel şekle sahip seminifer tübüllerin ortalama ölçüleridir. Kesit alırken parçalanmış ve yapısı bozulan veya boyama sırasında iyi boyanmayan seminifer tübüller kullanılmamıştır. Uygun seminifer tübüllerle

yapılan tespit işlemi sonrası sonuçlar IHK'lı görüntülerle karşılaştırıldığında tespit doğruluğunun düşük olduğu gözlenip bir öğrenme algoritması elde edilecek çıktılar alınamamıştır. Şekil 4.4'te görüntü işleme teknikleri uygulanan fotoğrafta her ne kadar tespit edilebilen hücreler olsa da tespit işleminin kök hücre spesifik yapılamamasına ve fotoğrafın geneline yayılamamasından dolayı görüntü işleme bölümündeki hücre tespiti kısmına devam edilmemiştir.



Şekil 4.4. C57BL/6 türü altı günlük fare testis kesitinin hematoksilin eozin boyalı kesitinden elde edilen mikrograflara geliştirilen hücre tespit ve sayım sisteminin uygulanması sonucu elde edilen çıktılar şematize edilmiştir. Yeşil çizgiler tespit edilen hücreleri göstermektedir. (B) kısmında tespitin yeterli olmadığı görülmektedir. (A) x630, (B) x630. Hematoksilin eozin

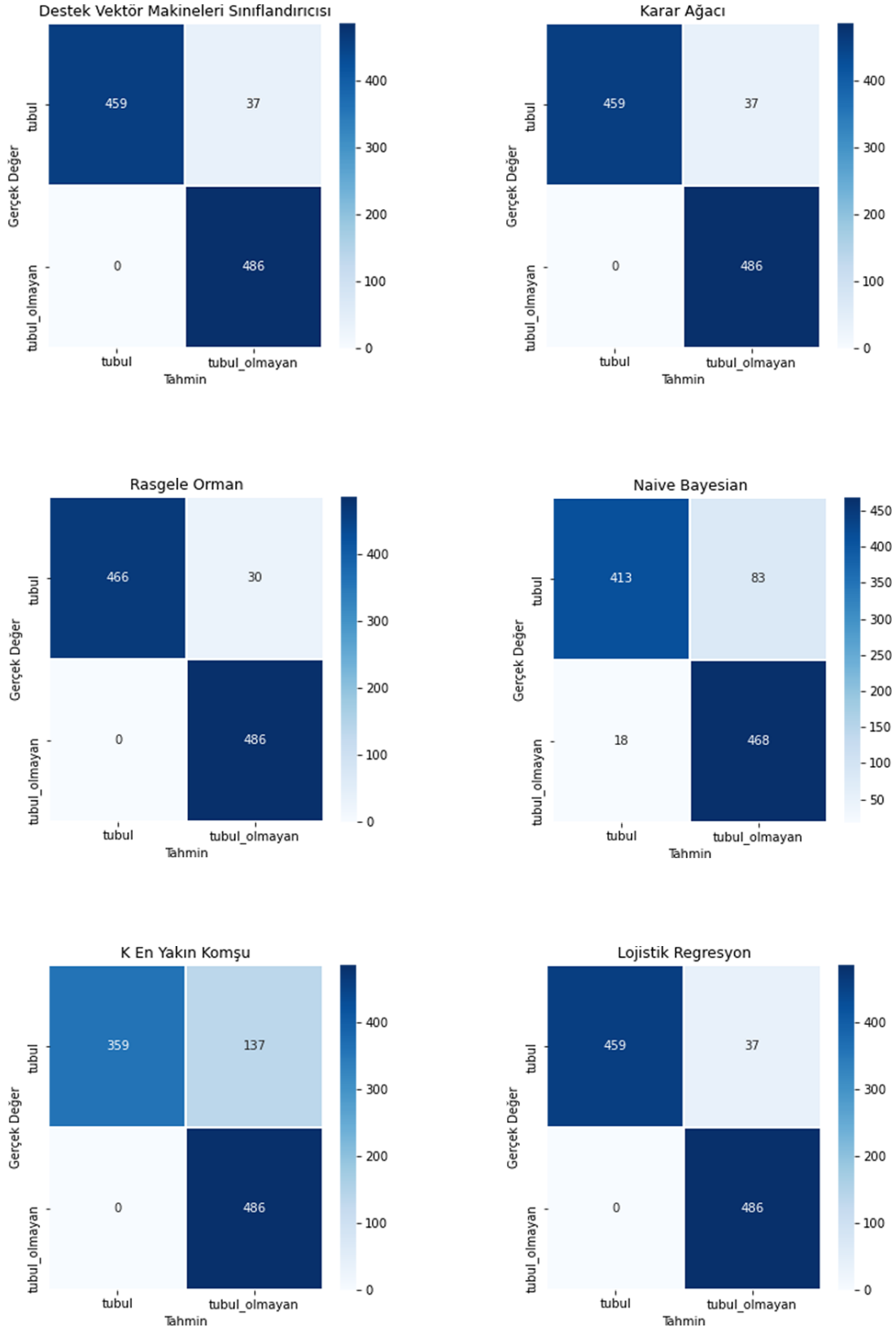
Şekil 4.4 A'da x63 büyütme hematoksilin eozin boyalı kesitten elde edilen mikrograf görülmektedir. Şekil 4.4 B'de ise hücrelerin tespitinin ve sayımının yapıldığı mikrograf verilmiştir. Burada ilerlemenin sağlanamamasının nedeni son derece karmaşık olan dokuda hücreleri tespit etmek için yeterli çözünürlükte mikrograf elde edilememesidir. Spermatogonyal kök hücreleri ayırt etmeye yarayacak öznitelikler çıkartılamamıştır

4.3.3. Görüntü işleme sürecinden geçmiş görüntüler kullanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilmesi

Görüntü işleme sonrası elde edilen seminifer tübüllerin tespit edilmiş olduğu mikrograflardan veri artırımı uygulanması sonucu oluşan veri seti, eğitim ve test veri seti olarak ikiye ayrılmıştır. Ardından DVM, KA, RO, NB, KNN ve LR'yi kapsayan makine öğrenmesi teknikleri uygulanmıştır. Şekil 4.5'te adı geçen makine öğrenmesi

yöntemleriyle yapılan deneylerin sonucu oluşan hata matrisleri gösterilmiştir. Buna göre en başarılı sonuç RO yönteminde elde edilmiştir. Rastgele Orman ile 496 adet seminifer tübül verisinin 466'sı doğru olarak sınıflandırılmıştır. Rastgele Orman yöntemine en yakın başarı birbirine benzer oranlarla, 496 seminifer tübülünden 459'unu saptayan DVM, KA ve LR ile sağlanmıştır. Naive Bayes yöntemi dışındaki tüm yöntemler seminifer tübül olmayan verinin tamamını doğru sınıflandırarak, 496 adet toplam seminifer tübül verisinin 459'unu saptamıştır. Naive Bayes yöntemi dışındaki yöntemler RO'da olduğu gibi seminifer tübül olmayan veriyi doğru şekilde sınıflandırmıştır. Seminifer tübülleri en düşük başarıyla sınıflandıran iki yöntem NB ve KNN olarak belirlenmiştir. K en yakın komşu yöntemi seminifer tübül olmayan veriyi tamamen doğru sınıflandırarak yüksek sınıflandırma oranına sahip RO, DVM, KA ve LR ile ortak bir başarı sağlamasına rağmen, seminifer tübül verisinin sadece 359 tanesini doğru sınıflandırarak bu anlamda en kötü performansı göstermiştir. NB diğer yöntemlerin tamamen doğru sınıflandırdığı tübül olmayan 18 veriyi seminifer tübül olarak sınıflandırmıştır. Naive Bayes yöntemi, en düşük ikinci performansa sahip KNN ile karşılaştırıldığında seminifer tübül verisinin sadece 83 tanesini hatasız sınıflandırmıştır. Hatalı sınıflandırmada ise göze çarpan nokta seminifer tübül verilerinin her yöntemde belirli oranlarda seminifer tübül olmayan olarak sınıflandırılmış olmasıdır. Şekil 4.5'te adı geçen makine öğrenmesi yöntemlerinin eğitilip test edilmesi sonucu oluşan hata matrisleri gösterilmiştir.

Makine Öğrenmesi Yöntemi Hata Matrisleri



Şekil 4.5. Çeşitli makine öğrenmesi yöntemleriyle yapılan deneyler sonucu oluşan hata matrisleri verilmiştir

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi en başarılı sonuç RO yönteminde elde edilmiştir

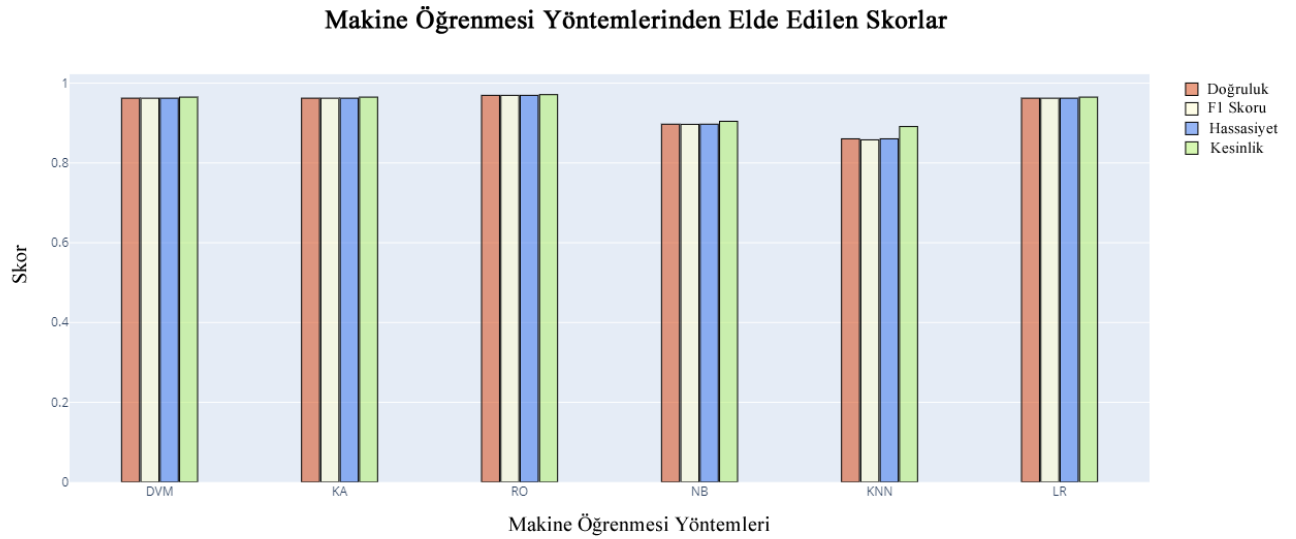
Tablo 4.1'de, uygulanan makine öğrenmesi yöntemlerinin doğruluk, f1 skoru, hassasiyet ve kesinlik skorları görülmektedir. Makine öğrenmesi yöntemlerinin doğruluk, f1, hassasiyet ve kesinlik skorları KNN ve NB yöntemleri hariç 0,95'in üzerindedir. KNN ve NB yöntemlerindeki başarımları RO, DVM, KA ve LR yöntemlerinin gerisinde kalmıştır. En yüksek doğruluk, f1, hassasiyet ve kesinlik skorları RO yöntemiyle elde edilmiştir. Dolayısıyla RO'nun, kullanılan yöntemler arasında tübül sınıflandırması için en uygun yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.1. Makine öğrenmesi yöntemlerinin performanslarını yansıtan doğruluk, f1 skoru, hassasiyet ve kesinlik skorları verilmiştir.

Makine Öğrenmesi Yöntemi	Skorlar			
	Doğruluk	F1 Skoru	Kesinlik	Hassasiyet
DVM	0,962	0,962	0,965	0,962
KA	0,962	0,962	0,965	0,962
RO	0,969	0,969	0,971	0,969
NB	0,897	0,897	0,904	0,897
KNN	0,860	0,858	0,891	0,860
LR	0,962	0,962	0,965	0,962

Seminifer tübül tespitinde denenen tüm makine öğrenmesi yöntemleri doğruluk, kesinlik, f1 skoru ve hassasiyet oranı başarımları açısından karşılaştırıldığında RO'nun seminifer

tübüllerin sınıflandırılması için diğer yöntemlere göre daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Bu veriler çubuk grafik olarak Şekil 4.6’da verilmiştir.



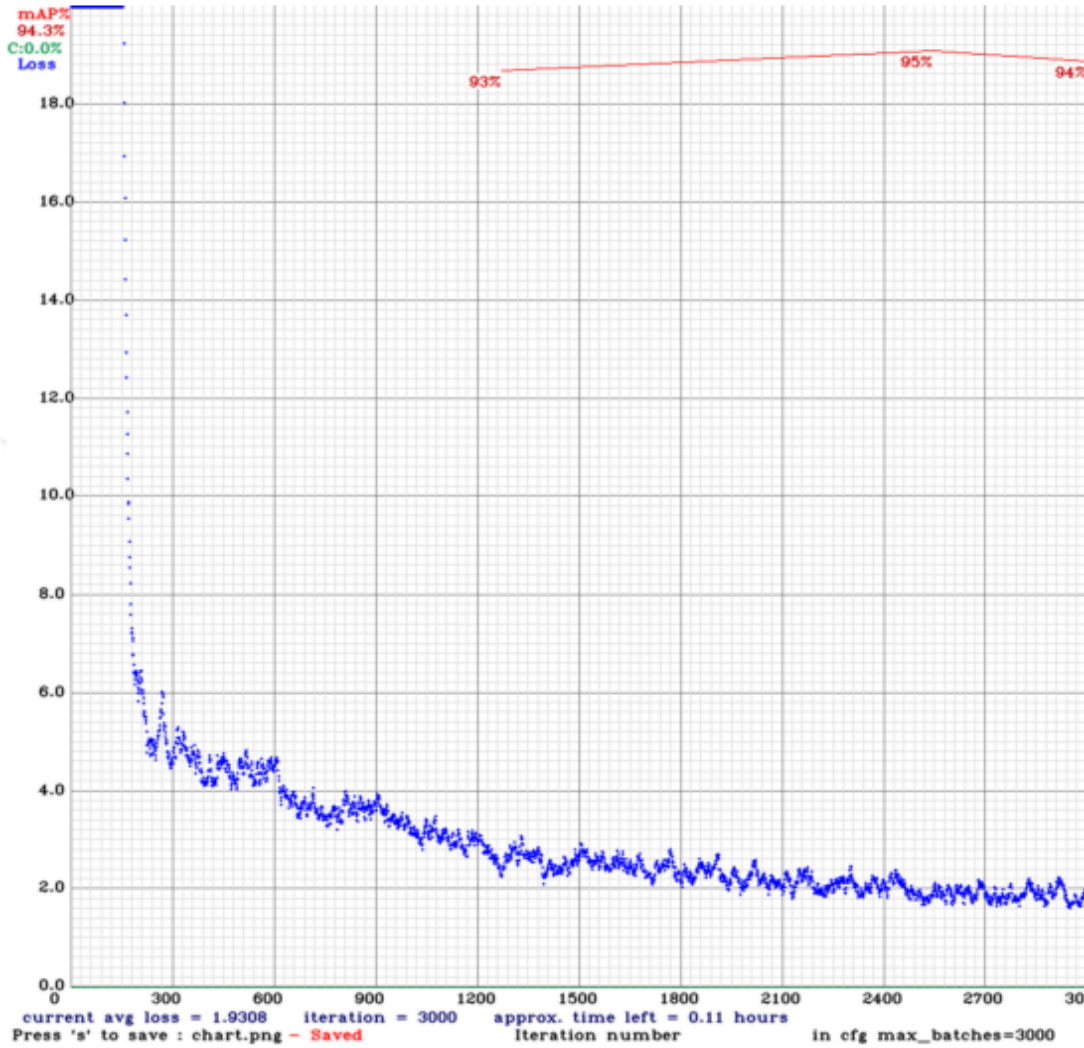
Şekil 4.6. Makine Öğrenmesi yöntemlerinin performanslarını yansıtan doğruluk, f1 skoru, hassasiyet ve kesinlik skorları karşılaştırılmıştır.

4.4. Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması. Kurulan bu modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi, bulunan sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

4.4.1. Seminifer tübüllerin YOLOv4 yöntemi ile saptanması

Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu ile elde edilen mikrografların etiketlenmesiyle seminifer tübül tespiti için eğitilen YOLOv4 algoritması etiketli seminifer tübül verileriyle test edildiğinde, 1200’lü döngülerde mAP (*Mean Average Precision*) %93 ile başlamıştır. Burada mAP değerinin %93 ile başlaması, algoritmanın seminifer tübüllerin tespitinde zorlanmadığını göstermektedir. 1200’lü döngülerden sonra kayıp değerinin düşüş, mAP değerinin artış eğilimi zayıflamıştır. 2500’lü döngülerden sonra değerler sabitlenmiş ve 3000 döngüde eğitim bitirilmiştir. Kayıp değerindeki düşüşün bir süre sonra durması beklenen bir durumdur. En son noktada kayıp değeri 1,93 olarak grafikte görülmektedir. Şekil 4.7’de döngü sayısının 2500’lü değerlere ulaştığında mAP değerinin %95’e ulaştığını görülmektedir. Bu mAP değeri seminifer tübülde YOLOv4’ün ulaştığı en yüksek değerdir. Bu durum eğitimin optimum döngü sayısının 2500 ile 2600 arası

olduğunu göstermektedir. Elde edilen skorlar Tablo 4.2’de, döngü sayısına göre mAP ve kayıp değeri kıyaslaması şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Döngü sayılarına göre mAP ve kayıp değerlerinin kıyaslanması verilmiştir.

Yatay eksen döngü sayısını, dikey eksen ise kayıp değerini göstermektedir. Mavi çizgiler kayıp değeri, kırmızı çizgiler mAP değerini ifade etmektedir. 3000 döngü sayısına sahip süreçte ortalama kayıp değeri 1,93 ile sonuçlanırken, mAP’ın ise %94 değerine ulaştığı görülmektedir.

YOLOv4 yöntemiyle yapılan seminer tübül tespitinde elde edilen mAP, hassasiyet, kesinlik ve f1 skorları sırasıyla %94, %92, %81 ve %86 olarak saptanmıştır. Bu değerler

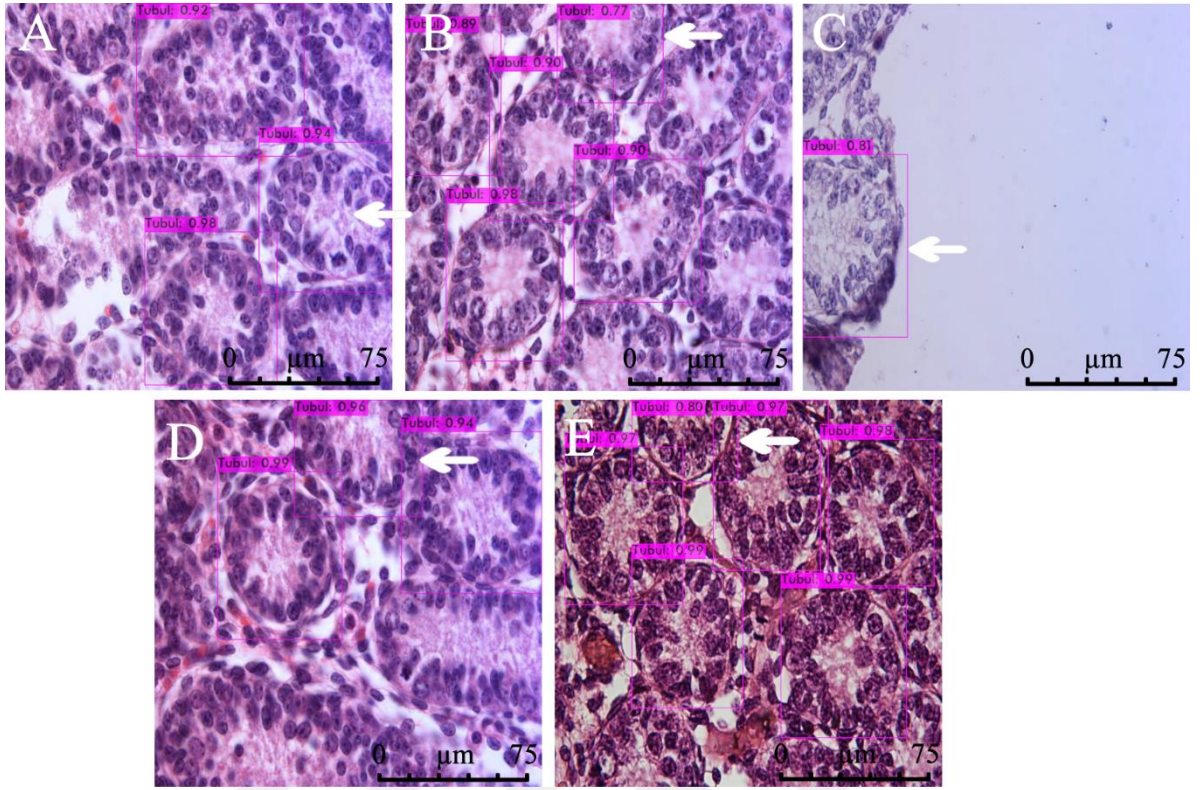
YOLOv4 yönteminin seminifer tübül tespitinde yeterli olduğunu göstermektedir. Tablo 4.2’de mAP, kesinlik, hassasiyet ve f1 skoru değerleri görülmektedir.

Tablo 4.2. Etiketlenmiş seminifer tübül mikrografları ile eğitilen YOLOv4 algoritmasının test skorları verilmiştir.

YOLOv4 ile Tübül Tespit Test Skorları			
mAP	Hassasiyet	Kesinlik	F1 skoru
0.94	0.92	0.81	0.86

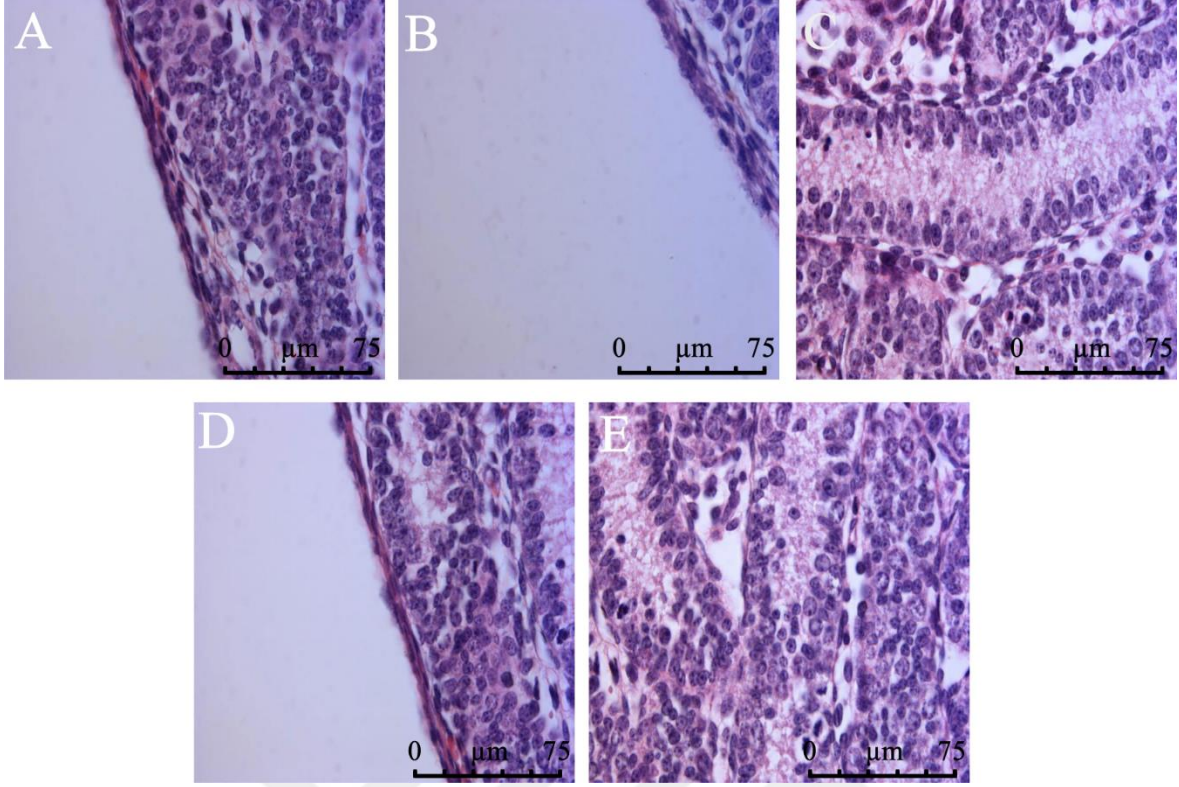
Etiketli seminifer tübül veri seti ile eğitilen YOLOv4 algoritması kullanılarak 600x600’lük fotoğraflarda seminifer tübül tespiti yapılmıştır. Tespitlerin optimum olarak çizdirilmesi için %75’lik bir eşik değeri belirlenmiştir. Bu eşik değeri, spesifik olmayan sonuçların elimine edilmesi için kullanılmıştır. Tespit basamakları sırasında, uygun dairesel seminifer tübüllerin yanında, yarısı çıkmış, sınırının bir kısmı belirli olmayan seminifer tübüller de saptanmıştır. Bunun nedeni, seminifer tübülün bu mikrografta kalan kısmının dairesel şekle yakın olması olabilir. Ancak kesin olarak uygun seminifer tübül statüsünde olduğu kanıtlanamadığı için, yöntemin adı geçen seminifer tübülü tespit etmesi olumsuz bir durumdur. Seminifer tübül tespiti sonucunda elde edilen çıktılar Şekil 4.8-11’de sunulmaktadır. Şekillerde tübülün tespit edildiği dörtgen üzerinde verilen sayısal değerler tespitin hassasiyet skorunu vermektedir.

Yarım seminifer tübüllerin tespit edildiği mikrograflar Şekil 4.8’de verilmiştir. Burada Şekil 4.8’de tespit edilen yarım seminifer tübüller beyaz ok ile işaretlenmiştir. YOLOv4 seminifer tübüllerini nesne olarak tanımaktadır. Bu nedenle yarım tübülü tamamlama eğilimi gösterir.



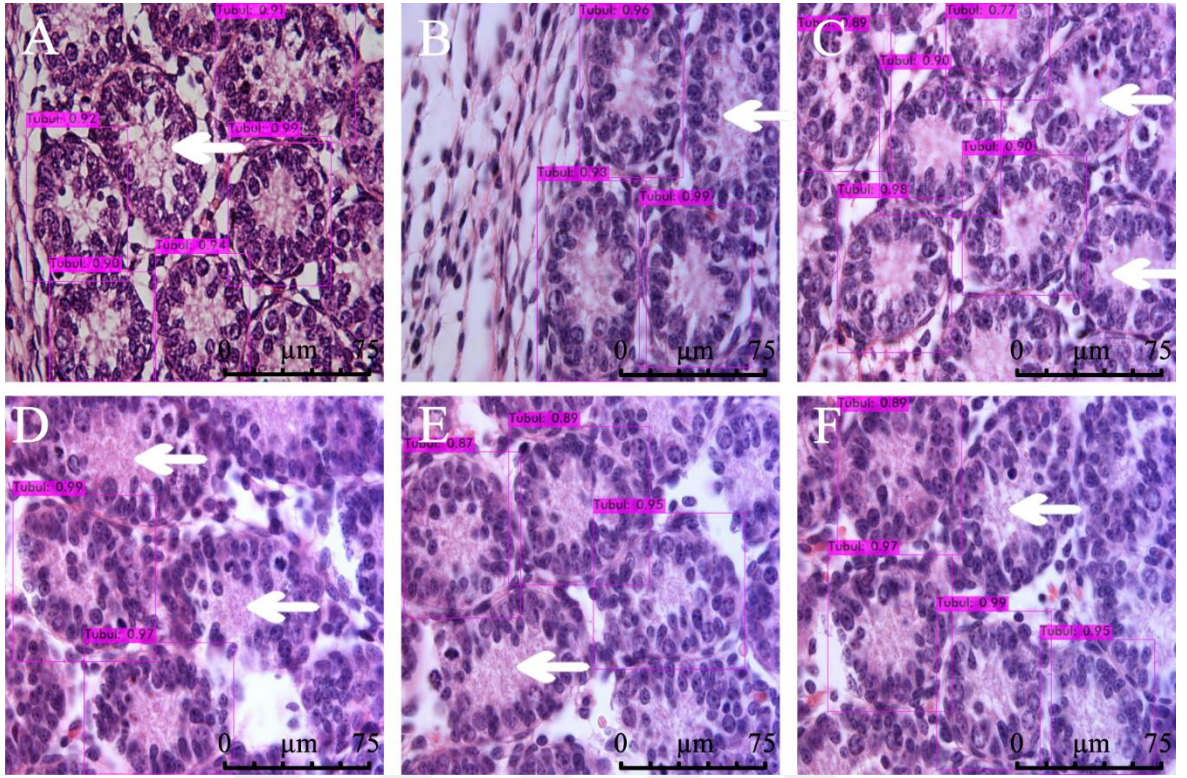
Şekil 4.8. Yenidoğan C57BL/6 fare testis kesitlerinde bir kısmı mikrograf dışında yer almasına rağmen tespit edilen seminifer tübüller verilmiştir. Tamamı mikrografta yer almamasına rağmen sistem tarafından tespit edilen seminifer tübüller okla işaretlenmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği dörtgen üzerinde verilen sayı değerleri tespitinin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A-E) x630, Hematoksilen Eozin

Uygun seminifer tübülün yer almadığı bilinen mikrograflar algoritma üzerinde denenmiş ve hatalı bir seçim yapıp yapmayacağı test edilmiştir. Buna göre YOLOv4'ün herhangi hatalı bir seçim yapmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Uygun seminifer tübülün bulunmadığı mikrograflarda seçim yapılmaması, elde edilen yüksek skorların doğruluğunu kanıtlar niteliktedir.



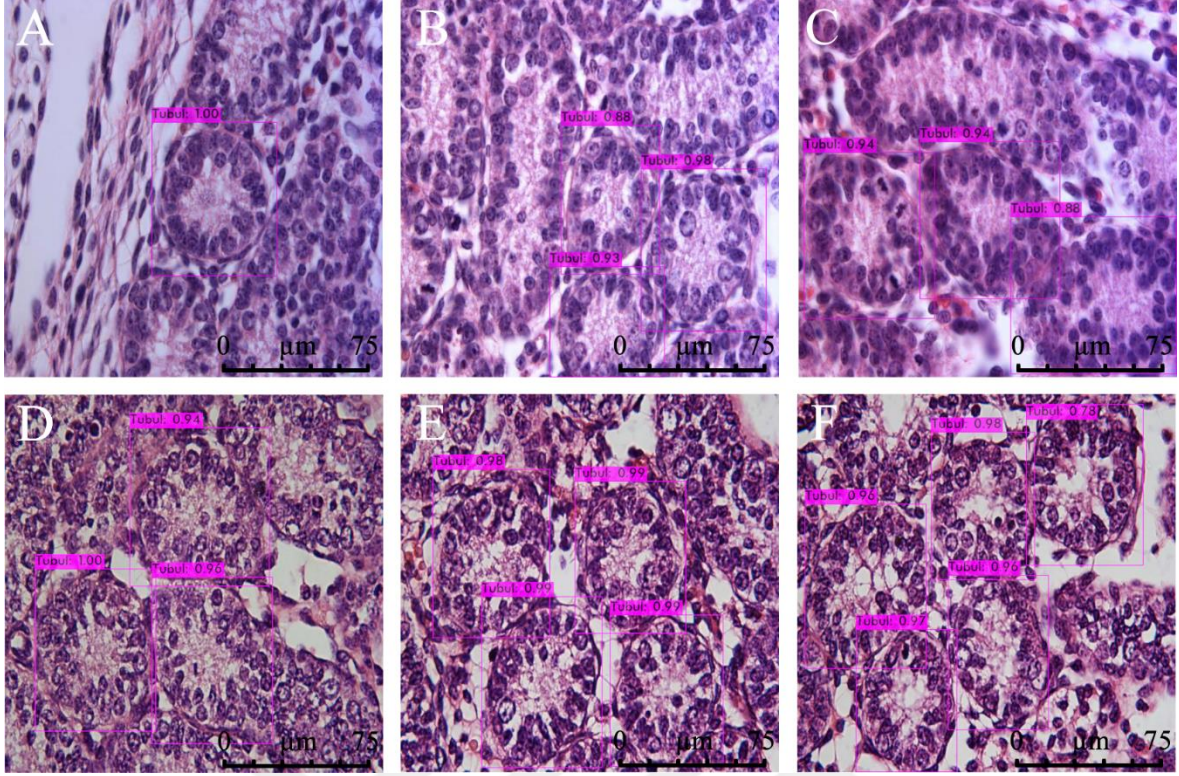
Şekil 4.9. Uygun seminifer tübül yer almayan mikrografların YOLOv4 ile denenmesi sonucu elde edilen çıktılar verilmiştir. Sistemin burada herhangi bir tespit yapmaması onun yüksek mAP skorunu doğrular niteliktedir. (A-E) x630, Hematoksilen Eozin

YOLOv4 uygun olduğu halde bazı seminifer tübülleri tespit edememiştir. Şekil 4.10'da uygun olup YOLOv4 tarafından tespit edilemeyen seminifer tübüllerin olduğu mikrograflar görülmektedir. Tespit edilememe durumu seminifer tübüllerin şekli ve boyutu sebebiyle gerçekleşmiş olabilir. Uygun seminifer tübüllerin dairesel ve sınırlarının net belirli olması gerekir. Örneğin Şekil 4.10 A'da tespit edilemeyen seminifer tübül elipse yakın şekilde olduğu için algoritma tarafından tespit edilememiş olabilir. Şekil 4.10 B'de ise seminifer tübül hem şeklinden hem de boyutundan dolayı tespit edilememiş olabilir. Şekil 4.10 C'de ise tespit edilemeyen 2 seminifer tübülden üstte olan şekil ve sınırlarının karmaşıklığı nedeniyle, alttaki ise sağ tarafındaki sınırın bir bölümünün mikrograf dışında kalması sebebiyle tespit edilememiş olabilir. Şekil 4.10 D ve Şekil 4.10 E'de saptanamayan tübüllerin sınırlarının bir kısmının belirsiz olması, Şekil 4.10 F'de seminifer tübüllerin boyut ve şekil açısından farklılık göstermesi, tespit yapılamamasına neden olmuş olabilir. Ancak tespiti yapılan tübüllerin ise yüksek hassasiyet ile tespit edildiği görülmektedir.



Şekil 4.10. Algoritma tarafından tespit edilemeyen seminifer tübüllerin bulunduğu mikrograflar verilmiştir. Mikrograflardaki tespit edilemeyen seminifer tübüller okla işaretlenmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespit hassasiyet skorunu göstermektedir. (A-F) x630, Hematoksilen Eozin

Bu iş paketi kapsamında geliştirilen YOLOv4 algoritması, hedeflediğimiz boyuttaki seminifer tübülleri tespit etmiştir. Saptanan seminifer tübüllerin ortak özelliği, yaklaşık dairesel ve ortalama 56 μm genişlik ve 58 μm yüksekliğe sahip boyut aralığında olmalarıdır. Şekil 4.11’de uygun seminifer tübüllerin algoritma tarafından tespit edildiği mikrograflar görülmektedir.



Şekil 4.11. Algoritma tarafından uygun seminifer tübüllerin tespit edildiği mikrograflar arasından örnekler verilmiştir. Seminifer tübüllerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespitin hassasiyet skorunu göstermektedir. (A- F) x630, Hematoksilen Eozin

4.4.2. Spermatogonyal kök hücrelerin YOLOv4 yöntemi ile saptanması

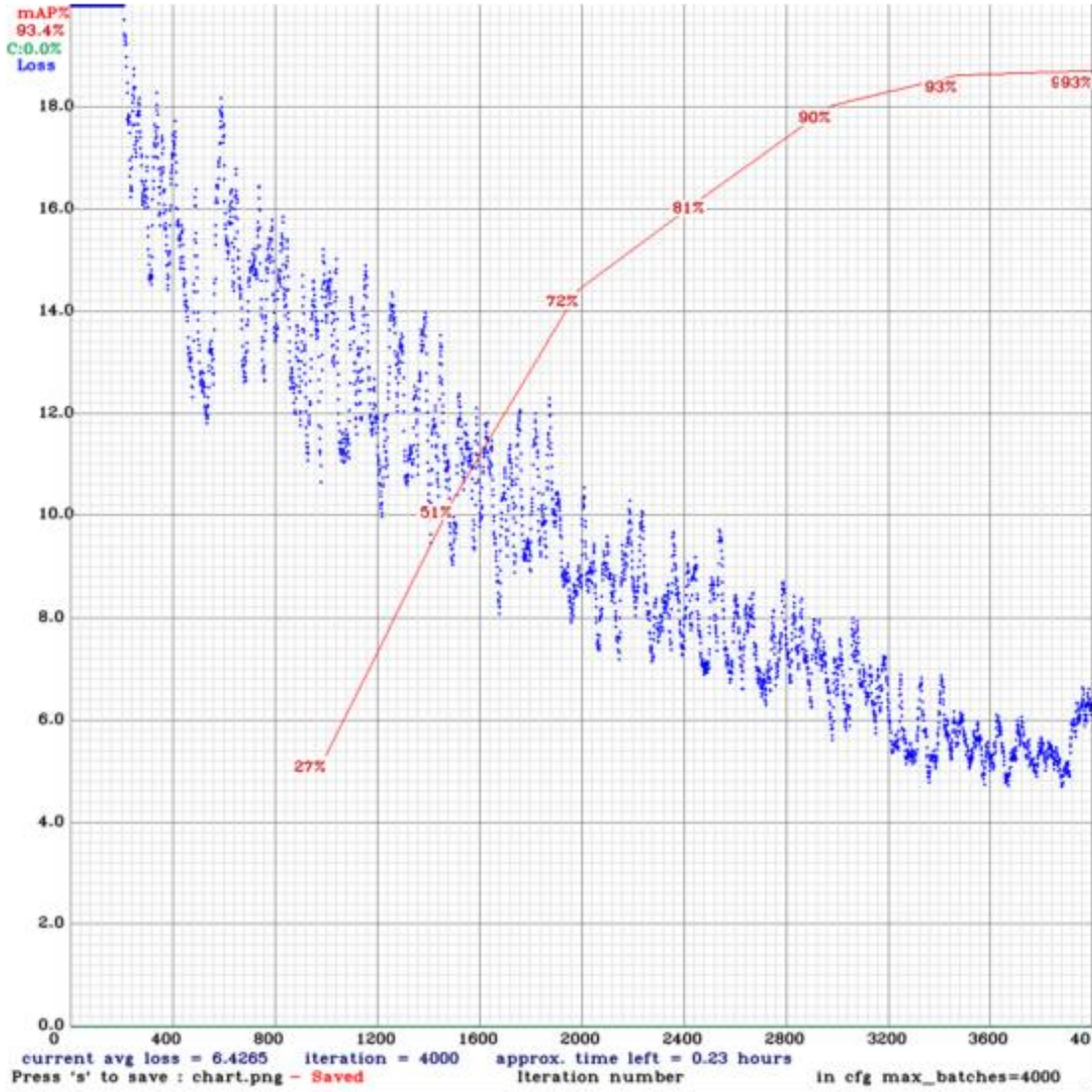
Dijital kamera atışmanlı ışık mikroskobu ile elde edilen mikrografların etiketlenmesiyle SKH tespiti için eğitilen YOLOv4 algoritması test verileriyle test edilmiştir. Buna göre 4000 döngü sonucunda kayıp değeri 6,42 ile sonuçlanırken, mAP değeri %93'e ulaşmıştır. Spermatogonyal kök hücrelere ait kayıp değerinin kademeli düşüşü, seminifer tübüllerdeki kadar dik olmamakla beraber, 3600'lü döngü sayısına kadar devam etmiştir. Bu süreçte SKH'ler için mAP değerinin kademeli artışı seminifer tübüllerdekine benzer biçimde devam etmiştir. Spermatogonyal kök hücrelere ait kayıp değerinin düşüş eğilimini kaybetmesiyle mAP değeri %93'te sabitlenmiştir (Şekil 4.12). Spermatogonyal kök hücrelerin kayıp değerinin seminifer tübül tespitindeki kadar azalmadığı gözlenmektedir. Bunun nedeni, seminifer tübül tespitinin SKH tespitine göre daha kolay olmasıdır. Spermatogonyal kök hücreleri saptamanın zorluğunun diğer göstergesi döngü sayısının seminifer tübül döngü sayısından daha yüksek (3000 yerine 4000) olmasıdır.

Ancak SKH'ler için mAP yüzdesi %93 seviyelerinde olduğu için YOLOv4'ün SKH tespitinde başarıyla kullanılabileceği görülmüştür. YOLOv4 yönteminin SKH'ler için %93 ile kabul edilebilir bir mAP skoruna ulaştığı izlenmiştir. Tablo 4.3'te ise mAP değerinin yanında kesinlik, hassasiyet ve f1 skorları verilmiştir.

Tablo 4.3. Etiketlenmiş SKH mikrografları ile eğitilen YOLOv4 algoritmasının test skorları verilmiştir. Yöntemin %93 ile kabul edilebilir bir mAP skoruna ulaştığı görülmektedir.

YOLOv4 ile SKH Tespit Test Skorları			
mAP	Hassasiyet	Kesinlik	F1 skoru
0.93	0.91	0.84	0.87

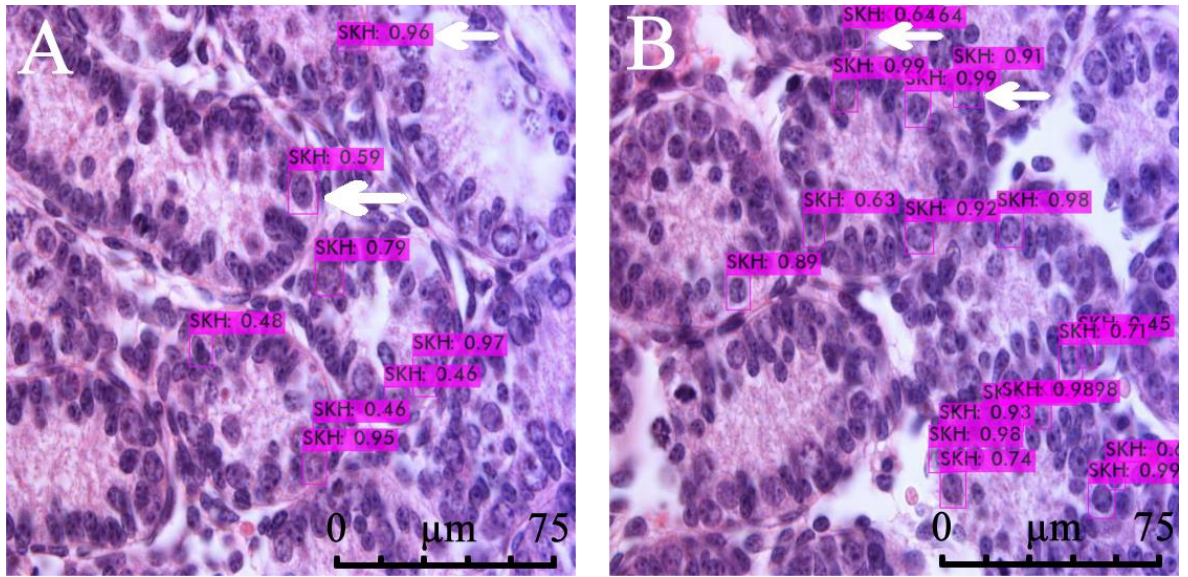
YOLOv4 ile SKH saptama sürecinde 4000 döngü sonucunda kayıp değeri 6,42 ile sonuçlanırken, mAP değeri %93'e ulaşmıştır (Şekil 4.12). Spermatogonyal kök hücre tespitinde kayıp değerindeki düşmeye mAP değerindeki artış eşlik etmektedir.



Şekil 4.12. Döngü sayılarına göre mAP ve kayıp değerlerinin kıyaslanması verilmiştir. 4000 döngü sonucunda kayıp değeri 6,42 ile sonuçlanırken mAP değeri ise %93'e ulaşmıştır.

Spermatogonyal kök hücre sayımına ait etiketli veri seti ile eğitilen YOLOv4 algoritması kullanılarak 600x600'lük fotoğraflarda hücre tespiti yapılmıştır. Optimum koşullarda SHK tespitlerinin çizdirilmesi için eşik değeri %45 olarak belirlenmiştir. Bu değere seminifer tübül seçimindekine benzer biçimde spesifik olmayan seçimlerden kaçınmak amacıyla karar verilmiştir. Buna göre, Şekil 4.13'te SKH tespiti için sayım yapılabilecek uygunluğa sahip iki seminifer tübül bulunmaktadır. Algoritma, tespitlerin çoğunu bu 2 tübül üzerinde yapsa da bunların dışında uygun olmayan seminifer tübüllerden de iki tane SKH tespiti yapıldığı görülmektedir. Örneğin Şekil 4.13 A üzerinde ok ile gösterilen ve %59'luk hassasiyet ile tespit edilen SKH'nin saptanma nedeni, uzun seminifer tübülün

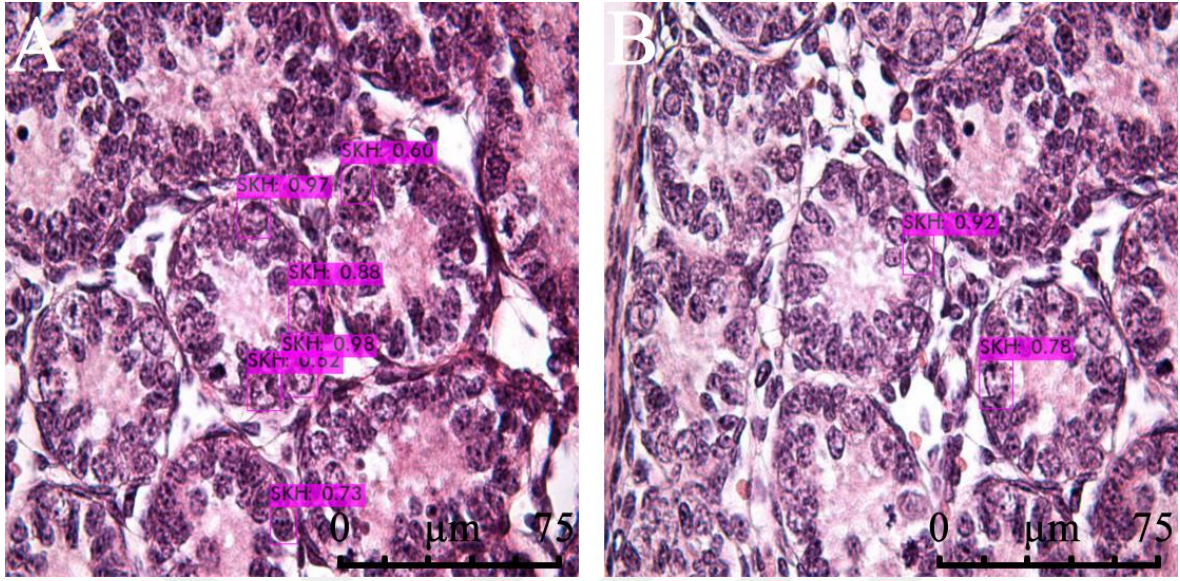
uç kısmının kısmen dairesel şekilde olmasından kaynaklanabilir. Ek olarak, Şekil 4.13 A'da ok ile gösterilen ve %96 hassasiyet ile tespit edilmiş diğer SKH ve Şekil 4.13 B'de ok ile belirtilen SKH'lerin saptanma nedeni, yarım seminifer tübülün tam seminifer tübül olarak algılanması sonucu olabilir. Bunun nedeni etiketleme sırasında seminifer tübül şekillerinin büyük oranda dairesel olmasına rağmen, kesit alınması sırasında meydana gelebilen teknik artefaktlar ile bazı seminifer tübüllerin dairesel şekillerinin bozulabilmesidir.



Şekil 4.13. C57BL/6 yenidoğan fare testis kesitlerinde uygun olmayan seminifer tübülden seçilen SKH'ler oklarla gösterilmiştir. Hücrelerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespit in hassasiyet skorunu göstermektedir. (A, B) x630, Hematoksilen Eozin

İncelenen testis kesitlerinden bazılarında, seminifer tübül başına 1-2 hücre gibi düşük oranlarda SKH tespiti yapılabilmektedir (Şekil 4.14). Bunun nedeni, kök hücrelerin üst üste gelmesi ya da kesitlerdeki kalınlık farklarına bağlı iyi odaklanamayan alanlarda yerleşmeleri olabilir. Hücre etiketleme işlemi ilgili kesitin immün işaretlemesi sonucunda elde edilen çıktılara göre gerçekleştirilmiştir. İmmün işaretlenme şiddeti sonuçlarda belirleyici olabilir. Diğer yandan sayımlarda yüksek çözünürlüklü mikroyraflar kullanılsa da SKH'lerin yerleştiği üç boyutlu mikroçevre ortamının karmaşıklığına bağlı çözünürlüğün yetersiz kalabilmesi olabilir. Seminifer tübül boyutlarının kök hücrelere

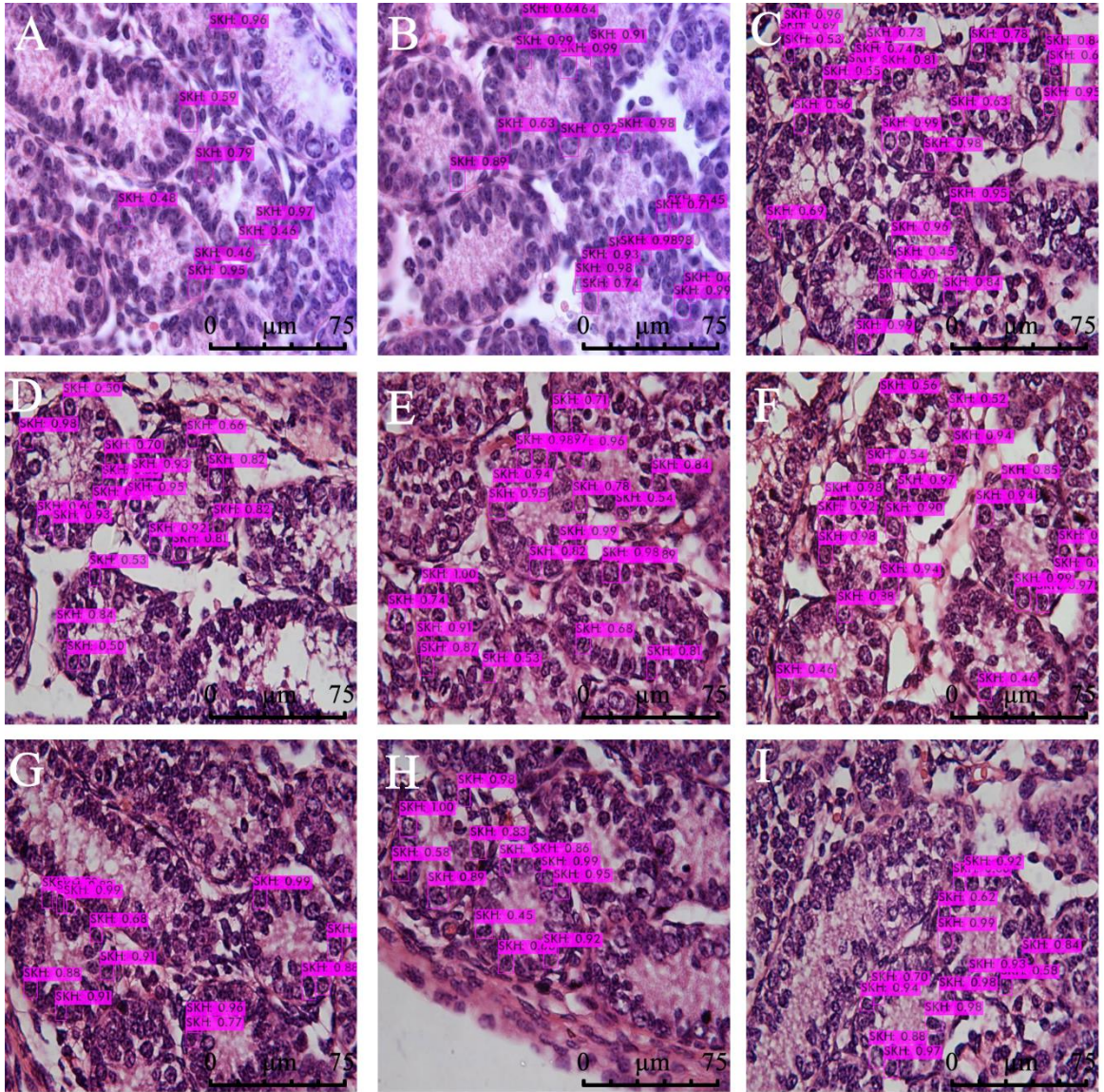
göre büyük olmasından dolayı aynı çözünürlüklü fotoğraflarla yapılan eğitim sürecinde hücelere göre daha az döngü sayısı ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Algoritmanın tespit ettiği SKH sayılarının düşük olduğu örnekler verilmiştir.

Hücrelerin tespit edildiği kare üzerinde verilen sayı değerleri tespit hassasiyet skorunu göstermektedir. (A, B) x630, Hematoksilen Eozin

Yenidoğan fare testis kesitlerinin pek çoğunda, seminifer tübüllerdeki kök hücrelerin büyük çoğunluğu algoritma ile saptanabilmiştir. Şekil 4.15'te algoritmanın iyi sonuç verdiği mikrogramlar arasından bazı örnekler görülmektedir.



Şekil 4.15. Algoritmanın yüksek oranda tespit ettiği SKH'ler bulunan örnek mikrograflar verilmiştir. (A-I) x630, Hematoksilen Eozin

5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, belirlenen hedeflere ulaşarak C57BL/6 türü 6 günlük erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde histokimyasal ve immünokimyasal yöntemlerle SKH'lerin mikroçevre bileşenleri işaretlenmiş, dijital kamera atışmanlı ışık mikroskopunda testis mikrografları elde edilmiş, testis mikrograflarında yer alan tübüllerdeki SKH'ler manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanmış, etiketlenmiş veri seti oluşturulmuş, SKH'lerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri, makine öğrenmesi ve derin öğrenmeden yararlanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilip test edilmiş ve verimlilik açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda araştırma hedeflerine ait başlıklar altında sırasıyla tartışılmaktadır.

1. Araştırma Hedefi: C57BL/6 türü 6 günlük erkek fare testis parafin bloklarından elde edilen kesitlerde hematoksilin eozin ve sıçan anti fare SALL4 antikoru kullanılarak başarıyla işaretlenmiştir. Kesitlerdeki seminifer tübüller ve buraya yerleşik hücreler belirgin şekilde ayırt edilebildiğinden, görüntü analizinin yapıldığı ve öğrenme algoritmalarının oluşturulduğu iş paketlerinde güvenle kullanılabilmiştir. Testisin hematoksilin eozin tekniği ile işaretlenmesi yaygın olarak uygulanmaktadır. Görüntü işleme ve makine öğrenmesi teknikleri kullanılarak testis ile yapılan çalışmalarda hematoksilin [5] ve hematoksilin eozin[6-8] işaretlemesinin kullanıldığı görülmektedir. Bu çalışmalara dayanarak bu tez çalışmasında görüntü işleme, makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemleri için hematoksilin eozin boyama tekniği güvenle kullanılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yenidoğan 6 günlük erkek fare testis kesitlerinde seminifer tübüllerde yerleşik SKH'ler SALL4 için başarıyla işaretlenerek görüntülenmiştir. SALL4 yüzey belirteci testis mikroçevresinde SKH'ye özgü bir moleküldür [62]. Bu molekülün fare testisinde seminifer tübüldeki ifadesinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda immünohistokimyasal yöntemle işaretlendiği bildirilmiştir [63, 64]. Bu tez çalışmasında parafin bloklarda indirekt immünperoksidaz yöntemiyle işaretlenen SKH'ler, tübül bazal membranında yerleşik biçimde görüntülenmiştir. Bu kapsamda, 35 kesit hematoksilin eozin ile boyanmışken 18 kesit ise anti fare SALL4 antikoru ile işaretlenmiştir ve ileri iş paketleri için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

2. Araştırma Hedefi: Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobunda testis mikrografları elde edilmiştir. Testis mikrograflarında yer alan tübüllerdeki SKH'ler manuel olarak LASv3 görüntü işleme yetenekleri ile saptanmış ve etiketlenmiş veri seti oluşturulmuştur. Hematoksilen eozin yöntemiyle boyanmış 35 kesitten testis mikrografları sonraki aşamalarda kullanılmak üzere elde edilmiştir. Bu kesitler hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra mikrograflarda kanalize olmamış seminifer tübüllerin büyük piramit biçiminde Sertoli hücreleri ve bazal membrana yerleşik yuvarlak biçimli SKH'leri gözlenmiştir. Hematoksilen eozin yöntemiyle boyanmış kesitlerden testis mikrograflarının elde edilmesi sürecinde dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu kullanılmasına benzer olarak tam kesit taraması ile elde edilmiş görüntülerle ilgili çalışmalar literatürle de doğrulanmıştır. Bu tez çalışmasında x63 orijinal büyütmede (x630 toplam büyütmede) seminifer tübül ve SKH tespiti gerçekleştirildikten sonra, seminifer tübül için 35 kesitten 3264x2448 ve 1920x1940 çözünürlük ve toplamda 5,9 gigabayt boyutunda 586 mikrograf kullanılarak seminifer tübül veri seti oluşturulmuştur. Seminifer tübül veri seti etiketleme işleminin ardından yeniden boyutlandırma (600x600) ve veri artırımı işlemlerine tâbi tutulmuştur. Veri artırımı işlemi sonucunda veri setinin toplam boyutu 858 megabayt olmuştur. Ardından veri seti 10187 eğitim verisi ve 2547 test verisi olmak üzere veri seti bölünmüştür. Spermatogonyal kök hücre için 18 kesitten toplamda 3,8 gigabayt boyuta sahip 342 mikrograf elde edilmiştir. Elde edilen bu mikrograflara etiketleme işleminin ardından yeniden boyutlandırma (600x600) ve veri artırımı işlemleri uygulanmıştır. Bu işlemler sonrasında veri seti 7911 eğitim verisi ve 1978 test verisi olmak üzere ikiye bölünmüştür. On sekiz kesitte indirekt immünperoksidaz yöntemiyle SALL4 antikoru ile kahverengi olarak işaretlenen SKH'ler invert e ışık mikroskobuyla incelenip tespit edilmiştir. Ardından buradaki tespitler doğrultusunda öğrenme algoritmalarının eğitiminde kullanılacak veri setleri oluşturulmuştur. Spermatogonyal kök hücrelerin SALL4 antikoru ile işaretlenip veri seti oluşturmak için kullanılması literatürde ilk defa grubumuz tarafından bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu işlemle hücrelerin SKH olduğu immünohistokimyasal olarak literatüre uygun bir şekilde doğrulanmıştır [63, 64].

Fare seminifer tübüllerini sınıflandırmak için oluşturulan derin öğrenme algoritması için hematoksilen ile boyanan kesitler x20 orijinal büyütme ile taranarak fotoğraflar elde edilmiştir. Bu fotoğraflardan 100x100'lük parçalar alınmıştır [5]. Fare testis kesitlerinden

seminifer tübüllerin otomatik evre tespiti için oluşturulan derin öğrenme yöntemi için hematoksilin eozin boyalı farklı 28 fare testis kesitinden her birisi yaklaşık 21000x23000 çözünürlükte ve 1,5 gigabayt boyutlarında veri seti taranarak oluşturulmuştur [6]. Hematoksilin eozin boyalı sıçan kesitlerinden spermatojenik evreleme için oluşturulan derin öğrenme algoritması için 33 tane tam kesit görüntüsünden veri seti oluşturulmuştur. Bu kesitlerin her biri x40 orijinal büyütmede taranmıştır. Bu taranmış fotoğraflardan her biri 512x512x3 olacak şekilde mikrograf parçaları alınmıştır [8]. Fare testis bölümlerinin evrelemesi için oluşturulan derin öğrenme algoritması için hematoksilin eozin ile boyanmış her biri 21000x23000 piksel olan ve 1,5 gigabayt boyuta sahip 27 tam kesitten 40 testis bölümü seçilerek veri seti oluşturulmuştur [7]. Adı geçen çalışmalarda [5-8] kullanılan kesit sayıları bu tez çalışmasında kullanılan 35 kesit adeti ile uyumlu görülmektedir. Bu tez çalışmasında veri seti oluşturulurken mikrograf boyutları 600x600 olarak yeniden boyutlandırılmı tır. Bu boyut sıçan kesitlerinden spermatojenik evreleme için yapılan çalışmada [8] derin öğrenme modeli için kullanılan mikrograf parça çözünürlükleri olan 512x512x3 ile uyumdur. Bu tez çalışmasında makine öğrenmesi ve derin öğrenme modellerinin kurulup eğitilmesi için oluşturulan veri setleri genel kullanıma açılacaktır.

3. Araştırma Hedefi: Spermatogonyal kök hücrelerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için görüntü işleme teknikleri ve makine   renmesinden yararlanılarak bir öğrenme algoritması geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bu tez çalışmasında AKM (Aktif Kontur Modeli) kullanılarak 5 farklı fare testis kesitinden 66 mikrograflarındaki seminifer tübüller tespit edilmiş ve bu seminifer t b llerle veri seti oluşturulmuştur. Bu veri seti seminifer tübül tespiti yapılan mikrografda bulunan seminifer tübüllerden ve seminifer tübül olmayan diğer bir sınıftan oluşmaktadır. Tespit edilen t b llerle oluşturulan veri seti kullanılarak DVM, KA, RO, NB, KNN ve LR yöntemlerine dayalı öğrenme algoritmaları e itilip test edilmiştir. Tüm  l  m metriklerinde RO seminifer tübül sınıflandırmasındaki en başarılı yöntem olmuştur. Doğruluk, f1-skoru, kesinlik ve hassasiyet metriklerinde aldığı değerler sırasıyla %96,9, %96,9, %97,1, %96,9 elde edilmiştir. Ardından DVM, KA ve LR sırasıyla %96,2, %96,2, %96,5, %96,2 olarak elde edilmiştir. Tüm yöntemler arasında tüm ölçüm metriklerine göre kıyaslandığında performans açısından KNN doğruluk, f1-skoru, kesinlik ve hassasiyet metrikleri

açısından değerlendirildiğinde %86, %85,8, %89,1 ve %86 ile diğer yöntemlerden geride kalmıştır.

Literatürde fare testis mikrogramlarındaki tübüllerin tespiti için AKM'nin kullanıldığı bir çalışmada fare testislerinin histolojik bölümleri AKM ile analiz edilerek testisteki olası toksik hasar için değerlendirilmiştir [65]. Bunun için parafin bloklara gömülen testislerden 5 µm kesit alınıp hematoksilin eozin ile boyanmıştır. Aktif kontur model uygulaması öncesi medyan filtre ve morfolojik işlemler uygulandıktan sonra yerel kenar dedektörü uygulanmıştır. Son olarak AKM ile seminifer tübüller tespit edilmiştir [65]. Aktif kontur modeli ile tespit edilen tübüllerden veri seti oluşturulup makine öğrenmesi yöntemleri ile öğrenme algoritması kullanımı ilk defa bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir. Adı geçen çalışmada 5 µm kalınlığında kesitler kullanılmıştır. Bu kesitler hematoksilin eozin ile boyanmıştır ve yalnızca seminifer tübül tespiti yapılmıştır [65]. Bu tez çalışmasında benzer şekilde hematoksilin eozin boyalı kesitler kullanılsa da bizim çalışmamızda benzer şekilde hematoksilin eozin ile boyadığımız kesitlerimiz yaklaşık 3 µm'dir. Kesitin daha ince olması görüntü kalitesi açısından artırıcı bir etken olabilir. Bu tez çalışmasında seminifer tübül tespitine ek olarak tespit edilen seminifer tübüller makine öğrenmesi yöntemleriyle sınıflandırılmıştır. Adı geçen çalışmada ise sınıflandırma yapılmamıştır [65]. Çalışmamızda tübüllerin tam anlamıyla sınırdan tespit edilememesi bir dezavantaj olarak görülebilir. Ancak mikrogramlarda bulunan seminifer tübüllerin sayıca çoğunun tespit edilebilmiş olması AKM'nin tübül tespiti için kullanılabilirliğini gösterir.

Literatürde testis, sperm, SKH ve makine öğrenmesi içeren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Gasohole maruz kalan yetişkin erkek sıçanların sperm kalitesinin değerlendirildiği çalışmada yapay sinir ağları, bayes sınıflandırıcısı, KNN, DVM ve optimum-yol orman sınıflandırıcıları kullanılmıştır. Bunlar arasında en iyisi DVM olup %90 doğruluk elde etmiştir [10]. Spermatogonyum'un Zernike momentleri ile sınıflandırıldığı çalışmada sıçan ultra ince kesit elektron mikroskobu görüntüleri kullanılmıştır. Zernike momentleri ile elde edilen sonuçların Hu ve sınır momentlerinden elde edilen sonuçlara göre üstün olduğu belirtilmiştir [66]. Sperm kalitesi değerlendirilmesi ile ilgili olan bu çalışmada [10] bu tez çalışmasında da yer alan DVM

sınıflandırıcısının kullanımı ve %90 doğruluk elde etmesi testis mikroçevresi ile ilgili çalışmalarda makine öğrenmesi yöntemlerinin kullanılabilirliğini ortaya koyar. Hem sperm kalitesinin değerlendirilmesinde elde edilen doğruluk değeri, hem de bu tez çalışmasında elde edilen %96,2'lik değer DVM, RO, KA, KNN, LR, NB gibi yöntemlerin testis ile ilgili çalışmalarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Makine öğrenmesi yöntemlerinden DVM, RO, ÇKA, KA ve AB sınıflandırıcıları ile kök hücrelerin kalite değerlendirilmesi yapılan çalışmada olduğu gibi bizde tübül sınıflandırması için bu tekniklerden DVM, RO, KA'yı bu çalışmada kullandık. Kök hücrelerin kalite değerlendirmesinde DVM %96,6, RO %87,5 ve KA %83,3 olarak doğruluk değerleri elde edilmişken, bu tez çalışmasında DVM %96,2, RO %96,9 ve KA %96,2 doğruluk değeri elde ederek DVM hariç daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu tez çalışmasında makine öğrenmesi yöntemlerinden DVM ile elde edilen %96,2'lik doğruluk skoru ile sperm kalitesinin değerlendirildiği çalışmada DVM ile elde edilen %90'lık doğruluğa üstünlük sağlar. Hem sperm kalitesinin değerlendirilmesinde elde edilen doğruluk değeri, hem de bu tez çalışmasında elde edilen %96,2'lik değer DVM, RO, KA, KNN, LR, NB gibi yöntemlerin testis ile ilgili çalışmalarda kullanılabilir olduğunu gösterir. Spermatogonyum'un elektron mikroskobu görüntülerinden tespiti için Zernike momentleri kullanılan çalışma [66] testiste bulunan hücrelerin görüntü işleme yöntemleriyle tespit edilebilir olduğunu ortaya koysa da kullanılan görüntüde spermatogonyumun ışık mikroskobunda olduğundan binlerce kat daha büyük olarak, organellerinin ultrastrüktürel yapısıyla görülebilmesi, tespiti daha olası yapan bir etkidir. Elektron mikroskobu pahalı bir ekipman ve deneyimli teknik personel kullanımı gerektirip, tezin amacına uygun olarak klinikte SKH havuzuna hızlı ve kolay sayım yapma hedefini karşılamamaktadır.

Makine öğrenmesi yöntemleri indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin analizini yapmak için kullanılmıştır [17]. Sıçansı kökenli indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin faz-kontrast mikroskop görüntülerinden sağlıklı ve sağlıklı olmayan kolonileri karakterize etmek için DVM, RO, ÇKA, KA ve AB sınıflandırıcıları ile sınıflandırma işlemi yapılmıştır [17]. Bu yöntemlerin sınıflandırma sürecinde şekil ve moment bazlı, istatistiksel, spektral özellik grupları kullanılmıştır. Bunların bir arada kullanıldığı durumlarda yöntemlere göre sınıflandırma doğruluk değerleri DVM için %91,6, RO için %87,5, ÇKA için %73,3, KA için %83,3 ve AB için %87,5 olarak elde edilmiştir [17]. Bu tez çalışmasında

kullanılan ve SKH gibi bir kök hücre olan indüklenmiş kök hücrelerin sınıflandırılmasının yapıldığı çalışmada elde edilen değerlerle bizim tez çalışmamızda elde ettiğimiz DVM’de %96,2, KA %96,2, RO %96,9’luk değerler karşılaştırıldığında bu değerlerin daha üstün olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında seminifer tübüllerin tespiti sonrası, tübüller için gerçekleştirilen tüm süreçler SKH’lerin saptanması için uygulanmıştır. Son derece karmaşık bir mikroçevre içinde olan SKH’ler için görüntü işleme teknikleriyle bazı hücre tespitleri yapılabilmesi; mikrografi genelleyebilecek oranda tespit sağlanamadığından bu bölümdeki başarı sınırlı kalmıştır. Bunun nedeni SKH’lerin boyut olarak küçük, bulundukları tübüllerin kıvrıntılı olmaları nedeniyle iki boyutlu histolojik tübül kesitlerinin değişken görüntüler vermesi, mikrografların çözünürlüğünün yüksek olmasına rağmen, hücrelerin görüntü işleme teknikleri tarafından algılanabilirliğinde sınırlı sonuç vermiştir.

4. Araştırma Hedefi: SKH’lerin tespitinin otomatik olarak yapılabilmesi için derin öğrenme temelli bir modelin kurulması; kurulan modelin etiketlenmiş veri seti kullanılarak test edilmesi ve bulunan sonuçların görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen algoritmayla elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında fare testis kesitleri kullanılarak oluşturulan seminifer tübül ve SKH veri setleri ile derin öğrenme temelli YOLOv4 modeli eğitilip test edilmiştir. Seminifer tübül için 35 kesitten 586 mikrograf elde edilmiştir. Yeniden boyutlandırma ve veri artırımı işlemleri sonrasında 10187 eğitim verisi 2547 test verisi olacak şekilde veri seti oluşturulmuştur. Seminifer tübül eğitimi 3000 döngü sonunda bitirilmiş olup mAP %94 değerine ulaşmıştır. Spermatogonyal kök hücreler için 18 kesitten 342 mikrograf elde edilmiştir. Bu mikrograflara yeniden boyutlandırma ve veri artırımı işlemleri uygulanmıştır. Veri seti 7911 adet eğitim verisi, 1978 adet test verisi olacak şekilde oluşturulmuştur. SKH eğitimi 4000 döngü ile tamamlanmış olup %93 mAP değeri elde edilmiştir. Literatürde derin öğrenme temelli modeller arasında fare ve rat testis kesitlerinde tübül tespiti ve morfolojisinin değerlendirilmesi [5, 6, 8] amacıyla kullanımı bildirilmiştir. Fare testis kesitlerinden tübül aşaması tespiti için oluşturulan derin öğrenme

algoritması için x20 orijinal büyütmede taranmış hematoksilen boyalı kesitlerden 100x100 boyutunda 6588 tübül görüntüsü ile bir veri seti oluşturulmuştur [5]. Bu veri seti normal seminifer tübül, vakuollü tübüller, anormal üreme hücreleri içeren tübüller, lümende üreme hücreleri içeren tübüller ve germ hücreleri olmayan tübüller olmak üzere 5 farklı tübül kategorisine sahiptir. Bu veri setindeki fotoğraflar 4 farklı açıda döndürülüp veri artırımı uygulanmıştır. Bu veri setiyle Yığınlı Evrişimli Otomatik Kodlayıcılar (*Stacked Convolutional Auto-Encoders*) dayanan hiper katman eklenmiş yeni bir mimari kullanılmıştır ve %98 doğruluk elde etmiştir [5]. Fare testis kesitlerinden seminifer tübüllerin evre tespiti için oluşturulan diğer bir derin öğrenme algoritması için 28 farklı hematoksilen ile boyanmış kesitten oluşturulan veri setinden VI-VIII aşamalarında 209 seminifer tübül seçilerek veri seti oluşturulmuştur. Bu veri setleriyle seminifer tübül bölütlemesi ve çoklu hücre bölütlemesi için derin kalıntı ağ (*Deep Residual Network*), çoklu bölge bölütlemesi için tam evrişimli ağ (*Fully Convolutional Network*) kullanılmıştır. Sonuç olarak sınıflandırma doğruluk değeri olarak tübül için %94,40 ve çoklu hücre bölütlemesi için %91,26 oran elde edilmiştir. Çoklu bölge sınıflandırması ise %93,47 doğruluk oranı elde etmiştir [6]. Hematoksilen eozinle boyanmış sıçan testis kesitlerinin derin öğrenme temelli spermatojenik evremelesinin yapıldığı çalışmada ise U-net tabanlı bir derin öğrenme uygulaması kullanılmıştır ve %98,4 doğruluk değeri elde edilmiştir [8]. Fare testis kesitlerinde spermatogenez evrelemesi ile ilgili bir çalışmada ise testis kesitlerindeki tübül bölütlemesi için derin kalıntı ağı, spermatojenik hücre türleri için U-net temelli bir transfer öğrenme metodu kullanılmıştır. Tübül bölütlemesinde %91,20 doğruluk değeri elde edilirken spermatojenik hücre bölütlemesi için %92,95 doğruluk değeri elde edilmiştir [7]. Literatürde bulunan fare ve sıçan testisi kesitlerinin kullanıldığı çalışmalar [5-8] çoğunlukla tübüllerin spermatojenik aşamalarının evrelenmesi, seminifer tübül tiplerinin sınıflandırılması üzerinedir. İki çalışmada ise spermatojenik hücrelerin segmentasyonu çalışılmıştır [6, 7]. Spermatojenik hücrelerin bölütlenmesi bu tez çalışmasındaki SKH tespitine benzer olsa da bu tez çalışmasında YOLOv4 ile seminifer tübül içinde yerleşik hücreler hassasiyet oranları ile birlikte belirlenmiştir. Adı geçen çalışmalarda spermatojenik hücrelerin bölütlenmesinde hücreler manuel olarak etiketlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise testis mikroçevresinde SKH özgü yüzey belirteci SALL4 kullanılmıştır. Bu açıdan SKH tespiti daha güvenle yapılmıştır. Spermatojenik hücre tespitinin yapıldığı çalışmalarda [6, 7] sırasıyla %91,26 ve %92,95 doğruluk değeri elde edilmiştir. Bu tez çalışmasındaki SKH tespitinde ise %93 mAP değeri elde edilmiştir. Hücre belirleme açısından manuel tespitin olası

dezavantajlarının SALL4 ile bertaraf edilmesi ve %93 mAP değeri bu tez çalışmasını öne çıkaran yönler olarak görülebilir. Çalışmamızda seminifer tübülün YOLOv4 ile tespiti yanında, SKH'nin de tespiti YOLOv4 gerçekleştirilmiştir. Spermatogonyal kök hücrede YOLOv4 kullanımı ilk defa bu tez çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir. YOLOv4 ilk olarak seminifer tübül tespiti için eğitilmiştir. Seminifer tübül tespitinde %75'lik bir eşik değerinde %94'lük bir mAP seviyesine SKH tespitine kıyasla daha az döngü sayısına ulaşmıştır. Bunun sebebi YOLO'nun büyük objelerin tespitinde görece daha başarılı olması olabilir. YOLOv4'ün SKH tespitinde ise %93 mAP seviyesine ulaşılmıştır. Diğer kök hücre ve kan hücrelerindeki uygulamalarda kullanılan ölçüm metrikleri ile %89 ile %91 arasında skorlar elde edilmiştir. Bu çalışmalar derin öğrenme alanındaki yöntemlerin seminifer tübül tespiti ve SKH tespiti açısından uygunluğunu ortaya koyar. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla YOLOv4'ün SKH tespitinde ve sayımında kullanılabileceği gösterilmiştir.

Sperm morfolojisi ve kalite değerlendirmesi derin öğrenmenin kullanıldığı çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Tümör infiltre eden lenfositleri tespit etmek için derin öğrenme algoritması kullanılmıştır. Bunun için hematoksilen eozin boyalı 28 tam slayt görüntüsünden 259 tümör bölgesinde tümör infiltre eden lenfositler manuel olarak işaretlenmiştir. Elde edilen sonuçlar manuel tespit ile elde edilen sonuçlarla %89 korele olarak elde edilmiştir [9]. Sperm başı sınıflandırmak için derin öğrenme mimarisi olan VGG16 kullanılan çalışmada iki adet halka açık veri seti kullanılmıştır. Veri setinden birisi 216 adet RGB görüntüsü içerirken, diğeri ise 1132 adet gri tonlama görüntüsü içerir. VGG16 sperm başı sınıflandırmasında % 94 doğruluk değeri elde etmiştir [11]. Sperm parçalarını sınıflandırmak için yapılan başka bir çalışmada ESA kullanılmıştır. Veri seti birçok normal ve anormal sperm içeren 780x580 çözünürlüğe sahip 20 görüntüden oluşmuştur. ESA baş, akrozom ve çekirdek sınıflandırmasında sırasıyla %90,4, %77,3, ve %78,8 Dice benzerlik katsayısı elde etmiştir [12]. Diğer bir çalışmada spermin farklı kısımlarının sınıflandırmasında ESA kullanılmıştır. Bu amaç için infertil olan 235 hastadan alınan 1540 sperm görüntüsü kullanılmıştır. Evrimsel sinir ağı akrozom, baş ve koful için doğruluk değerlerini sırasıyla %76,67, %77 ve %91,33 olarak elde etmiştir. Literatürdeki ESA ile gerçekleştirilen ve bu çalışmalarda elde edilen başarılar %89 ile %94 arasında olup SKH kök hücre tespitindeki %93 mAP oranıyla benzer niteliktedir. Bu durum YOLO'nun SKH tespitinde kullanılabilir olduğunu destekler niteliktedir.

Derin öğrenme temelli model olarak bu tez çalışmasında kullanılan YOLO, literatürde testiste daha önce uygulanmamış olsa da testis dışındaki bazı doku ve hücreler için kullanılmıştır [16, 19-21]. Diğer bir çalışmada ise YOLOv4 ile Alexnet birlikte 242 beyaz kan hücresi görüntüsünü %98 mAP ile tespit etmiştir [21].

Tez çalışmasında kullanılan YOLO, derin öğrenme uygulamalarından ESA temelli bir tekniktir. Bu teknik testis dışındaki insan pluripotent kök hücresi [16] ve kan hücrelerinde de [18-20] çalışılmıştır. Derin öğrenme uygulamaları farklı kök hücre tipleri ve kan hücrelerinde de çalışılmıştır. İnsan pluripotent kök hücre kökenli kardiyomiyositlerin niteliklerinin belirlenmesi ışık mikroskobu görüntüleri kullanılarak eğitilen ESA'dan %89 F skoru elde edilmiştir [16]. Beyaz kan hücrelerinin tanımlanması için kullanılan ESA ile %96,1 doğruluk değeri elde edilmiştir. Bu çalışmada, veri seti 2551 görüntü içermektedir ve ESA transfer öğrenme ile birlikte kullanılmıştır [20]. Periferik kan görüntülerinden lökosit tespiti ve sınıflandırması için ESA kullanılmıştır. Veri setini 2864x2909 çözünürlüğe sahip 14 resimden elde edilen kırılmış 1080 görüntü oluşturmuştur. Evrişimsel sinir ağları bu veri setiyle %92,8 doğruluk değeri elde edilmiştir [18]. Akut lenfoblastik lösemnin otomatik tespiti için yapılan çalışmada ESA ile sırasıyla L1, L2, L3 ve Normal tipi için % 99,06, %93,33, %93,75, ve %98,11 doğruluk değerleri elde edilmiştir [19]. Literatürde ESA ile gerçekleştirilen bu çalışmalarda elde edilen başarı oranları %89 ile %91 arasında seyretmekte olup SKH'lerin tespitindeki %93 mAP oranlarıyla benzer niteliktedir. Bu durum, ESA temelli bir teknik olan YOLO'nun SKH'ler de etkili olduğunu desteklemektedir.

Tübül ve hücre tespiti için görüntü işleme yöntemleri kullanmak öznelik eldesinin elle yapılmasından dolayı derin öğrenme yöntemlerine kıyasla daha zaman alıcı olmuştur. Görüntü işleme yöntemlerinden aktif kontur metodu kullanılarak tespit edilen tübüllerde her bir mikrogram için parametrelerin tekrar tekrar ayarlanması oldukça fazla zaman alırken, derin öğrenme mimarisinde bu işlem ağ tarafından gerçekleştirildiği için sonuca daha kolay ulaşılmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında uygulanan tüm analiz ve ölçümlerin 6 günlük farelerden elde edilmesi insana uygulanabilirliği açısından sınırlılık taşır. Bundan dolayı, yöntemin insana uygulanabilirliğinin görülmesi için insandan elde edilen doku kesitlerindeki SKH'ler üzerinde denenmesi gerekir. Diğer yandan prepübertal insan testisinin etik olarak elde edilme şansının oldukça kısıtlı olması nedeniyle, hayvanlardaki deney modellerinin kullanılması öncelikli olarak gereklilik arz etmektedir [67]. Tübül ve hücre tespiti için görüntü işleme yöntemleri kullanmak, öznelitliklerin eldesinin elle yapılmasından dolayı derin öğrenme yöntemlerine kıyasla daha zaman alıcı olmuştur. Görüntü işleme yöntemlerinden aktif kontur metodu kullanılarak tespit edilen tübüllerde her bir mikrograf için parametrelerin tekrar tekrar ayarlanması oldukça fazla zaman alırken, derin öğrenme mimarisinde bu işlem ağ tarafından gerçekleştirildiği için sonuca daha kolay ulaşılmasını sağlamaktadır. Ayrıca görüntü işleme kısmının dokunun oldukça karmaşık olması nedeniyle SKH tespitinin kısıtlı olarak sağlanabilmesi diğer bir sınırlamadır. Bunu aşmak amacıyla daha eşikleme, morfolojik operasyonlar ve kernel temelli uygulamalar gibi geleneksel görüntü işleme tekniklerinin terk edilip tamamen derin öğrenme temelli yöntemlere yönelmek başarıyı artırıcı bir etken olabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, YOLOv4 modelinin 6 günlük fare testis kesitleri ile eğitilip test edilmesi sonucunda yüksek hassasiyetle tübül ve SKH tespiti yapılabilmektedir. Ayrıca, SKH açısından sınırlamalar olsa da görüntü işleme yöntemi tübül tespitinde başarılı olmuştur. Böylece manuel sayımla meydana gelebilecek insan kaynaklı hataların önüne geçilmesinin yanısıra otomatikleşmeyle birlikte işlemlerin hızlanması ile akademik çalışmalar ve klinik için tespit edilmesi ve sayımı zor olan SKH için geliştirilmeye açık bir yapay zekâ temelli görüntü analiz sisteminin ilk adımları atılmıştır. Bu çalışma üzerinden yapılacak ileri çalışmalarla SKH tespitine özgü moleküler belirteçlerin kullanımına gerek kalmayabilir ve araştırmacılar maddi yük kapsamında tasarruf sağlayabilir; hem de her laboratuvarda basitçe uygulanabilen hematoksilin eozin tekniği ile, immün işaretleme ve analizi için herhangi bir yetişmiş insan gücüne ihtiyaç duyulmadan prepübertal testis örneklerinde tübül morfolojisi ve SKH havuzu kantitatif olarak hızlı bir biçimde değerlendirilebilir. Bu yöntem, testisin in vitro matürasyonunun araştırıldığı deneysel hayvan modellerinde SKH havuzunun sayısal olarak hızlı ve pratik değerlendirilmesi için geçerli ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilir. Yöntem deneysel hayvan modellerinde valide edilerek başarıyla kliniğe taşınabilirse özellikle

kanser tanısı alan çocuklardan elde edilen prepubertal testis biyopsileri ile in vitro SKH matürasyonunun değerlendirildiği klinik düzeneklerde biyomühendislik temelli önemli bir yaklaşım sağlayabilir. Bu hedefler doğrultusunda gerçekleştirilecek ileri çalışmalarla görüntüleme modelleri patentli tanı destek sistemlerini içeren ürünlere dönüşme potansiyeli taşımaktadır.



6. YORUM

Bu tezde görüntü işleme, makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemleri ile testis mikrogramlarından seminifer tübül ve SKH tespiti amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, mikrogramlar elde edilmiş ve birinci basamakta görüntü işleme teknikleri uygulanıp seminifer tübül ve SKH'lerin tespiti hedeflenmiştir. İlk olarak seminifer tübül tespiti için aktif kontur modeli kullanılmıştır. Bu yöntem ile seminifer tübül tespiti sağlanmıştır. Böylece testis mikrogramlarından görüntü işleme teknikleri kullanılarak uygun seminifer tübüller tespit edilmiştir. Daha sonra tespit edilen seminifer tübülleri içeren ve seminifer tübül olmayan görüntüler sağlanmış ve bir veri seti oluşturulmuştur. Bu veri seti adı geçen makine öğrenmesi modelleri kullanılarak sınıflandırılmıştır. Destek vektör makineleri, lojistik regresyon, karar ağaçları, K en yakın komşu ve Naive Bayes yöntemleri arasında en iyi sonucu RO yöntemi vermiştir. Böylece görüntü işleme teknikleri ile elde edilen seminifer tübülün makine öğrenmesi yöntemleriyle sınıflandırılabilirliği gösterilmiştir. Benzer süreç SKH için denemesine rağmen SKH'lerin çok karmaşık bir ortamda bulunması ve bulunduğu ortama göre küçük olması dolayısıyla görüntü işleme teknikleri ile mikrogram üzerinde genellenebilir bir tespit sağlanamamıştır. Görüntü işleme teknikleri ile tespit edilip makine öğrenmesi yöntemleriyle sınıflandırma işlemi yapıldıktan sonra tespit işlemi bir derin öğrenme yöntemi olan YOLOv4 ile gerçekleştirilmiştir. Eğitim ve test veri setleri oluşturulup YOLOv4 eğitilmiş ve test edilmiştir. Burada hem seminifer tübül hem SKH seçimi başarıyla tamamlanmış ve YOLOv4'ün hem seminifer tübül hem de SKH tespitinde başarıyla kullanılabileceği gösterilmiştir. Çocukluk çağında prepubertal dönemde kanser tanısı alan erkek çocuklarda uygulanan gonadotoksik tedavi yaklaşımları nedeniyle, henüz spermatogenezis başlamadığından spermier hiç farklanamamakta; var olan SKH havuzu ise hasar görebilmektedir. Bu çocukların erişkin olduklarında biyolojik çocuklarına sahip olabilmeleri için kanser tedavisi öncesi elde edilen testis biyopsilerinde, kök hücre mikroçevresi korunarak in vitro ya da in vivo koşullarda SKH'lerin havuzlarını sayıca koruması ve spermatogenetik farklanmaya girerek spermier oluşturabilmesi hedeflenmektedir. Bu tez çalışması kapsamında tasarlanan biyomühendislik temelli görüntüleme, makine öğrenmesi ve derin öğrenme temelli analiz modelleri bu tür hastalarda patentli tanı destek sistemlerini içeren ürünlere dönüşme potansiyeli taşıyabileceği için geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] A. , P. Malik, M. Pathania, V. Rathaur, Overview of artificial intelligence in medicine, *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8 (2019) 2328-2331.
- [2] Y. LeCun, Y. Bengio, G. Hinton, Deep learning, *Nature*, 521 (2015) 436-444.
- [3] R. Miotto, F. Wang, S. Wang, X. Jiang, J.T. Dudley, Deep learning for healthcare: review, opportunities and challenges, *Brief Bioinform*, 19 (2018) 1236-1246.
- [4] Y.K. Chan, Y.F. Chen, T. Pham, W.D. Chang, M.Y. Hsieh, Artificial Intelligence in Medical Applications, *J. Healthc. Eng.*, (2018) 2.
- [5] C.-Y. Kao, L. McMillan, A Novel Deep Learning Architecture for Testis Histology Image Classification, *ArXiv*, (2017).
- [6] L.H. Xu J., Li H., Wang X., Madabhushi A., Xu Y., Histopathological Image Analysis on Mouse Testes for Automated Staging of Mouse Seminiferous Tubule. , in: C.C. Reyes-Aldasoro, Janowczyk, A., Veta, M., Bankhead, P., Sirinukunwattana, K. (Eds.) (Ed.) *Digital Pathology, 15th European Congress, ECDP 2019, Warwick, UK, April 10–13, 2019, Proceedings*, 2019.
- [7] J. Xu, H. Lu, H. Li, C. Yan, X. Wang, M. Zang, D.G.d. Rooij, A. Madabhushi, E.Y. Xu, Computerized Spermatogenesis Staging (CSS) of Mouse Testis Sections via Quantitative Histomorphological Analysis, *Medical Image Analysis*, (2020) 101835.
- [8] D.M. Creasy, S.T. Panchal, R. Garg, P. Samanta, Deep Learning-Based Spermatogenic Staging Assessment for Hematoxylin and Eosin-Stained Sections of Rat Testes, *Toxicol Pathol*, (2020) 192623320969678.
- [9] N. Linder, J.C. Taylor, R. Colling, R. Pell, E. Alveyn, J. Joseph, A. Protheroe, M. Lundin, J. Lundin, C. Verrill, Deep learning for detecting tumour-infiltrating lymphocytes in testicular germ cell tumours, *J Clin Pathol*, 72 (2019) 157-164.
- [10] K. Vieira, A.A. Fernandes, K.M. Silva, V.R. Pereira, D.R. Pereira, A.P.A. Favareto, Experimental exposure to gasohol impairs sperm quality with recognition of the classification pattern of exposure groups by machine learning algorithms, *Environ Sci Pollut Res Int*, 26 (2019) 3921-3931.
- [11] J. Riordon, C. McCallum, D. Sinton, Deep learning for the classification of human sperm, *Comput Biol Med*, 111 (2019) 103342.
- [12] R.A. Movahed, E. Mohammadi, M. Orooji, Automatic segmentation of Sperm's parts in microscopic images of human semen smears using concatenated learning approaches, *Comput Biol Med*, 109 (2019) 242-253.
- [13] S. Javadi, S.A. Mirroshandel, A novel deep learning method for automatic assessment of human sperm images, *Comput Biol Med*, 109 (2019) 182-194.
- [14] Y. Du, R. Zhang, A. Zargari, T.C. Thai, C.C. Gunderson, K.M. Moxley, H. Liu, B. Zheng, Y. Qiu, Classification of Tumor Epithelium and Stroma by Exploiting Image Features Learned by Deep Convolutional Neural Networks, *Ann Biomed Eng*, 46 (2018) 1988-1999.

- [15] M. Wu, C. Yan, H. Liu, Q. Liu, Automatic classification of ovarian cancer types from cytological images using deep convolutional neural networks, *Biosci Rep*, 38 (2018).
- [16] K. Orita, K. Sawada, R. Koyama, Y. Ikegaya, Deep learning-based quality control of cultured human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J Pharmacol Sci*, (2019).
- [17] M.S. Kavitha, T. Kurita, B.C. Ahn, Critical texture pattern feature assessment for characterizing colonies of induced pluripotent stem cells through machine learning techniques, *Comput Biol Med*, 94 (2018) 55-64.
- [18] J. Zhao, M. Zhang, Z. Zhou, J. Chu, F. Cao, Automatic detection and classification of leukocytes using convolutional neural networks, *Med Biol Eng Comput*, 55 (2017) 1287-1301.
- [19] S. Shafique, S. Tehsin, Acute Lymphoblastic Leukemia Detection and Classification of Its Subtypes Using Pretrained Deep Convolutional Neural Networks, *Technol Cancer Res Treat*, 17 (2018) 1533033818802789.
- [20] A.I. Shahin, Y. Guo, K.M. Amin, A.A. Sharawi, White blood cells identification system based on convolutional deep neural learning networks, *Comput Methods Programs Biomed*, 168 (2019) 69-80.
- [21] N. Rohaziat, M.R.M. Tomari, W.N.W. Zakaria, N. Othman, White Blood Cells Detection using YOLOv3 with CNN Feature Extraction Models, *Int. J. Adv. Comput. Sci. Appl.*, 11 (2020) 459-467.
- [22] H. Kubota, R.L. Brinster, Spermatogonial stem cells, *Biol Reprod*, 99 (2018) 52-74.
- [23] A. Coakley, T.J. Orlowski, A. Muhlbauer, L. Moy, J.J. Speiser, A comparison of imaging software and conventional cell counting in determining melanocyte density in photodamaged control sample and melanoma in situ biopsies, *J. Cutan. Pathol.*, 6.
- [24] J.S. Velazquez-Blazquez, F. Cavas-Martinez, V.A. Campuzano, J.A. del Barrio, F.J.F. Canavate, J. Alio, AUTOMATIC IMAGE PROCESSING APPLIED TO CORNEAL ENDOTHELIUM CELL COUNT AND SHAPE CHARACTERIZATION, *Dyna*, 95 (2020) 10.
- [25] O. Sarrafzadeh, H. Rabbani, A.M. Dehnavi, A. Talebi, Circlet transform in cell and tissue microscopy, *Opt. Laser Technol.*, 124 (2020) 16.
- [26] X.P. Zhong, J.J. Guo, Y.L. Deng, Pixel-Classification-Based Reticulocyte Detection in Blood-Smear Microscopy Images, *J. Med. Devices*, 13 (2019) 9.
- [27] S.J. Potter, T. DeFalco, Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function, *Reproduction*, 153 (2017) R151-r162.
- [28] A.P. Fayomi, K.E. Orwig, Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men, *Stem Cell Res*, 29 (2018) 207-214.
- [29] J. Guo, E.J. Grow, C. Yi, H. Mlcochova, G.J. Maher, C. Lindskog, P.J. Murphy, C.L. Wike, D.T. Carrell, A. Goriely, J.M. Hotaling, B.R. Cairns, Chromatin and Single-Cell RNA-Seq Profiling Reveal Dynamic Signaling and Metabolic Transitions during Human Spermatogonial Stem Cell Development, *Cell Stem Cell*, 21 (2017) 533-546.e536.
- [30] F.T. Neto, P.V. Bach, B.B. Najari, P.S. Li, M. Goldstein, Spermatogenesis in humans and its affecting factors, *Semin Cell Dev Biol*, 59 (2016) 10-26.

- [31] S. Di Persio, R. Saracino, S. Fera, B. Muciaccia, V. Esposito, C. Boitani, B.P. Berloco, F. Nudo, G. Spadetta, M. Stefanini, D.G. de Rooij, E. Vicini, Spermatogonial kinetics in humans, *Development*, 144 (2017) 3430-3439.
- [32] M.A. Tarek A. Atia, Review: Genetics of Spermatogenesis, *Scholars Journal of Applied Medical Sciences (SJAMS) Sch. J. App. Med. Sci.*, 2014; 2(3D):1171-1181 (2014).
- [33] M.D. Griswold, Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis, *Physiol Rev*, 96 (2016) 1-17.
- [34] M.D. Chen H., Xiao X., Cheng C.Y. , Human Spermatogenesis and Its Regulation, Humana Press, Cham2017.
- [35] H. Nishimura, S.W. L'Hernault, Spermatogenesis, *Curr Biol*, 27 (2017) R988-r994.
- [36] S. Kose, N. Yersal, S. Onen, P. Korkusuz, Comparison of Hematopoietic and Spermatogonial Stem Cell Niches from the Regenerative Medicine Aspect, *Adv Exp Med Biol*, 1107 (2018) 15-40.
- [37] L.R. Franca, R.A. Hess, J.M. Dufour, M.C. Hofmann, M.D. Griswold, The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity, *Andrology*, 4 (2016) 189-212.
- [38] J. Kuruvilla, D. Sukumaran, A. Sankar, S.P. Joy, A review on image processing and image segmentation, 2016 International Conference on Data Mining and Advanced Computing (SAPIENCE)Ernakulam, India, 2016, pp. pp. 198-203.
- [39] G. Kumar, P.K. Bhatia, A Detailed Review of Feature Extraction in Image Processing Systems, *IEEE*, pp. 5-12 (2014).
- [40] R.C. Gonzalez, R.E. Woods, Digital Image Processing, Pearson; 3 edition 2014.
- [41] S. Leutenegger, M. Chli, R.Y. Siegwart, Ieee, BRISK: Binary Robust Invariant Scalable Keypoints, 2011 Ieee International Conference on Computer Vision, Ieee, New York, 2011, pp. 2548-2555.
- [42] S. Russell, P. Norvig, Artificial Intelligence: A Modern Approach, Pearson Education2016.
- [43] R.C. Deo, Machine Learning in Medicine, *Circulation*, 132 (2015) 1920-1930.
- [44] Z. Sun, G. Pedretti, A. Bricalli, D. Ielmini, One-step regression and classification with cross-point resistive memory arrays, *Science Advances*, 6 (2020) eaay2378.
- [45] E.S. Sankari, D. Manimegalai, Predicting membrane protein types using various decision tree classifiers based on various modes of general PseAAC for imbalanced datasets, *J Theor Biol*, 435 (2017) 208-217.
- [46] A. Nedaie, A.A. Najafi, Support vector machine with Dirichlet feature mapping, *Neural Netw*, 98 (2018) 87-101.
- [47] R. Khemchandani, P. Saigal, S. Chandra, Improvements on nu-Twin Support Vector Machine, *Neural Netw*, 79 (2016) 97-107.
- [48] Z. Yu, H. Chen, J. Liuxs, J. You, H. Leung, G. Han, Hybrid k -Nearest Neighbor Classifier, *IEEE Trans Cybern*, 46 (2016) 1263-1275.
- [49] P. Rani, A Review of various KNN Techniques, *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, 5 (2017).
- [50] Y. Dang, N. Jiang, H. Hu, Z. Ji, W. Zhang, Image classification based on quantum K-Nearest-Neighbor algorithm, *Quantum Information Processing*, 17 (2018) 239.

- [51] L. Wang, Y. Chang, H. Wang, Z.Z. Wu, J.T. Pu, X.D. Yang, An active contour model based on local fitted images for image segmentation, *Inf. Sci.*, 418 (2017) 61-73.
- [52] Q. Cai, H.Y. Liu, S.P. Zhou, J.F. Sun, J. Li, An adaptive-scale active contour model for inhomogeneous image segmentation and bias field estimation, *Pattern Recognit.*, 82 (2018) 79-93.
- [53] S.L. Goldenberg, G. Nir, S.E. Salcudean, A new era: artificial intelligence and machine learning in prostate cancer, *Nat Rev Urol*, 16 (2019) 391-403.
- [54] J.G. Lee, S. Jun, Y.W. Cho, H. Lee, G.B. Kim, J.B. Seo, N. Kim, Deep Learning in Medical Imaging: General Overview, *Korean J Radiol*, 18 (2017) 570-584.
- [55] J. Redmon, S. Divvala, R. Girshick, A. Farhadi, *Ieee, You Only Look Once: Unified, Real-Time Object Detection*, 2016 *Ieee Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, *Ieee*, New York, 2016, pp. 779-788.
- [56] J. Du, Understanding of Object Detection Based on CNN Family and YOLO, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2018, pp. 012029.
- [57] S.N.T. Persson, White Blood Cell Differential Counting in Blood Smears via Tiny YOLO, (2018).
- [58] H.M. Ünver, E. Ayan, Skin Lesion Segmentation in Dermoscopic Images with Combination of YOLO and GrabCut Algorithm, *Diagnostics (Basel)*, 9 (2019).
- [59] A. Bochkovskiy, C.-Y. Wang, H.-Y.M. Liao, YOLOv4: Optimal Speed and Accuracy of Object Detection, *arXiv preprint arXiv:2004.10934*, (2020).
- [60] Tzutalin, *LabelImg*, 2015.
- [61] Roboflow, *Roboflow*, 2020.
- [62] H. Valli, M. Sukhwani, S.L. Dovey, K.A. Peters, J. Donohue, C.A. Castro, T. Chu, G.R. Marshall, K.E. Orwig, Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells, *Fertil Steril*, 102 (2014) 566-580.e567.
- [63] K. Gassei, K.E. Orwig, SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes, *PLoS One*, 8 (2013) e53976.
- [64] R.M. Hobbs, S. Fagoonee, A. Papa, K. Webster, F. Altruda, R. Nishinakamura, L. Chai, P.P. Pandolfi, Functional antagonism between Sall4 and Plzf defines germline progenitors, *Cell Stem Cell*, 10 (2012) 284-298.
- [65] M.A. Guevara, A. Silva, H. Oliveira, M. de Lourdes Pereira, F. Morgado, *Segmentation and Morphometry of Histological Sections Using Deformable Models: A New Tool for Evaluating Testicular Histopathology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2003, pp. 282-290.
- [66] W. Liyun, L. Hefei, Z. Fuhao, L. Zhengding, W. Zhendi, Spermatogonium image recognition using Zernike moments, *Comput Methods Programs Biomed*, 95 (2009) 10-22.
- [67] G. Bahadur, Ethics of testicular stem cell medicine, *Human Reproduction*, 19 (2004) 2702-2710.