



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**HEMATOKSİLEN-EOZİN VE FLORESAN IN SİTU HİBRİDİZASYON
İLE BOYANAN HİSTOPATOLOJİ GÖRÜNTÜLERİNİN İMGE
ÇAKIŞTIRMA YÖNTEMLERİYLE İLE EŞLEŞTİRİLMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ZAFER SÜNETCİ

HAZİRAN 2022



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**HEMATOKSİLEN-EOZİN VE FLORESAN İN SITU HİBRİDİZASYON
İLE BOYANAN HİSTOPATOLOJİ GÖRÜNTÜLERİNİN İMGE
ÇAKIŞTIRMA YÖNTEMLERİYLE İLE EŞLEŞTİRİLMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ZAFER SÜNETCİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ NURULLAH ÇALIK

HAZİRAN 2022

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.

Zafer SÜNETCİ

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığını taahhüt ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇALIK

İMZA SAYFASI

Zafer SÜNETCİ tarafından hazırlanan ‘HEMATOKSİLEN-EOZİN VE FLORESAN İN SITU HİBRİDİZASYON İLE BOYANAN HİSTOPATOLOJİ GÖRÜNTÜLERİNİN İMGE ÇAKIŞTIRMA YÖNTEMLERİYLE İLE EŞLEŞTİRİLMESİ’ başlıklı bu yüksek lisans tezi, Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇALIK

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Murat KAZANCI

İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç. Dr. Nihan KAHRAMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2022

ÖZET

HEMATOKSİLEN-EOZİN VE FLORESAN İN SITU HİBRİDİZASYON İLE BOYANAN HİSTOPATOLOJİ GÖRÜNTÜLERİNİN İMGE ÇAKIŞTIRMA YÖNTEMLERİYLE İLE EŞLEŞTİRİLMESİ

Zafer SÜNETCİ

Yüksek Lisans Tezi, NanoBilim ve NanoMühendislik Anabilim Dalı, NanoBilim ve NanoMühendislik Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇALIK

Haziran, 2022. 112 sayfa.

Günümüzün en büyük problemlerinden biri kanserdir. Bu hastalıkla mücadele için birçok farklı yöntem denenmektedir. Bu yüzden erken teşhis ve kanser seviyesinin belirlenmesi bu hastalığın seyrinde çok büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple mikro düzeyde kanserli dokuların incelenebilmesi için histopatoloji yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile birlikte, kanser hücrelerinin spesifik olarak incelenmesi mümkün olmaktadır. Ek olarak, nano seviyede incelenen hücre içi yapıların genetik ve morfolojik özellikleri ortaya çıkarılabilmektedir.

Tekil şekilde uygulanan boyama işlemleri ile patoloğların her zaman net karar vermesi mümkün olmayabilmektedir ve ekstra boyama yöntemleri uygulanabilmektedir. Aynı yerden alınan iki ayrı dokunun boyanmasıyla farklı özellikler ortaya çıkabilmektedir. İki farklı boyadan farklı sonuçlar almak yerine, bu boyaları beraber inceleyebilmek amacıyla dijital histopatolojik yöntemler üst üste getirilip eşleştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. Bu fıkirden baz alarak yapılan çalışmada, iki farklı boya ile boyanan dijital görüntülerin imge çakıştırma yöntemi ile eşleştirilmesi amaçlanmıştır.

Yapılacak çalışmada kullanılmak amacıyla, İstanbul Teknik Üniversitesi Teknokent bünyesinde faaliyet gösteren ARGENİT firması üzerinden, yüksek çözünürlüklü hematoksilin-eozin (H&E) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) görüntüleri alınmıştır. Alınan H&E görüntülerinde hematoksilin kimyasal hücre çekirdeklerini mavi-mor tonlarında, hücre içi sitoplazma kısmı eozin ile sitoplazmanın kapladığı alanı pembe tonlarında göstermektedir. FISH boyama yöntemi ise, içeriğindeki

floresan ile görüntüyü ortaya çıkarmaktadır. Burada floresan 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Floresin İzotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate, FITC) ve Texas-Red (TR) adlı üç farklı boya tipi ile kullanılmış ve farklı renklerde görüntülenmişlerdir. Bu görüntülerin eşleştirilmesi amacıyla görüntü işleme teknikleri kullanılmıştır. Öncelikle, görüntülerdeki gürültülerin ve boyanın ayarlanması için ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü (Scale-Invariant Feature Transform, SIFT), Hızlandırılmış Sağlam Özellikler (Speed Up Robust Features, SURF) ve Maksimum Kararlı Ekstrem Bölgeler (Maximally stable extremal regions, MSER) imge çıkartma teknikleri uygulanmıştır. Uygulanan üç işlem ile benzer noktalar bulunarak karşılaştırılmıştır.

İşlenen görüntülerin karşılaştırılması sonrasında elde edilen sonuçlarda, başlangıçta düzgün eşleşmediği, ancak daha sonrasında yapılan eklemeler sayesinde, FISH görüntüleri ile H&E görüntülerinin anahtar noktalarının yüksek oranda eşleştiği gözlemlenmiştir. Ancak kenar ve köşe eşleşmesi sırasında meydana gelen bazı sıkıntılar sebebiyle son görüntüde, bazı noktaların eşleşmediği görülmüştür. Sonrasında hazırlanan kodlarda seçilen alanın görüntülenmesi sağlanarak, karşılaştırma yapılması ve yapılmaması halindeki sonuçlar şekillerde gösterilmiştir ve kontrol noktalarının çakışma oranları belirtilmiştir.

Gelecekte medikal alanda ve nano boyuttaki işlemlerde kullanılmadan önce farklı dönüşüm algoritmalarının denenmesinde yarar olduğu ve gerekli araştırmaların yapılmasının gerekli olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, Nano, H&E, FISH, İmge Çakıştırma, SIFT, SURF, MSER

ABSTRACT

MATCHING OF HISTOPATHOLOGY IMAGES STAINED WITH HEMATOXYLIN-EOSIN AND FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION WITH IMAGE REGISTRATION METHODS

Zafer SÜNETCİ

Master's Thesis, Department of Nanoscience and NanoEngineering, Nanoscience and
NanoEngineering Program

Advisor: Dr. Inst. Member of Nurullah ÇALIK

June, 2022. 112 pages.

Cancer is one of the biggest problems of our time. Many different methods are being tried to combat this disease. Therefore, early diagnosis and determination of cancer level are of great importance in the course of this disease. For this reason, histopathology methods are used to examine cancerous tissues at the micro level. With these methods, it is possible to specifically examine cancer cells. In addition, genetic and morphological features of intracellular structures examined at the nano level can be revealed.

It is not always possible for the pathologists to make a clear decision with the staining processes applied individually and extra staining methods can be applied. Different features can be revealed by staining two different tissues taken from the same place. Instead of getting different results from two different stains, digital histopathological methods were started to be used by overlapping and matching in order to examine these stains together. Based on this idea, in this study, it is aimed to match digital images painted with two different dyes with the image registration method.

High resolution hematoxylin-eosin (H&E) and fluorescent in situ hybridization (FISH) images were taken from ARGENIT company operating within Istanbul Technical University Technopolis to be used in the study to be carried out. In the H&E images taken, the chemical hematoxylin shows the cell nuclei in blue-violet tones, the intracellular cytoplasm part eosin and the area covered by the cytoplasm in pink tones. The FISH staining method reveals the image with the fluorescence it contains. Here,

three different dye types named fluorescent 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Fluorescein isothiocyanate (FITC) and Texas-Red (TR) were used and displayed in different colors. Image processing techniques were used to match these images. Firstly, preprocessing was carried out to adjust the noise and paint in the images. Afterwards, Scale-Invariant Feature Transform (SIFT), Speed Up Robust Features (SURF) and Maximally Stable Extremal Regions (MSER) image registration techniques were applied. Similar points were found and compared with the three procedures applied.

In the results obtained after the comparison of the processed images, it was observed that the key points of the FISH images and the H&E images were highly matched, thanks to the additions made later. However, due to some problems during edge and corner matching, it was seen that some points did not match in the final image. Afterwards, by ensuring that the selected area is displayed in the codes which were prepared, the results in case of registering or not are shown in the figures and the registration rates of the control points are indicated.

It has been observed that it is beneficial to try different transformation algorithms before they are used in the medical field and nano-sized processes in the future and it is necessary to carry out necessary researches.

Keywords: Histopathology, Nano, H&E, FISH, Image Registration, SIFT, SURF, MSER

İÇİNDEKİLER

BİLDİRİM.....	i
İMZA SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SEMBOLLER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Literatür Özeti.....	3
1.2. Tezin Amacı.....	6
1.3. Hipotez.....	7
2. YÖNTEM.....	8
2.1. Histopatolojide Sayısal Görüntüleme ve Boyama Teknikleri.....	8
2.1.1. Konvansiyonel Histokimya.....	8
2.1.2. İmmunohistokimya.....	9
2.1.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH).....	11
2.1.4. Floresan Kullanılan Ortak Boyama Yöntemleri.....	18
2.2. Histopatolojide Sayısal Görüntü İşleme Teknikleri.....	22
2.2.1. Ön İşleme.....	26
2.2.2. İmge Çakıştırma Teknikleri.....	38
2.2.3. Yöntemlerin Tezde Kullanımı.....	47
3. SONUÇ.....	49
3.1. H&E Görüntüleri Üzerinden Algoritmaların Testi.....	50
3.2. H&E ve FISH Görüntülerinin Eşleştirilmesi.....	57
3.3. Hata Oranın Hesaplanması ve Karşılaştırması İşlemi.....	60
4. TARTIŞMA.....	70
KAYNAKÇA.....	72
EKLER.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	95

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. FISH Boyama Tipleri Ve Kullanım Amaçları (Ratan ve diğerleri, 2017)..	17
Tablo 2. Histopatoloji Görüntüleri İçin Farklı Renk Normalleştirme Yöntemleri (Roy ve diğerleri, 2018)	30
Tablo 3. Dönüşüm İşlemleri Sırasında Kullanılan Modeller (Athanasious ve diğerleri, 2017).....	41



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** H&E ve Ki67 ile boyanmış kanserli bir doku. a) H&E; b) Ki67. Kırmızı ve yeşil kareler sırasıyla, pozitif ve negatif sonuçlu hücreleri belirtmektedir (Martino ve diğerleri, 2020)..... 10
- Şekil 2.** Skuamöz hücreli karsinom tipi rahim ağzı kanseri örneğinin p16 ve Ki67 ile gösterilmesi. a) p16 proteini; b) Ki67 (Shi ve diğerleri, 2019) 11
- Şekil 3.** Elde edilen kromozomdaki 84F bandına eşlenen arjinin ve asparajin proteinlerinin taşıyıcı-RNA'larını kodlayan 18 kilobaz çifti boyutunda bir parça ile hibridizasyon işlemi sonrası elde edilen floresan sinyali (Langer-Safer ve diğerleri, 1982)..... 12
- Şekil 4.** Bir nükleik asit hedefi ile hibridizasyon veya nükleik asit olmayan bir hedef ile benzeşme (affinity) etkileşimleri, bir nükleik asit bazlı floresan probun floresan özelliklerinde değişiklikler oluşturur (Juskowiak, 2011)..... 15
- Şekil 5.** Çeşitli fiksatif kimyasallarla sabitlenen ve farklı boyutta DNA problemleri ile hibridize edilen Visna virüsü ile enfekte koyun koroid pleksus hücrelerinin kopyalanmış sitosantrifüj preparasyonu (küçük prob 70 baz, orta prob 140 baz ve uzun prob 350 baz) (Moench ve diğerleri, 1985)..... 16
- Şekil 6.** Normal ve iltihaplı kolon mukozasının DAPI, FITC ve TR ile çok renkli immünofloresan boyanması (Bataille ve diğerleri, 2006)..... 18
- Şekil 7.** DAPI boyasının kimyasal yapısı (Manzini ve diğerleri, 1985) 19
- Şekil 8.** (a) FITC boyasının kimyasal yapısı (Butcher ve Weissman, 1980) (b) TR boyasının kimyasal yapısı (Titus ve diğerleri, 1982) 21
- Şekil 9.** İHK VE FISH kullanılarak Formalinle-Sabitlenmiş Parafine-Gömülü (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) doku parçalarının kesit alma, boyanma ve taranma işlem şeması (Frankenstein ve diğerleri, 2021). 23
- Şekil 10.** Çinko formalin ile sabitlenmiş dokularda x60 yakınlştırılarak boyanması ve sırasıyla 12, 24 ve 48 saat sonrası sonuçlar. Satır.1) H&E; Satır.2) FISH (Babic ve diğerleri, 2010)..... 25
- Şekil 11.** Görüntü işlemede temel basamaklar (Suat TORAMAN, 2010)..... 27
- Şekil 12.** Gri alan bit derinliği derecelerinin karşılaştırması (Lambert ve Waters, 2014) 28
- Şekil 13.** H&E boyasının uygulanan görüntünün Gauss gürültüsü sonrası işlenmesi; a) Orijinal renkli görüntü, b) Kontrast geliştirmesi ve gürültü gidermesi, c) Multiple thresholding (Çoklu eşik belirleme) (L. Zhang ve diğerleri, 2014) 33
- Şekil 14.** Ön işlem uygulanmış bir FISH hücresi; (a) Muhtemel bir FISH hücresi; (b) Kontrast ölçeklendirmesi ve Gauss filtresi ile ön işlem yapılmış hücre ; (c) Ayarlanabilir eşik belirleme ve bölütleme uygulanmış FISH hücresi; (d) Bölütleme uygulanmış FISH sinyalleri (X. Wang ve diğerleri, 2012). 37

Şekil 15. Beynin transversal görüntüsüne farklı kontrastlarda İÇ uygulanması ; (a) İÇ öncesi (b) İÇ sonrası (Denis De Senneville ve diğerleri, 2016).....	39
Şekil 16. H&E lekeli imgenin referans bölümü görüntüleri ile İÇ yöntemi kullanılarak düzeltilmiş görüntüler ; (A) Ana görüntü; (B) ve (C) ve farklı yöntemlerle elde edilmiş doku örnekleri; (D) Çakıştırma için tek renk haline getirilmiş görüntüler; (E) Temel görüntü baz alınarak, hatayı en aza indirmek amacıyla İÇ ile döndürülmüş görüntü ; (F) Benzer şekilde ancak farklı bir açıyla ana görüntü baz alınarak, hatayı ortadan kaldırma amacıyla İÇ ile döndürülmüş görüntü (Metzger ve diğerleri, 2012)	40
Şekil 17. H&E uygulanmış bir dokunun SURF ve SIFT algoritmaları uygulanmış halleri (a) SURF ; (b) SIFT (C. W. Wang ve diğerleri, 2014)	42
Şekil 18. Yoğunluk tabanlı otomatik imge çakıştırma yöntemi algoritması (“Intensity-Based Automatic Image Registration - MATLAB & Simulink”, https://www.mathworks.com/help/images/intensity-based-automatic-image-registration.html)	47
Şekil 19. 2854x2891 çözünürlüğünde, sırasıyla H&E ve FISH görüntüleri.....	49
Şekil 20. Dört ayrı H&E görüntüsü üzerinde yapılan görüntü dönüşümleri (detayları yanında açıklanmıştır)	51
Şekil 21. 1 Numaralı görselin algoritmalar ile testi	53
Şekil 22. 2 Numaralı görselin algoritmalar ile testi	54
Şekil 23. 3 Numaralı görselin algoritmalar ile testi	55
Şekil 24. 4 Numaralı görselin algoritmalar ile testi	56
Şekil 25. H&E sabit görüntüsü ve FISH görüntüsü algoritmalar ile denenmesi	58
Şekil 26. H&E sabit görüntüsü ve FISH görüntüsü eklenmiş algoritmalar ile uygulanması	59
Şekil 27. Oluşturulmuş örnek veri seti.....	60
Şekil 28. Birinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 21.32, 22.62, 18.90.....	61
Şekil 29. İkinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 7.81, 18.31, 9.73	62
Şekil 30. Üçüncü veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 133.45, 134.58, 131.76.....	63
Şekil 31. Dördüncü veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 45.75, 64.28, 186.48.....	64
Şekil 32. Beşinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 36.82, 34.05, 32.37	64
Şekil 33. 4712x7537 çözünürlüğünde sırasıyla H&E görüntüsü, sabit FISH görüntüsü ve 5° döndürülmüş hali.....	66

Şekil 34. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinden istenen noktaların benzer boyutlarda boyanmış görüntünün ortasından kesilmesi ve karşılaştırma.....	66
Şekil 35. Çakıştırma olmadan ve çakıştırma işlemi sonrası yapılan karşılaştırma	67
Şekil 36. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinin boyasının uç noktasından alınan ve dairesel hatlara sahip görüntüler.....	67
Şekil 37. Şekil 36'dan alınan görüntülerin sırasıyla eşleşme öncesi ve sonrası durumu	68
Şekil 38. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinin alındığı çıkıntı içeren kenar görüntüsü	68
Şekil 39. Şekil 38'dan alınan görüntülerin sırasıyla eşleşme öncesi ve sonrası durumu	69
Şekil 40. Sırasıyla Şekil 35 (üstte) ve Şekil 37'nin (altta) gri alan SIFT (sağda) eşleşme görüntüleri	69

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

H&E : Hematoksilin-eozin

FISH : Floresan In Situ Hibridizasyon

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol

FITC : Fluorescein isothiocyanate (Floresin İzotiyosiyanat)

TR : Texas RED

SIFT : Scale Invariant Feature Transform (Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü)

SURF : Speeded Up Robust Features (Hızlandırılmış Kararlı Özellikler)

MSER : Maximally Stable Extremal Regions (Maksimum Kararlı Ekstrem Bölgeler)

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

RNA : Ribonükleik Asit

COVID-19 : Corona Virus Disease 2019 (Korona Virüs Hastalığı-2019)

İHK : İmmünohistokimya

ISH : In situ hibridizasyon

AI : Artificial Intelligence (Yapay Zeka)

CNN : Convolutional Neural Network (Evrişimli Sinir Ağları)

cGANs: Conditional generative adversarial neural networks (Koşullu üretken çekişmeli sinir ağları)

nanoSIMS : Nanoscale Secondary İon Mass Spectrometry (Nano ölçekli ikincil iyon kütle spektrometrisi)

mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit

MKI67: Proliferasyon Marker (Çoğalma İşaretleyicisi) Ki-67

CDKN: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (Hücre döngüsüne bağlı protein kinaz inhibitörü)

ssDNA : Tek iplikli DNA

dsDNA : Çift iplikli DNA

ssRNA : Tek iplikli RNA

dsRNA : Çift iplikli RNA

rRNA : Ribozomal RNA

ACM-FISH : Alpha (1cen), classical (klasik) (1q12) ve midi (1p36.3) kromozom 1 uyduları ile FISH

CARD-FISH : Catalyzed reporter deposition FISH (Katalize edilmiş iletilici birikimi ile FISH)

CAT-FISH : Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH (FISH ile temporal aktivitenin hücresel bölünme analizi)

CO-FISH : Chromosome Orientation (Kromozom yönlendirmeli) FISH

CB-FISH : Cytochalasin (Sitokalazin) B FISH

COD-FISH : Chromosome Orientation and Direction (Kromozom yönlendirmeli ve yönetimli) FISH

D-FISH : Double Fusion (Çift Kaynaşmalı) FISH

DBD-FISH : DNA Breakage Detection (DNA parçalanma tespiti) FISH

M-FISH : Multiplex (Çoklu katmanlı) FISH

ML-FISH : Multilocus FISH

PCC-FISH : Premature Chromosome Condensation (Erken Kromozom Yoğunlaşması) FISH

Q-FISH : Quantitative (Sayısal) FISH

QD-FISH : Quantum Dots (Kuantum noktalar) FISH

RING-FISH: Recognition of Individual Genes (Bireysel Genlerin Tanınması) FISH

T-FISH : Tissue (Doku) FISH

WSI : Whole Slide Imaging (Tüm Slayt Görüntüsü)

FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (Formalinle-Sabitlenmiş Parafine-

Gömülü)

GB : Gigabayt

JPEG : Joint Photographic Experts Group (Birleşik Fotoğraf Uzmanları Grubu)

PNG : Portable Network Graphics (Taşınabilir Ağ Grafiği)

TIFF : Tagged Image File Format (Etiketlenmiş Görüntü Dosyası Formatı)

PS3® : PlayStation®3

RGB : Red – Green – Blue (Kırmızı – Yeşil - Mavi)

Lab : $l^*a^*b^*$

OD : Optical Density (Optik Yoğunluk)

S : Boya Renk Matrisi

ICA : Independent Component Analysis (Bağımsız Bileşen Analizi)

NMF : Non-negative Matrix Factorization (Negatif Olmayan Matrisi Çarpanlarına Ayırma)

C: Boya Derinlik Matrisi

JADE : Joint Approximate Diagonalization of Eigenmetrics (Matriste Özdeğerlerinin Ortak Yaklaşım Köşegenleştirilmesi)

SCD : Stain Color Descriptor (Boya Renk Tanımlanması)

CIE : Commission internationale de l'éclairage (Uluslararası Aydınlatma Komisyonu)

İÇ : İmge Çakıştırma

MR : Manyetik Rezonans

BT : Bilgisayarlı Tomografi

DoG : Difference of Gaussian (Gauss'un Farkı)

LoG : Laplacian of Gaussian (Gaussyen'in Laplasyen)

GUI : Graphical User Interface (Grafiksel Kullanıcı Arayüzü)

RMSE : Root Mean Square Error (Ortalama Karekök Sapması)

1. GİRİŞ

Geçmişten bugüne, tüm canlıların varoluşundan itibaren, her tür canlıya özgü hastalıklar türemiştir. Tüm bu hastalıklara karşı, canlılar da kendi bağışıklık sistemleri ile gerekli cevapları vermiştir. Ancak bazen bağışıklık sistemleri çözümsüz kalmış ve bu hastalığa maruz kalan canlılar hayatlarını kaybetmiştir. İnsanlık kendisini diğer canlılardan ayıran zekâsını kullanarak bulduğu çözümler bu durumu kolaylaştırmıştır.

İnsanlığın başından birçok farklı hastalık tipi geçmiştir. Bazılarının tedavisi bulunmuş, bazıları ise kendileri yok olmuştur. O zamanki Avrupa nüfusunun üçte birini yok eden ve tarihin bilinen en büyük salgınlardan biri olarak bilinen veba, alınan bir dizi temizlik önlemleriyle yok olmuş ve daha sonra yakın zamanda ise teknolojinin gelişmesiyle birlikte tedavisi bulunmuştur (Gage ve Kosoy, 2005). Yakın zamanlarda meydana gelen büyük salgınlardan bir diğeri de İspanyol Gribi hastalığıdır. Birinci Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru ortaya çıkan (ki birçok iddiaya göre savaşın bitme sebebi olan) hastalık, hızlı yayılmasıyla 50 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur (Trilla, Trilla ve Daer, 2008). Sonunda ise hastalığa sebep olan virüsün mutasyon geçirip kendiliğinden zayıflamasıyla etkisini yitirmiştir. Günümüzden de örnek vermek gerekirse, bir seneden uzun süredir uğraşılan Korona Virüs Hastalığı 2019 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19) salgını, başladığından beri yaklaşık milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine sebep olmuştur ve gerekli aşılama ile artık sonuna gelinmiştir.

Mikrobiyal sebeplerle ortaya çıkan birçok hastalığın tedavisi her ne kadar çok can almış olsa da, sonrasında tedavileri bulunmuş ve sona erdirilmiştir. Ancak insanın kendi vücudunun ortaya çıkardığı rahatsızlıklar için henüz net bir tedavi geliştirilememiştir. Bu hastalıkların en başında ise kanser gelmektedir. Kanser, vücudumuzda bulunan herhangi bir organı veya dokuyu oluşturan hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalması olayıdır. Hücrenin bu şekilde düzensiz çoğalabilmesi için, hücre içerisinde bulunan nano-boyuttaki DNA zincirinin hasar alması gerekmektedir (Foulds, 1958). Hasar alan DNA'nın, kanserli hücrelerde kendi kendini onaramaması sonucu da süreç başlamaktadır. Bu hasara sebep olabilecek birçok farklı fiziksel, kimyasal veya biyolojik etmenlerle gün içerisinde bilerek veya bilmeyerek

karşılaşılabilmektedir.

Hücre tüm canlıları oluşturan yapı taşıdır ve normal bir yaşam döngüsünde kendi kendilerini yenileyebilmekte ve çoğalabilmektedir. Ancak her hücrenin belirli bir bölünme sınırı bulunmaktadır (Hayflick ve Moorhead, 1961). Sağlıklı bir hücre bu sınıra ulaştığında kendi kendini yok etmektedir. Ancak her hücre bu sınıra geldiğinde durmamakta ve bu sınırı aşabilmektedir. İşte bu sınır aşıldığında, hücre kontrolsüzce çoğalmakta ve büyük bir hücre kitlesi(tümör) ortaya çıkarak kanseri oluşturmaktadır.

Uzun süredir karşısına çıkan tüm hastalıklarla savaşıp (bazılarında büyük kayıplar verse dahi) sonunda zaferle çıkan insanlık, geçen yüzyılda ortaya çıkan ve farklı türleri olan bir hastalığa, diğer adıyla kansere, hala net ve kesin bir çözüm bulamamıştır. Bu sebepten, hastalığın erken döneminde erken tanı koymanın önemi artmaktadır. Çünkü erken tanı sayesinde, hastalık daha fazla ilerlemeden durdurabilmekte veya erken dönemde tedavi edilebilmektedir. Bu hastalığa tanı konulabilmesi için kullanılan birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin kullanıldığı alana patoloji denmektedir. Bu yöntemde hastadan farklı yöntemlerle alınan parçalar incelenmektedir. Ancak patoloji sadece kanser için değil, birçok farklı alanda tanı koymak için kullanılmaktadır. Bu yüzden de tıp dünyasında önemli bir yeri bulunmaktadır.

Patoloji içinde kullanılan farklı yöntemlerle birlikte farklı isimler almıştır. Histopatoloji bu yöntemler arasında şu anda kullanılmakta olan en yaygın patoloji metotlarından biridir. Bu metot sayesinde üzerinde hasar olduğu bilinen farklı doku veya hücre örnekleri üzerinde kullanılan farklı boyama yöntemleri ile tanı koyulabilmektedir. Özellikle kanserli hücrelerin tespiti için kullanılan bu yöntem, daha net sonuçlar verebildiği için birçok farklı alanda da kullanılmaya başlamıştır. Histopatoloji kullanılan birçok farklı teknikler ile kendi içerisinde de, konvansiyonel histokimya ve immunohistokimya (İHK) gibi farklı alanlara ayrılmaktadır. Konvansiyonel histokimya, histopatoloji içerisinde en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem içerisinde birçok farklı teknik yer alsa da H&E boyama, en önemli tekniği olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntemde hücre içerisindeki sitoplazma ve çekirdeği ayrı olarak farklı renklerde görmek amaçlanmaktadır(Chan, 2014). İHK yönteminde ise adından da anlaşılacağı gibi vücudun kendi immün (bağışıklık)

sisteminin verdiği tepkilerin kullanıldığı yöntemlerdir. İçerisinde Ki67 ve p16 gibi hücre çoğalmasında yer alan antijenler kullanılarak, antijen-antikor eşleşmesi tekniği ile boyama yapılmaktadır (Ramos-Vara ve Miller, 2014). Ayrıca bu yöntemin içerisinde, genetik materyallerin de kullanılmasıyla FISH tekniği ortaya çıkmıştır. Bu teknikte canlı doku örneği üzerinde floresan boyama teknikleri kullanılarak DNA veya RNA parçacıkları boyanmakta ve sonuç alınmaktadır.

Histopatoloji veya genel anlamda patoloji kullanılarak tanı koyulabilmesi için, hastalığın bulunduğu dokudan örnek alınarak bir uzman tarafından inceleme yapılması gereklidir. Bu inceleme işlemleri patologlar tarafından yapılarak tanı koyulmaktadır. Ancak gelişen teknoloji sayesinde ve insan hatasının sifıra indirgenebilmesi istemiyle, bu işlemler için farklı yapay zekâ (Artificial Intelligence, AI) teknikleri ortaya çıkmıştır (Niazi, Parwani ve Gurcan, 2019). Kullanılan bu farklı AI teknikleri sayesinde dijital histopatoloji alanı ortaya çıkarmıştır. AI alanında kullanılan birçok teknik dijital histopatoloji alanına dâhil edilerek bu alanda kullanılır hale getirilmiştir ve erken tanı koyma, tedavi sürecini takip etme veya tedavi yöntemi geliştirme gibi farklı alanlarda patologların yardımcısı olmuştur. Bu sayede de, teknik tanı sürecinde kritik bir rol oynamaktadır.

1.1. Literatür Özeti

Histopatolojinin tarihte yapılan ilk uygulaması 1887 yılında Rudolf Virchow tarafından, gırtlak kanseri olan Alman İmparatoru 3. Wilhelm'e uygulanmıştır. Uygulanan biyopsiden alınan ilk üç parça, “pachydermia verrucosa laryngis” veya iyi huylu lezyon olarak teşhis edilmiştir. Ancak sonrasında hastanın ölümüne yakın zamanda, öksürük sırasında kopan son parça incelenmiş ve kanser olarak tespit edilmiştir. Bu incelemeler mikroskopla yapılan ilk histopatolojik uygulama olarak adlandırılmaktadır (Cardesa ve diğerleri, 2011).

(Awan ve Rajpoot, 2018) alışmasında, sabit ve hareketli görüntülerin sahip olduğu benzerlik noktalarının değerlendirilmesi sırasında Evrişimli Sinir Ağları (Convolutional Neural Network, CNN) derin öğrenme yöntemiyle otomatik kodlayıcılar kullanılarak histoloji görüntülerinin çakıştırılması sağlanmaktadır. Sonuç olarak yoğunluk bazlı çakıştırma işlemlerinde doğruluk oranı yüksek çıkartılmış ve parça parça alınan tüm görüntünün otomatik kodlayıcılar sayesinde hesaplama

süresinde ciddi bir zaman kazancı olduğu gözlemlenmiştir.

Rohé vd. yaptığı yayında, CNN tabanlı yeni bir eğitilmiş derin öğrenme yöntemi geliştirilerek görüntü çakıştırma işlemlerinde meydana gelen sadece belli bir noktadaki yerel noktalara bakmak yerine, küresel özelliklerine de odaklanarak kayan pencere çözümü ile farklı bir çözüm geliştirilmiştir. Bu şekilde yapılan işlemlerde daha hızlı sonuç alınmaktadır ve bu işlemler üç boyutlu görüntülerin işleminde de çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Rohé, Datar, Heimann, Sermesant ve Pennec, 2017).

Haring vd. tarafından yapılan, nano ve görüntü çakıştırma ilişkili araştırmada, elektron mikroskobu ve floresan mikroskobu görüntülerinin, katodoluminesans işaretçileri ile yüksek doğruluk oranında (yani 5 nanometrenin altında) ışık veya elektron görüntü bindirmesi yapılarak çakıştırılmasıdır. Bu işlem sonucunda, görüntü bozulmalarının düzeltilmesi, referans işaretlerinin yerleştirilmesine gerek kalmadığı ve moleküler düzeyde görüntü ilişkilendirilmesi yapılabildiği gözlemlenmiştir (Haring ve diğerleri, 2017).

(Chang ve diğerleri, 2017) araştırmasında, pankreas kanseri içeren hücreler ile normal hücreleri H&E ve immüno floresan boya yöntemleri ile derin öğrenme tabanlı çekirdek sınıflandırma yöntemi kullanılarak bir veri seti oluşturulmakta ve eğitilmektedir. Bu yöntem sonucunda, histolojik değerlendirme geliştirilerek DNA veya RNA tabanlı ve patolojik araştırmalar ile yapılan tümör tahminleri arasındaki sonuç karmaşasını düzeltilebilmektedir.

Çetin vd. tarafından yapılan histopatoloji görüntülerinin incelenmesini içeren yakın zamanlı araştırmada, bölgesel afin dönüşümü ve katı olmayan dönüşüm ile denetimsiz (unsupervised) derin öğrenmede çoklu büyütme yapısı kullanılmıştır. Derin öğrenme yöntemi ile veri setleri eğitilmiş ve karşılaştırılması yapılarak çakıştırılmıştır. Bu araştırma sayesinde, doku içerisindeki ayrıntılar daha rahat hizalanmış ve hücre çekirdeği içerisindeki görüntü kaymalarını tespit edebilmiştir (Cetin ve diğerleri, 2022).

H&E boyasının farklı boyalara dönüşümü açıklayan (de Haan ve diğerleri, 2021) tarafından yakın zamanda yapılan araştırmada, farklı hastalardan alınan örneklerle incelenen neoplastik olmayan bir böbrek rahatsızlığı, H&E ve farklı boya tipleri (Masson's Trichrome, periyodik asit-Schiff ve Jones gümüş boyası) ile patologlar

tarafından boyandıktan sonra denetimli bir derin öğrenme tekniği (CycleGan) kullanılarak dönüştürülmüştür. Çıkan sonuçlarda, karşılaştırılan görüntülerin ve kullanılan farklı boyaların, boya dönüşümünün hızlıca yapılması ile birlikte patologların beklemeden, farklı doku bileşenlerinin görüntülenmesini ve bu sayede çoklu böbrek rahatsızlıklarının teşhisini kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir.

Tümör teşhisi için H&E boyasında derin öğrenmenin kullanımının Rana vd, tarafından incelendiği çalışmada, prostat kanseri tespiti amacıyla boyanmamış biyopsi parçaları ve H&E ile boyanan çekirdek biyopsi görüntüleri, koşullu üretken çekişmeli sinir ağları (Conditional generative adversarial neural networks, cGANs) derin öğrenme yöntemi ile eğitilmiştir. Sonrasında boyanmamış parçalar sanal ortamda boyanarak karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada varılan sonuç, yapay şekilde boyanmış görüntüler ile H&E boya lekeli görüntülerine yüksek benzerlik oranı göstermiştir (Rana ve diğerleri, 2020).

(Akila, Samarabandu, Knoll, Khan ve Rogan, 2010) çalışması ile FISH probunun hücre içerisindeki yerinin tespitinin ortaya koyulması amaçlanan çalışmada, DAPI boyalı kromozom görüntüleri ve karyotip analizi için Geimsa boyalı görüntüler karşılıklı olarak kullanılmıştır. FISH probleminin kromozom analizinde merkez dizilimin doğru bir şekilde ayarlanması için Gradyan Vektör Akışı (Gradient Vector Flow) aktif hattı ile Ayrık Eğri Gelişimi (Discrete Curve Evolution) bazlı iskelet kısaltılması (skeleton pruning) ve morfolojik inceltme adlı iki yöntem birlikte kullanılarak hibrit bir algoritma elde edilmiştir. Sonuç olarak, kromozomların merkezdeki yerine göre başarılı bir şekilde saptama ve düzenleme yapıldığı gözlemlenmiştir.

Boyama işlemlerini farklı teknikler ile geliştirmek amacıyla He vd. tarafından yakın zamanda yapılan çalışmada, CNN tabanlı altı farklı derin öğrenme algoritması uygulanarak, FISH ve Nano Ölçekli İkincil İyon Kütle Spektrometrisi (Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry, nanoSIMS) boyalarının birlikte incelenmesi amaçlayan görüntü karşılaştırma işlemi yapılmıştır. Sonucunda, özellik tabanlı katı olmayan ince plaka şerit (thin-plate spline) yöntemi, eski özellik tabanlı görüntü karşılaştırma işlemlerinden daha iyi performans göstermiştir (He, Meile ve Bhandarkar, 2022).

Beyin ve omurgada oluşabilecek tümörleri için medikal görüntüleme ve derin öğrenme kullanılan ve yakın zamanda yapılan (Akkus ve diğerleri, 2016) çalışmasında, cerrahi işlem gerektirmeden çoklu ölçekli CNN derin öğrenme yöntemleri kullanılarak, düşük dereceli gliomların 1p/19q kromozom kollarının durumlarının anlaşılması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlarda, beynin T1 ve T2 görüntülerine bakılarak, kromozomların durumlarının yüksek oranda doğruluk sağladığı gözlemlenmiştir.

1.2. Tezin Amacı

Kanser günümüzün en önemli hastalıklarından biridir. Bu hastalığın çözüme kavuşabilmesi için birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Ancak hastalığın şu an için farklı şekillerde çözümü olsa dahi, büyük çoğunlukla net bir çözümü bulunmamaktadır. Bu sebepten ötürü, hastalıkta erken teşhis önem kazanmaktadır. Burada da, hastalığın hücre seviyesinde mikro incelemeler yapılabilmesi için, histopatolojik biyokimyasal boyalar kullanılmaktadır. Ayrıca nano seviyede, floresan kaynaklı boyama teknikleriyle beraber de gözlemlenebilmektedir.

Farklı patolojik tekniklerle alınan ve parça parça görüntülenen doku kesitleri, farklı boyalar ile birlikte değişik renkler ortaya çıkarmaktadır. H&E örneğinde, çekirdeğe odaklanan bir yapı sebebiyle sitoplazma pembemsi hücre çekirdeği ise mavi-mor aralıklı bir yapıya sahip görüntülenmektedir. FISH görüntüsünde ise bu durum, kullanılan floresanın da etkisiyle birlikte boyayı tutan hücreler mavimsi, arka planı ise siyah görünmektedir ve burada genetik kodların mikro seviyede incelenmesi amaçlanmaktadır. Farklı işlemlerin arka arkaya beraber incelenebilmesi patologlar açısından birçok zorluk içermektedir. Her iki bölgenin de çakıştırılmış şekilde arka arkaya incelenebilmesi, ancak dijital histopatoloji yöntemleri ile mümkündür.

Dijital histopatoloji ile birlikte, işlemler bilgisayar üzerinden sayısal işlemler ile birlikte görüntülenebilmektedir. Bu yöntemler ile yapılan bilgisayar destekli görüntülemeler ve iyileştirmeler sayesinde hastalıklara tanı koyulmasına ve tedavi yönteminin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Buradan hareketle, yüksek çözünürlüklü ile birlikte alınan mikro boyuttaki hücresel görüntüler üzerinde kullanılan algoritmalar sayesinde imge çakıştırma işlemlerinin yapılması ve bu sayede patologların ilgi alanını tespit etme sürelerinin azaltılması amaçlanmaktadır. Doktorlar da bu sayede, tedavi yöntemlerinin belirlenebilmesi amacıyla daha objektif kararlar

alabileceklerdir. Ek olarak, nano boyuttaki nesnelerin bu algoritmalar sayesinde incelenebilmesi kolaylaşması öngörülmektedir.

1.3. Hipotez

Hastalardan alınan H&E ve FISH boyama yöntemlerini içeren farklı doku örnekleri parça parça alınmaktadır. Sonrasında bu görüntüler dijital inceleme yapılabilmesi için bilgisayara aktarılmaktadır. Elde edilmiş bu görüntüler, MATLAB® üzerinden teker teker incelenmektedir.

Üzerinde çalışma yapılabilmesi amacıyla alınan İstanbul Teknik Üniversitesi bünyesinde faaliyet gösteren ARGENİT firmasından temin edilen yüksek çözünürlüklü (örn. 4700x7500) H&E ve FISH görüntüsü üzerinden oluşturulmuş veri seti kullanılmaktadır. Bu görüntülerin sahip olduğu büyüklük her ne kadar bazı kolaylıklar içerse de, incelenmesi bakımından çok zor bir işlemdir. Özellikle bir dokunun H&E üzerinden incelenmesi istenen bir alanının, FISH yöntemindeki karşılığının bulunması hem oldukça zor, hem de zaman kaybı olmaktadır. Ancak bu işlemler, dijital ortamda imge çakıştırma yöntemleriyle hızlıca yapılmaktadır. Bu sayede ve patologların daha işlem yapabilmesi ve doktorların daha hızlı tedavi yöntemi belirlemesi mümkün olmaktadır.

Bu aşamada, belirlenmiş imge çakıştırma yöntemleri içerisinde yoğun olarak kullanılan yöntemler ise Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü (Scale Invariant Feature Transform, SIFT) ve Hızlandırılmış Kararlı Özellikler (Speeded Up Robust Features, SURF) işlemleridir (Tareen ve Saleem, 2018). Bu algoritmalar ile iki farklı görüntünün anahtar noktaları bulunarak, iki imgenin kesişme noktaları ayarlanmaktadır. Bu noktalar görüntü içerisindeki afin noktasını bularak, dönüşüm matrisi ile dönme (rotation), öteleme (translation) ve kayma işlemi (shearing) gibi sorunlar çözülebilmesini sağlamaktadır.

Tez kapsamında H&E görüntüsü referans alınarak, FISH görüntüsü ile imge çakıştırma yöntemleri ile sorgulanacaktır. Özellikle kenar bölgelerinin içerdiği teknik sıkıntılar sebebiyle, belirlenmesi gereken ana matrisler bu kısımlardan elde edilmeye çalışılacaktır.

2. YÖNTEM

Histopatoloji dokuların, organların ve hücrelerin üzerinde gerçekleşen bazı değişikliklerin tespiti için kullanılan mikroskopik yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, hastalıkların kesin teşhisi sağlanmaktadır. Bu yöntemlerde, öncelikle hastadan doku alınmakta ve incelenebilmesi için farklı parçalara bölünmektedir. Diğer aşamada alınan doku parçaları farklı kimyasal boyalar ile boyanıp incelenmektedir. Başlıca kullanılan üç temel yöntem şunlardır: konvansiyonel histokimya, immunohistokimya ve moleküler histokimya.

2.1. Histopatolojide Sayısal Görüntüleme ve Boyama Teknikleri

2.1.1. Konvansiyonel Histokimya

Konvansiyonel histokimya yöntemi dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyama yönteminde kullanılan en önemli teknik ise H&E boyama yöntemidir. Bu yöntemle yapılan boyamada, hematoksilin sahip olduğu hücre çekirdeklerini mavi-mor tonlarına, eozin ise sitoplazmayı veya hücre çekirdeği dışındaki alanı pembe tonlarına boyamaktadır (Zhao ve diğerleri, 2020). Bu boyama yönteminde yalnızca hücrelerin, dokuların ve doku bloklarının şekilleri gibi temel morfolojik bilgiler incelenmektedir. Hücre içerisinde bulunan farklı materyallerin konumu da farklı sonuçların elde edilmesinde önemli yer tutmaktadır. Hücre çoğalmasında yer alan kromatinlerden olan heterokromatinin, hematoksilin boyasının yaptığı etkiyle farklı örneklerde meydana getirdiği birikme oranıyla farklı kanser tiplerini ortaya çıkarabilmektedir. Ek olarak protein sentezi yapıldığı sırada mesajcı RNA (mRNA) ile birden çok ribozomun bağlanarak bir araya getirdiği poliribozomun (polizom) fazla olduğu durumlarda sitoplazmayı sanılanın aksine mavi renge dönüştürebilmektedir (Fischer, ve diğerleri, 2008).

H&E, boyama işleminin kolaylığı ve sadeliği, düşük maliyeti, çok teknik bilgi gerektirmemesi, birçok farklı yöntem ile birlikte kullanılabilmesi ve kanser gibi önemli bir hastalığın tespitinde getirdiği kolaylıklar sayesinde hala birincil tanı tespit tekniği olarak kullanılmaktadır (Nacar ve Nacar, 2017). Tüm bu kolaylıklara rağmen H&E, boyanmış parçalarda daha küçük olan antijen (protein) içeren moleküler bilgiler

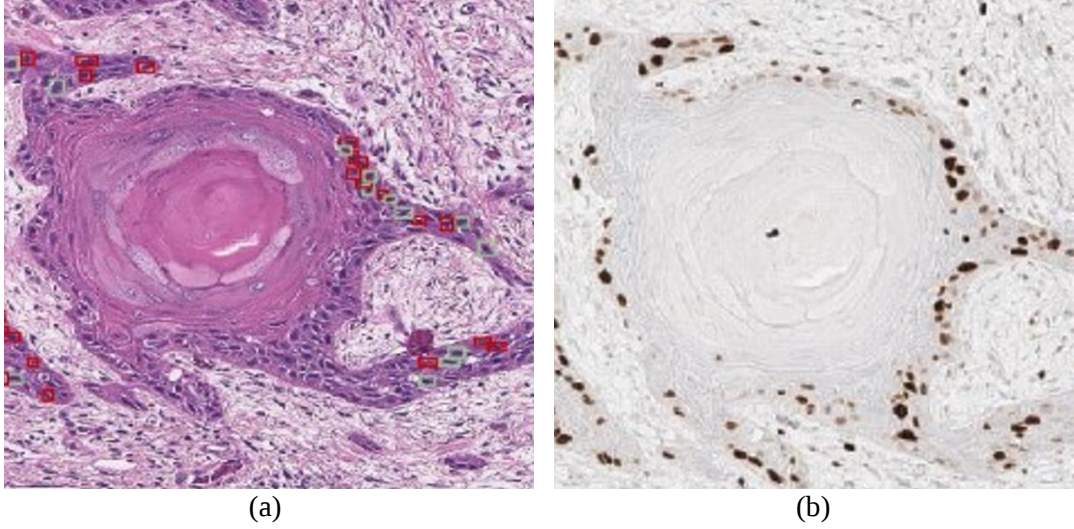
gözlemcilerin, algoritmaları analiz etmesini ve değerlendirmesini zorlaştırır. Bunun sebeple, parçalardan moleküler bilgi elde etmek için, klinik uygulamalarda genellikle İHK boyama yöntemleri kullanılmaktadır.

2.1.2. İmmunohistokimya

İmmunohistokimya, bağışıklık sisteminin tepkileri sonucunda ortaya çıkan ürünleri inceleyen boyama yöntemidir. Bağışıklık sistemi vücuda giren antijenlere karşı antikor üretmektedir. Organizmada yabancı olarak algılanan antijenlerin dokulardaki yerleşimi, bu antijenlere bağlanan antikorların yardımıyla saptanmaktadır. Antikorlar antijenlere bağlandıklarında bağışıklık için bazı kompleksler oluşturmaktadırlar (Montero, 2003). Burada devreye, bu antijenler için antikor olarak kullanılan boyalar (p16, Ki67 vb.) devreye girmektedir. Bu boya tipleri sonuçları görüntülemek için daha sonra patologlar tarafından özel mikroskoplarla incelenmektedir.

Ki67 veya MKI67 (Proliferasyon Marker Ki-67) proteini özellikle tanı için seçilen bir boyama türü olup, özellikle bazı kanser türlerinde aşırı çoğalan kötü huylu kanser hücrelerini tanımada kullanılmaktadır. Ayrıca bu protein, bazen çoğalmanın iyi bir göstergesi olarak kabul edilen ve doktorların kanser hastalarının sonucunu tahminini veya hastalarının iyileşme şansını belirlemelerine yardımcı olan bir kanser antijenidir (Ben-Izhak ve diğerleri, 2002).

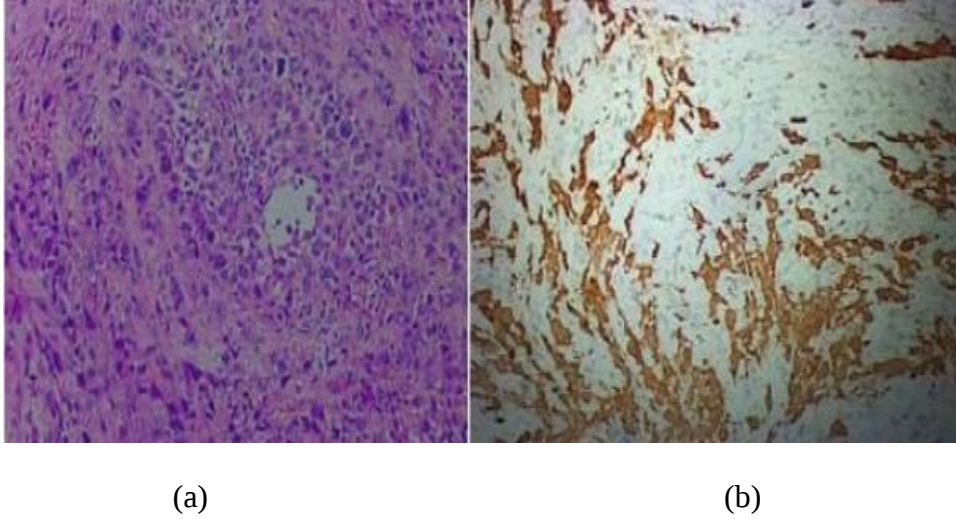
İHK'de Ki67 ile yapılan boyamalarda, çıkan sonucun proliferatif (çoğalma) fraksiyonu gösterdiği görülmüş ve bu sayede H&E ile birlikte Şekil 1'de sunularak gösterildiği gibi birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, böbrek ve prostat kanseri) yüksek Ki67 oranı, pozitif tanı koyma faktörü olarak gösterilmiştir (Martino ve diğerleri, 2020). Çünkü Ki67 antijeninin ilk olarak interfaz evresinde sadece çekirdek içerisinde durağan şekilde görülmesiyle birlikte, hücre çoğalması sırasında aktif hücre bölünmesinin yapıldığı fazlarda (G_1 , S, G_2 ve mitoz) ortaya çıkması ve hücre bölünmesinin olmadığı toparlanma aşamasında (G_0) bulunmaması, onu net görünür bir işaretleyici olarak kullanılmasında önemli bir antijen olarak öne çıkarmıştır (Scholzen ve Gerdes, 2000).



Şekil 1. H&E ve Ki67 ile boyanmış kanserli bir doku. a) H&E; b) Ki67. Kırmızı ve yeşil kareler sırasıyla, pozitif ve negatif sonuçlu hücreleri belirtmektedir (Martino ve diğerleri, 2020)

Ki67 gibi p16 antijeni de, İHK’de kullanılmakta olan diğer bir işaretleyici proteindir. Bu antijen interfaz aşamasında G_1 ’den S bölümüne kadar yer alan bir düzenleyici proteindir. Ancak buradaki görevi, hücre çoğalmasındaki herhangi bir gereksiz çoğalmayı baskılamaktır (Liggett ve Sidransky, 1998). Bu sebepten dolayı tümör baskılayıcı bu antijenin miktarındaki değişim, hücrenin kontrolsüz çoğalması, tıbbi olarak kanser olarak adlandırılabilir.

Hücre döngüsüne bağlı protein kinaz inhibitörü (cyclin-dependent kinase inhibitör, CDKN) olarak da bilinen p16 proteini, her ne kadar kanser görüntülemesinde etkili olsa da, tanı koyma sırasında yeteri kadar etkili olamamaktadır. Bu sebepten dolayı, özellikle rahim ağzı kanseri gibi kanser tiplerinde meydana gelen bazı değişikliklerin tespitinde, Ki67 gibi işaretleyiciler ile beraber kullanılmaktadır. Çünkü Ki67 antijeni p16 antijeninden farklı olarak, hücre çoğalmasının G_0 evresinde de bulunarak tanıyı kolaylaştırabilmektedir (Shi, ve diğerleri, 2019). Ancak bu iki antijenin birlikte kullanılması üzerinde hala araştırmalar yapılmaktadır.



Şekil 2. Skuamöz hücreli karsinom tipi rahim ağzı kanseri örneğinin p16 ve Ki67 ile gösterilmesi. a) p16 proteini; b) Ki67 (Shi ve diğerleri, 2019)

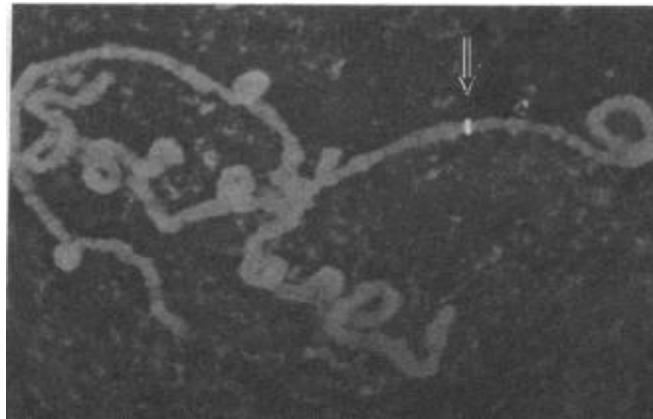
2.1.3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

In situ hibridizasyon (ISH) yöntemleri, çok uzun yıllardır tanı koyma işlemlerinde kullanılmaktadır. Bir canlıdan alınan dokunun bir bölümüne veya yeterince küçük bir canlıya, direkt olarak hücre kesitleri üzerinden kromozomal yapıyı bozmadan yapılan bir işlemdir (Langdale, 1994). Tek veya çift iplikli, DNA veya RNA iplikleri üzerinden nükleik asitleri kullanılarak yapılmaktadır. Bir canlının hücrelerinde meydana gelen nano boyuttaki değişimleri inceleyerek, genetik bozuklukları saptamaktadır. İncelenen dokular veya hücre parçaları için aranan proteine, DNA'ya veya RNA'ya bağlanan parçada genelde floresan veya radyoaktif olarak işaretli bir prob kullanılmaktadır (Wilcox, 1993). Kullanılan prob antijen, antikör veya tamamlayıcı DNA veya RNA parçası olabilmektedir. Bu parça hibridizasyon yöntemi uygulandıktan sonra hedef noktaya bağlanarak DNA dizilimindeki değişimi görmeyi amaçlamaktadır. In situ gibi canlı dokunun üzerinde yapılan işlemler için zamanla farklı işaretleme yöntemleri geliştirilmiştir. Canlı bir bakteri, virüs gibi farklı organizmalar tarafından enfekte olduğunda bu dokunun incelenmesi laboratuvar şartlarında pek mümkün değildir. Ancak ISH yöntemi sayesinde, eklenen farklı etiketleme işlemleriyle birlikte enfekte olan doku rahatça in situ şartları altında incelenebilmektedir.

ISH süreci boyunca içinde meydana gelen en önemli aşamalardan biri hibridizasyon işlemidir. Öyle ki, bu yöntem içerisinde meydana gelen değişiklikler zamanla

içerisinde prob olarak kullanılan nükleik asitlerin kullanıldığı yapıtaşlarını, boyutlarını ve yapısal kullanım tiplerini değiştirmiştir. Bu süreç sırasında öncelikle nükleik asit hibridize edilmektedir. İlk aşamada denenmiş olan, DNA içerisindeki nükleik asitlerin hibridizasyonudur.

In situ işlemlerinde hibridizasyon aşaması içerisinde önceleri radyoaktif işaretleyiciler kullanılmaktaydı. ISH işlemi ilk olarak Gall ve Pardue tarafından, 60'lı yılların sonuna doğru H^3 radyoaktif maddesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Pardue ve Gall, 1969). Yapılan araştırmalar ve ortaya çıkan bazı gelişmeler sonrası ise yapılan araştırmalarla bu yöntemin getirdiği radyoaktif etkiler ve ortaya çıkardığı sağlık sorunları sebebiyle kullanımı azaltılmıştır. Ancak teknolojik gelişmelerin etkisiyle birlikte ortaya çıkan yeniliklerle, farklı boyama yöntemleri araştırılmıştır. Bu süreçte radyoaktif ve radyoaktif olmayan maddelerle karşılıklı yapılan araştırmalarda radyoaktivite içermeyen boyama işlemlerinin daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (RUDKIN ve STOLLAR, 1977). Özellikle teknolojinin gelişmesiyle kullanımı sağlanan floresan ile işaretleme yöntemi sayesinde, yöntemin kullanımı artış göstermiştir. Daha önceleri floresan içeren başka yöntemler kullanılsa da, en önemli gelişme 1980'lerin başında yapılan bir deneyde, Şekil 3'te gösterildiği gibi hibridizasyon ile birlikte florokrom işaretleyicileri ve biotin-avidin kombinasyonu bir araya getirilmiş ve oluşan problemler ile antikör kullanılmadan floresan ile in situ yöntemi kullanılmaya başlanmıştır (Langer-Safer, Levine ve Ward, 1982). Bu işleme daha sonradan başına floresan ön eki getirilerek "Floresan In Situ Hibridizasyon" adı verilmiştir.



Şekil 3. Elde edilen kromozomdaki 84F bandına eşlenen arjinin ve asparajin proteinlerinin taşıyıcı-RNA'larını kodlayan 18 kilobaz çifti boyutunda bir parça ile hibridizasyon işlemi sonrası elde edilen floresan sinyali (Langer-Safer ve diğerleri, 1982)

FISH yöntemi, herhangi bir hücredeki DNA veya RNA moleküllerinin içindeki istenen kromozomal hedeflerin floresan prob lar aracılığıyla kullanılması sonucu oluşan genetik boyama tekniğidir. Bu yöntem, içerisindeki hücresel veya kromozomal mikro veya nano boyuttaki bozulmaları daha iyi anlayabilmek için hücrenin çoğalma mekanizmasının içinde gerçekleşen belli aşamalarda kullanılmaktadır. Bu aşamalar, hücrenin bölünme sürecinde farklı görevler yerine getirdikleri için, değişik tanı koyma işlemleri gerektirebilmektedirler. Ancak FISH burada gösterdiği çok yönlülüğü ile ayrılmaktadır. Örnelemek gerekirse FISH, hem hücre interfaz evresindeyken bölünme işlemi gerçekleştirmeden, durağan bir şekilde hücresel işlemlere devam edip kromozomların düzenlenmesinde de kullanılmakta, hem de bölünmenin ikinci aşamasında hücre bölünmeye başladığı sırada metafaz aşamasında meydana gelen, kromozomların kopup bulunması gerektikleri yere gitmemesi sonucu oluşan anomaliler (delesyon) oluşurken de kullanılmaktadır (Trask, 1991).

FISH yönteminde, nükleik asitlerin eşleştirilmesine bağlı olarak sonuç alınmaktadır ve herhangi bir canlının DNA veya RNA'sında meydana gelen kromozomal değişikliğin tespiti için nükleik asitler, prob olarak kullanılmaktadır (Guo, Ju ve Turro, 2012). Problar, hibridizasyon işlemi sırasında kullanılan DNA veya RNA parçacıklarıdır. İşlem sırasında kullanılan nükleotid dizisindeki bu DNA veya RNA parçaları (problar) ile hedeflenen zincir ile eşleşmektedir. Kullanılan probların boyanması için gerekli olan birçok farklı kimyasal madde bulunmaktadır. Bu kimyasallar, hücre yapısına herhangi bir etki göstermeden sadece hedef kromozoma etki göstermekte ve ana etken maddesi olan floresanın etki süresi boyunca yaptığı ışımaya sayesinde görüntünün elde edilmesini sağlamaktadır (Nederlof ve diğerleri, 1990). Ayrıca, tanı aşamasında kullanılan diğer yöntemler baz alındığında, iki nokta arasında ayırım yapabilme gücü açısından daha iyi sonuçlar vermesi ve farklı genetik mutasyonları (mozaisizm gibi) daha etkili bir şekilde tespit edebilmesi açısından öne çıkan bir tanı koyma yöntemi olarak görülmektedir (Durak, 2000).

FISH protokolünde boyama işlemi için nükleik asitler kullanılmaktadır. Çekirdek içerisindeki nükleik asitlerin prob olarak hazırlanması sırasında, hangi RNA veya DNA mikro-nano moleküllerinin boyanacağını bakılması dışında önemli olan birçok unsur bulunmaktadır. Hatta bu unsurlar, prosedürlere göre farklı isimler verilmesini sağlamıştır. DNA tek iplikli (single-stranded, ssDNA) veya çift iplikli (double-

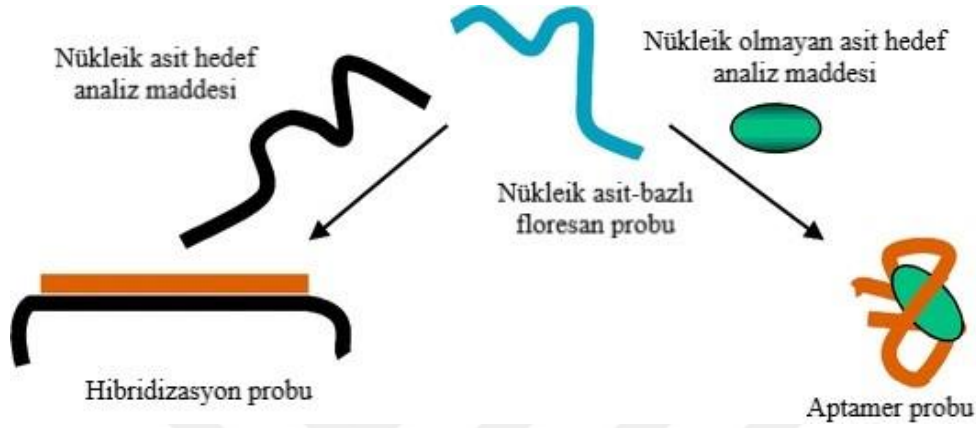
stranded, dsDNA) ve RNA da (single-stranded, ssRNA) veya çift iplikli (double-stranded, dsRNA) olabilirler ancak, dsRNA iplikli nükleik asitler prob olarak kullanılmamaktadır. Probların hazırlandığı süre boyunca nükleik asitler; ssDNA, dsDNA, ssRNA ve oligonükleotitler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Wetmur ve Fresco, 1991). DNA problemleri genellikle kromozomal FISH prosedürlerinde virüs kaynaklı sonuçları almada; ssRNA problemleri ve oligonükleotitler ise mRNA için yapılan işlemlerde kullanılmaktadır.

DNA problemleri, belirlenmiş bir gen veya kromozom için gerekli nükleotitlerden oluşan bir DNA parçasıdır. DNA içerisinde kullanılan floresan problemler, birçok farklı alanda DNA içerisindeki değişiklikleri tespit veya görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Problemlerin bağlanması sırasında oluşan yapısal ve nanomekanik etkiler bazı biyolojik etkiler ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca DNA problemleri kullanılırken, daha önceden belirlenen hedefleri tespit edebilmek için FISH işlemi sırasında hibridizasyon işlemi uygulanmaktadır.

RNA problemleri için bakıldığında, hücre içi çekirdeğe ve içerisindeki çekirdekçiğe odaklanmak gerekmektedir. RNA hücre bölünmesinde önemli bir rol almakta ve özellikle çekirdek kısmında etkili olmaktadır. Çünkü çekirdek içerisindeki RNA molekülleri, çoğunlukla çekirdekçik bölümünde bulunmaktadır. Bu çekirdekçik parçasının içinde, hücre çoğalması farklı aşamalarda geçen ribozomal RNA (rRNA) parçaları sentezlenmekte ve bir araya getirilmektedir (Li ve diğerleri, 2006). Ayrıca RNA hücre içerisinde fiziksel taşıma, genetik bilginin yorumlanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve bazı temel biyo-katalitik roller gibi birçok farklı rollere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Lu ve diğerleri, 2015). Bu açıdan önemine bakıldığında RNA problemleri, hücre çoğalması içerisinde interfaz ve metafaz gibi farklı aşamalarda genetiksel değişimler, çekirdekçik içindeki değişimleri tespit etme gibi farklı hücresel olaylarda kullanılabilmektedir.

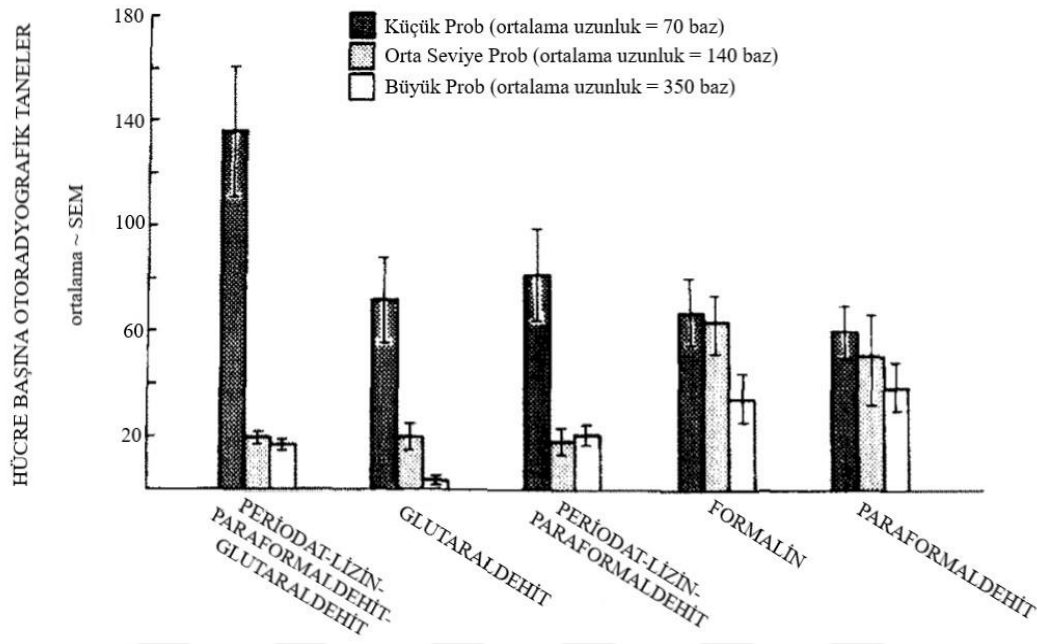
Oligonükleotit problemler genetik araştırmalar sırasında sıkça kullanılan, kısa DNA veya RNA moleküllerine sahip, tek iplikli nükleik asit parçacıklarıdır. Az miktarda nükleotit birleşimiyle bir araya gelmektedirler. Ayrıca sahip oldukları yüksek özgüllük (specifity) ve benzeşme (affinity) oranları, sayesinde nükleik asitler, proteinler ve diğer küçük moleküller için ayarlanabilir olmaları ve ek olarak küçük boyutlarda

olmaları sebebiyle FISH yöntemi için çok kullanışlı problemler olarak görülmektedirler. Kendi içlerinde tamamlayıcı baz çiftlerinin oluşumuna dayanan hibridizasyon problemleri ve nükleik asit olmayan analitlerin seçici olarak tanınmasından yararlanan aptamer problemleri şeklinde ikiye ayrılmaktadırlar ve bu durum Şekil 4'te floresan içerikli nükleik asit bazlı probda gösterilmiştir (Juskowiak, 2011).



Şekil 4. Bir nükleik asit hedefi ile hibridizasyon veya nükleik asit olmayan bir hedef ile benzeşme (affinity) etkileşimleri, bir nükleik asit bazlı floresan probun floresan özelliklerinde değişiklikler oluşturur (Juskowiak, 2011)

Problemlerin kullanımında bir diğer etken de problemlerin boyutudur. Uzun boyuttaki problemler sayesinde, genellikle in situ melezleme işleminde en yüksek oran ortaya çıkmaktadır. Ancak FISH işleminde, kısa boyuttaki problemlerin kullanımı daha uygun görülmektedir. Çünkü problemlerin hücre veya kromozom içerisine geçerken yoğun matriksten geçmesi ve hedef nükleik aside ulaşması gerekmektedir ve yaydığı sinyallerin de uzun problemlere göre daha belirgin olduğu görülmüştür. Bu durum, Visna virüsü ve farklı kimyasal kombinasyonları ile birlikte yapılmış bir deneyde Şekil 5'te gösterildiği gibi, prob boylarının etkisi görülmektedir (Moench, ve diğerleri, 1985). Ayrıca uzun problemler, hibridizasyon işlemi sırasında daha az netlik içererek sonuçlanmaktadır. Bu sebepten dolayı da kısa problemler hedef nükleotidin tamamlanmasında daha etkilidir. Ancak her ne kadar kısa problemler daha etkili olsalar bile, gereğinden daha kısa olurlarsa, gönderdikleri sinyallerin (yaptığı yansımalar) çok düşük olması sebebiyle, işaretlemede karışıklığa yol açabilmektedirler.



Şekil 5. Çeşitli fiksatif kimyasallarla sabitlenen ve farklı boyutta DNA problemleri ile hibridize edilen Visna virüsü ile enfekte koyun koroid pleksus hücrelerinin kopyalanmış sitosantrifüj preparasyonu (küçük prob 70 baz, orta prob 140 baz ve uzun prob 350 baz) (Moench ve diğerleri, 1985)

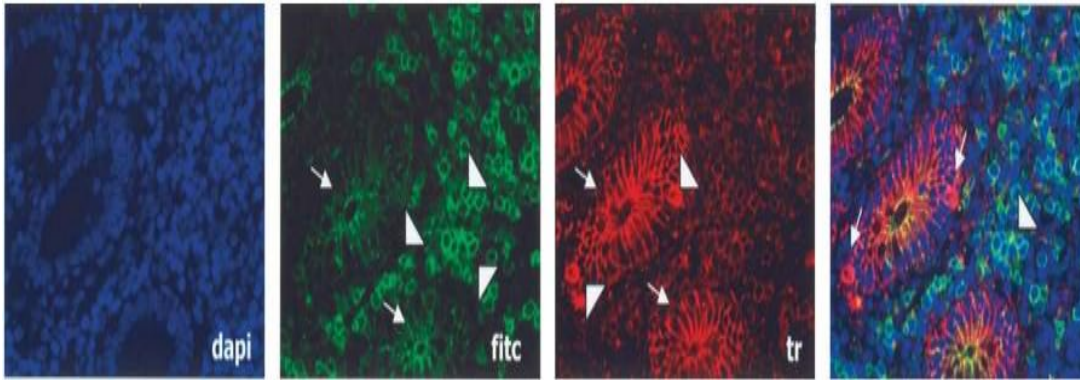
FISH tek tip boya kullanmadan, temel maddesi floresan olan birçok farklı prob tipleriyle kullanılmaktadır. Bu problemler, farklı kromozomlarda farklı şekillerde kullanılabilir ve farklı renkler ortaya çıkabilmektedir. Hatta belirlenen kromozomları ve bağlantı yerlerini daha net görmek amacı ile bazı problemler karıştırılarak beraber kullanılabilir. Ancak bu işlem her problem uygulanamamaktadır. Çünkü bazı problemler, görülmemesi gereken yerleri de boyamakta ve yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Bu sebepten çeşitli FISH boyama tipleri, farklı alanlarda özel durumları nitelemek için kullanılmaktadır. Bu boyama çeşitliliği içerisinde etki ettiği alana veya yapılış şekline göre farklı adlandırılmışlardır. Aşağıda gösterilen Tablo 1’de, bu durum birçok farklı FISH boyama tipi ve kullanım amaçlarıyla birlikte listelenmiştir (Ratan ve diğerleri, 2017). Burada 23 yöntemin 8 tanesi verilmiş olup, detaylı tablo Ek-1’de sunulmuştur.

Tablo 1. FISH Boyama Tipleri Ve Kullanım Amaçları (Ratan ve diğerleri, 2017)

Numara	FISH Tipleri	Kullanım amaçları
1	Alpha (1cen), classical (klasik) (1q12) ve midi (1p36.3) kromozom 1 uyduları ile FISH (ACM-FISH)	Sperm hücrelerinde meydana gelen kromozomlardaki yapısal ve sayısal saptanması
2	ArmFISH	M-FISH 42 renk içeren varyantı olan boyama, kromozomdaki uzun kollardaki (p ve q kolları) değişimler
3	Katalize edilmiş iletilici birikimi ile FISH (Catalyzed reporter deposition FISH) (CARD-FISH)	Peroksinaz kullanılarak yapılan işlemlerde etrafında çoğalan parçacıkların sinyal ile tespit edilmesi
4	FISH ile temporal aktivitenin hücresel bölünme analizi (Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH) (CAT-FISH)	Beyinde gerçekleşen nöron aktivitelerinin RNA problemleri ile incelenmesi
5	Kromozom yönlendirmeli (Chromosome Orientation) CO-FISH	Standart FISH yönteminden elde edilen bilginin bir kromozom içindeki iki veya daha fazla DNA dizisinin yönlendirmesini içerecek şekilde genişletilmesi
6	Cytochalasin (Sitokalazin) B FISH (CB-FISH)	Mikroçekirdekleşme ve anöplöidi içeren çift çekirdekli hücrelerin CB ile tamir edilerek bloke edildiği hibridizasyonu işlemi
7	Chromosome Orientation and Direction (Kromozom yönlendirmeli ve yönetimli) FISH (COD-FISH)	Genin kendini kopyalama miktarını ve hücredeki protein miktarının tespit edilmesi
8	Comet-FISH	Belirli genom bölgelerindeki DNA

2.1.4. Floresan Kullanılan Ortak Boyama Yöntemleri

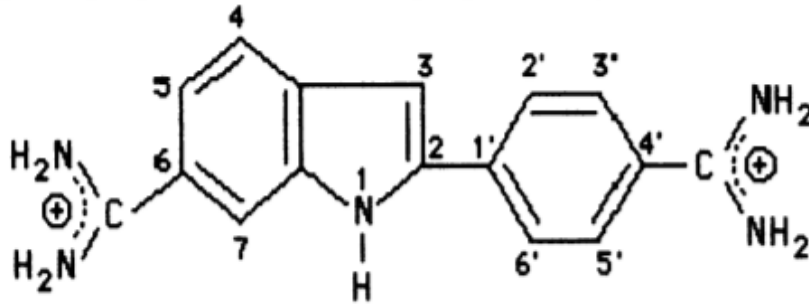
FISH her ne kadar farklı isimde yer almış olsa da, süreç boyunca kullanılan belli başlı boyama tipleri olmuştur. Öncelikle immüno Floresan ile İHK'ye bağlı olarak başlayan süreçte, daha sonra yaşanan gelişmeler ile ISH yöntemine doğru geçiş sağlanmış ve FISH ile büyük bir ivme yakalanmıştır. İncelenen dokunun DNA veya RNA bazlı olmasına ve tek veya çift bağa sahip olmasına bağlı olarak kullanılan bu etiketleme işlemleri, iki süreçte de (İHK ve FISH) aktif olarak kullanılan boyalardır. Sadece etiket isimleri farklı olan bu boya tipleri, farklı kimyasallar barındırmakta ve hücrede farklı yerlere bağlanmaktadır. Bu tarz birçok farklı floresan boyama örneği bulunmaktadır, ancak burada tez kapsamında kullanmak üzere Şekil 6'da gösterilen DAPI, FITC ve TR adlı üç ana boyama yönteminden bahsedilmektedir (Bataille ve diğerleri, 2006).



Şekil 6. Normal ve iltihaplı kolon mukozasının DAPI, FITC ve TR ile çok renkli immüno Floresan boyanması (Bataille ve diğerleri, 2006)

İlk olarak DAPI, hücre çekirdeği içerisinde kullanıldığında adenin-timin bağlarının zengin olduğu bölgede etkisini güçlü bağlarla ile bu bölgelere bağlanarak gösteren bir özel DNA etiketleme işlemidir. İlk olarak 1971 yılında Otto Dan tarafından, parazitlerin neden olduğu bir hastalık olan tripanozomiyazın tedavisinin bulunması amacıyla yapılan araştırmalarda kullanılmıştır ve bu araştırmalar her ne kadar olumsuz sonuçlar verse de DAPI, gösterdiği kuvvetli DNA bağlanmasıyla ve yüksek floresan absorpsiyon özelliği ile gelecek araştırmalar için umut vaat etmiştir (Dann ve diğerleri,

1971). Bu araştırmanın DAPI'nin güçlü bağ kuvvetleri ile görüntüleme işlemi için gösterdiği yoldan sonra, 1975 yılında DAPI ilk defa maya hücresi içerisindeki çekirdek DNA ve mitokondriyal DNA boyaması için kullanılmış ve ortaya çıkardığı DNA molekülü sayesinde bu alanda büyük bir gelişme yaşanmıştır (RUSSELL ve diğerleri, 1975). Şekil 7'de kimyasal yapısı gösterilen DAPI, sahip olduğu özelliklere bağlı olarak guanin ve sitozin bağ çiftleri yerine çoğunlukla adenin ve timin bazlarının olduğu bölgelerde yoğunlaşmaktadır ve bu durum da, DAPI'nin kullanımı sırasında gerçekleşen ccc-DNA'nın sedimantasyonu sırasında davranışında değişiklik olmaması ve DAPI içeriğindeki moleküllerin halkalarının aynı düzlemde bulunmaması şeklinde açıklanmaktadır (Manzini ve diğerleri, 1985).



Şekil 7. DAPI boyasının kimyasal yapısı (Manzini ve diğerleri, 1985)

DAPI, ISH boyama yönteminde meydana geldiği gibi, sırasıyla yapılan hibridizasyon ve hücre içine entegre edilen boya ile yapılan etiketleme işlemi sonrasında hücre çekirdeği içinde antikor-antijen bağlantısı meydana gelmektedir. Bu işlemler sonrasında oluşan bağlar sayesinde, görünme açısından çok daha etkili olması sebebiyle tercihen kullanılan dsDNA molekülleri (mikro boyuttaki çift sarmallı kromozomlar veya kromatitler) gözlemlenebilmektedir. Mikroskop ile gözlem yapılırken, ışık verilerek bağlanmanın yapıldığı bölümün ışığı ne kadar absorbe ettiğine ve yansıttığına bakılmaktadır ve buna göre sahip olduğu dalga boyuna göre renk gözlemlenmektedir. Burada DAPI, maksimum ~ 360 nanometrede (ultraviyole ışıma yakın bir dalga boyunda) soğurma ve maksimum ~ 461 nanometre dalga boyunda ise ışıma yapmaktadır (Chazotte, 2011). Filtreye takılarak bu aralıkta gözlemlenen renk ise mavi-camgöbeği arasında bir renk olmaktadır. Aslında bu işlemlere ve bağlanma özelliklerine de bakıldığında her ne kadar DNA bazlı bir yöntem olsa da DAPI, yapılan bu araştırmalar içerisinde RNA ile de bağlanabildiği

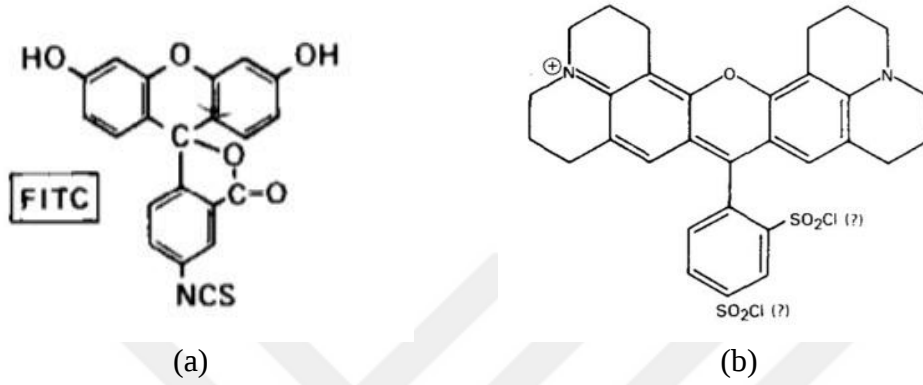
gözlemlenebilmektedir. Ancak RNA ile yapılan işlemler olumlu sonuçlanmayabilmektedir. Çünkü DAPI'nin floresan ile gerçekleşen işleminde içerdiği bağlar, yeterince kuvvetli ve ışıyan bağlar değildir ve ayrıca RNA-DAPI eşleşmesinin, dsDNA-DAPI eşleşmesindeki ışığın emilmesi işleminde daha uzun dalga boyuna sahip olduğu ve %20 daha yüksek kuantumsal verim içerdiği gözlemlenmiştir (Jež ve diğerleri, 2013).

DAPI sahip olduğu geniş spektrum sayesinde farklı boyalar ile birlikte de kullanılabilmektedir. Özellikle FITC, DAPI ile sahip oldukları ayrı spektrumlardan dolayı ve yansıtma işlemindeki bazı aralıklarda örtüşen dalga boyu sayesinde birlikte de kullanılabilmektedirler. Çünkü FITC, sahip olduğu soğurma ile ışıma dalga boyu sırasıyla 490 nanometre ve 520 nanometre olarak görünmektedir (Tuls, Geren ve Millett, 1989). Bu dalga boyunda ise her ne kadar DAPI ile yakın olsalar da, sahip olduğu dalga boyu değerleri ile FITC daha çok, yeşil renkte floresan özellik göstermektedir.

FITC içerdiği floresan ile belli bir dalga boyu aralığında ışıma yapan, diğer boyama tekniklerinde de olduğu üzere doku ve proteinler ile kullanılan bir amin floresan prob olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, floresan kullanılan antikor boyama prosedürlerinde ve protein-amino asit bağlama teknikleri gibi diğer boyama yöntemlerinde bir etiket olarak kullanılmaktadır. İlk olarak bir immünofloresan tekniğinin kullanımı sırasında 1942 yılında ortaya çıkan FITC antikor-antijen bağlantısı, farklı moleküllerle birleşimi ve spesifik olmayan (non-spesifik) floresan moleküllerinin geliştirilmesiyle, immünofloresan tekniğinin ve diğer geliştirilen tekniklerin daha iyi hale gelmesini sağlamıştır (The ve Felkamp, 1970).

FITC yöntemi kendi içerisine barındırdığı özellikler sebebiyle çok kullanılan bir yöntemdir. Şekil 8.a'da görüldüğü gibi kimyasal yapısı hidroksil grubu içeren FITC, bu grup sayesinde iyonize olabilmektedir ve iyonize olan bu gruplar FITC boyasının sahip olduğu bu asidik yapısı sayesinde hem hücre içerisine girişi daha rahat yapabilmekte, hem de parlamayı iyi bir şekilde yapabilmektedir (Butcher ve Weissman, 1980). Ayrıca, hassas bir ayarlama gerektirmemesi, amin grubu olması ve DAPI tekniğinin içerdiği gibi özel bir bölgede yoğunlaşma içermemesi gibi sebepler onu ön plana çıkarmaktadır. Ancak sahip olduğu dalga boyunun ortaya çıkardığı yeşil

rengin eşdeğer boya tipleriyle aynı parlaklığa sahip olmaması ve daha önemlisi yaydığı ışığın hızlıca solması gibi nedenlerden ötürü araştırmacıları farklı arayışlara yönlendirmiştir. Birleştirme, farklı kimyasallar ekleme ve farklı boya tipleriyle kullanma gibi geliştirmeler yapılmıştır. DAPI burada iyi bir örnek olarak verilebilir, ayrıca buraya TR adlı boya da eklenebilir.



Şekil 8. (a) FITC boyasının kimyasal yapısı (Butcher ve Weissman, 1980) (b) TR boyasının kimyasal yapısı (Titus ve diğerleri, 1982)

TR, anlatılan diğer boya tipleri gibi hücre içerisinde antikora ve proteinlere bağlanarak hücre içi görüntüleme yapmayı amaçlayan bir boya türüdür. Sahip olduğu soğurma değeri ~590 nanometre, ışıma dalga boyunun da ~620 nanometre değerlerinde olması sebebiyle, adından da anlaşılacağı üzere kırmızı renkte ışıma yapmaktadır (Clement ve Truong, 2014). Sahip olduğu yüksek dalga boyu sayesinde yüksek miktarda ışıma yapabilmektedir ve ayırt edilebilmektedir. Yüksek miktardaki ışıma, bu boyanın FITC ve DAPI gibi farklı boya tipleriyle de kullanılmasını sağlamaktadır. Ek olarak sahip olduğu farklı dalga boyu spektrumu sayesinde üst üste birikme yapmamakta ve rahatça ayırt edilebilmektedir. Sahip olduğu kuvvetli kovalent bağlar sayesinde floresan ile bağlantı kurmakta ve hedef antikoru etiketleyebilmektedir.

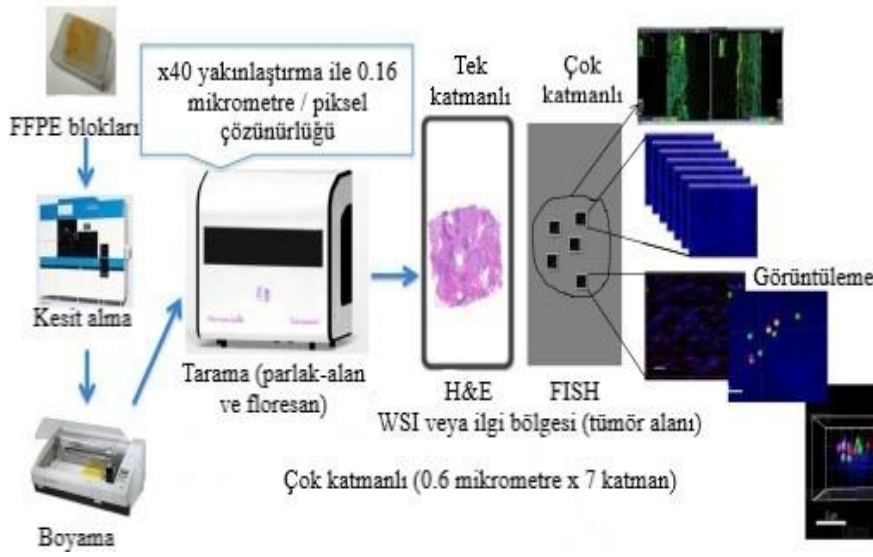
TR genellikle sülfonil klorür ile bağ yapmaktadır ve bu sebeple de sülforodamin 101 asil klorür olarak da bilinmektedir. Ancak, Şekil 8.b’de de görülen TR boyasının içerdiği sülfonil klorür parçası hidrolize duyarlıdır ve bu sebeple hidroliz işlemi gerçekleşirken, boyanın içerisindeki sülfonat parçacıkları serbest amino grupları içeren bileşiklerle hidrofilik bağlar oluşturabilmektedir ve bu durum da sudaki çözünürlüğü azaltıp bazı biyomoleküllere bağlanma sorunu oluşturmaktadır (Titus ve

diğerleri, 1982). Bu sorun da genellikle proteinlerin veya antijenlerin TR ile bağlanmasıyla çözümlenmektedir.

Bu tez kapsamında kullanılan boyalar DAPI, FITC ve TR olup, yukarıda teker teker anlatılmaktadır. Bu boyalar, tez içerisinde farklı görüntüleme teknikleriyle beraber ayrı ayrı incelenmektedir. Bu boyama tekniklerinin üzerinde, meydana gelen görüntüleme bozuklukların engellenebilmesi amacıyla bazı ön işlemler gerçekleştirilmekte ve sonrasında görüntülerin karşılaştırılması amacıyla farklı algoritmalar uygulanmaktadır.

2.2. Histopatolojide Sayısal Görüntü İşleme Teknikleri

Dijital histopatoloji sırasında inceleme yapılabilmesi için süreç başında, canlıdan doku incelemesi amacıyla parça alınmak zorundadır. Bu parça için doku örneği alınıp, dışarıda mikroskop ve diğer görüntüleme cihazları ile incelemesi yapılabilmekte veya in situ yani yerinde de inceleme yapılabilmektedir. Ancak yapılan bu incelemelerin ortak yönü, hiç birinin tek başına büyük ve parçanın tamamı şeklinde yapılmamasıdır. Çünkü görüntünün tam ve yüksek kesinlik oranıyla incelenebilmesi, yapılacak analizin parçalara ayrılarak incelenmesi ile mümkün olmaktadır. Bu görüntüleme tekniğine Tüm Slayt Görüntüsü (Whole Slide Imaging, WSI) adı verilmektedir. WSI mikroskopik inceleme için dokunun konulduğu cam slaytlardan, tüm boyalı doku bölümlerini temsil eden görüntülerin yüksek hızlı, yüksek çözünürlüklü dijital olarak alınmasını ve farklı cihazlarda incelenmesini içeren bir teknolojidir. Bu teknikte genellikle, Şekil 9’da gösterildiği üzere mikroskop altına inceleme amacıyla konulan parçacıklar taranmaktadır ve birçok küçük yüksek çözünürlüklü görüntü parçası veya şeridi alınmaktadır (Frankenstein ve diğerleri, 2021). Ardından histolojik bir numunenin tam bir görüntüsünü oluşturmak için parça parça alınarak birleştirilerek elde edilmektedir. Bu görüntüler de, klinik tanı ve biyomedikal araştırmayı desteklemek için hastalardan alınan doku örneklerinin mikroskopik incelemesini sağlamaktadır. Ayrıca bilgisayara aktarılan görüntüler sayesinde, WSI tekniğinin mikro anatomik özelliklerin nicel, tekrarlanabilir ölçümleri hızla gerçekleştirilebilmesi veya bilgisayarlı patoloji görüntü analizi mümkün olmaktadır.

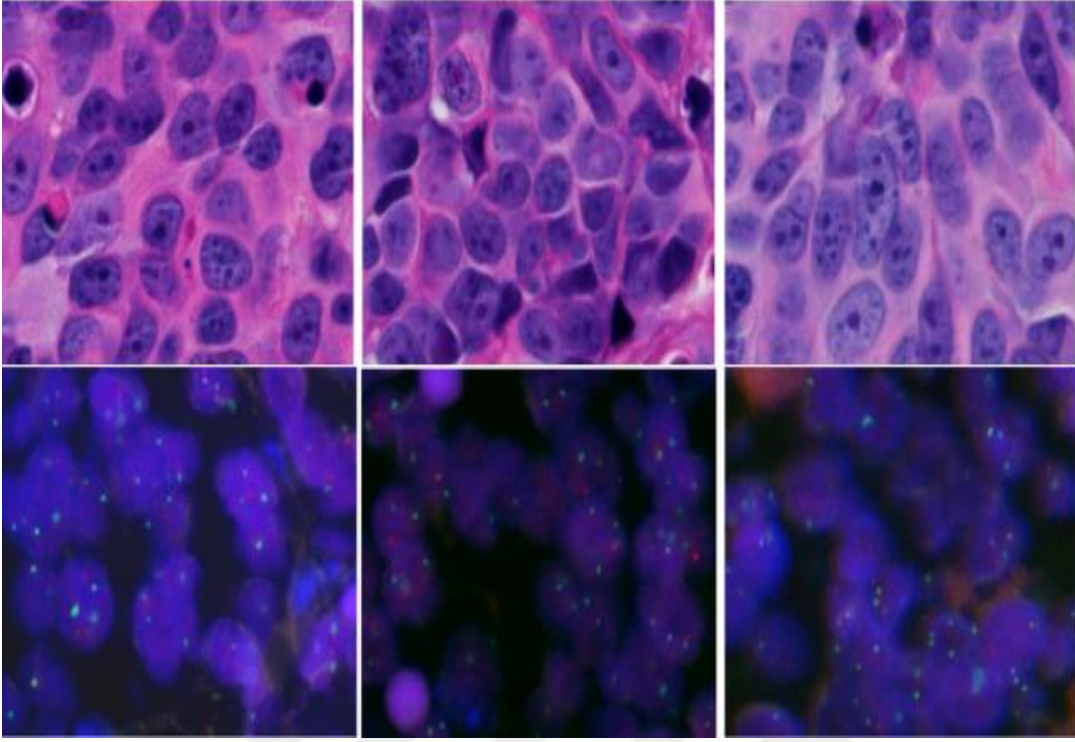


Şekil 9. İHK VE FISH kullanılarak Formalinle-Sabitlenmiş Parafine-Gömülü (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) doku parçalarının kesit alma, boyanma ve tarama işlem şeması (Frankenstein ve diğerleri, 2021).

Tüm görüntü üzerinden inceleme işlemi geliştirilmeden önce, mikroskopik incelemeler ve daha sonra kamera eklenmesiyle birlikte oluşturulan bir düzenek ile sonuç alınmaktaydı (Girolami ve diğerleri, 2019). Bu sonuçlar ile dokunun belli noktaları incelenebilmekte ve yeterli sonuç alınamamaktaydı. Ancak WSI teknolojisinde yaşanan ilk gelişmeler bu durumu değiştirmiştir. Öncelikle 1990'ların sonunda robotik sistemlerde yaşanan gelişmeler sayesinde, kamera-mikroskop entegrasyonuna robotik özellikler de eklenmiş ve bu teknoloji sayesinde patologların görüntüyü tam olarak görebilmesi sağlanmıştır (Dunn ve diğerleri, 1997). Ancak bu teknolojiye de her ne kadar görüntü tam olarak alınabilse de, görüntüleme ve inceleme sırasında yaşanan düşük netlik sebebiyle çok verimli olamamıştır. En son olarak yaşanan ve günümüzde de kullanılmakta olan WSI incelemesinin son halinde, artık görüntüler parça parça yüksek çözünürlükte alınmakta ve net bir şekilde incelenebilmektedir.

WSI sürecinde işlemler sırasıyla sorunlu dokunun tespiti, parça alınması, uygun boyayla boyanması ve ardından da lamaların üzerine konup özel tekniklere sahip tarayıcılarla görüntülerin alınması şeklinde ilerlemektedir. Ancak buradaki sorunlu dokunun görüntüsü alınırken görüntü tek seferde tam olarak alınmamaktadır. Çünkü görüntünün böyle alınması, inceleme sırasında önemli noktaların görüntülenirken

netliğinin azalmasına yol açmaktadır. Bu durum da sonuçların alınamamasına veya alınabilse bile sonuçların yanlış çıkmasına yol açabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü, görüntü alınırken tek parça olarak değil, parça parça halinde yakınılaşarak yüksek kalitede elde edilmektedir. Alınan bu çok tabakalı görüntüler daha sonra tek bir görüntü haline getirilmek üzere birleştirilmektedir. Görüntüler genelde x20 kat yakınılaştırma oranında veya özel ihtiyaç halinde daha yakından net görüntüler elde edebilmek için x40, x100 ve hatta x200 oranında bytlebilmektedirler (DANDIL ve SERİN, 2020). Parça halinde olan bu görüntüler, sahip oldukları yüksek çözünürlükler sebebiyle, veride tek başına yüksek yer kaplayabilmektedirler. Bu sebeple bazen tek olarak birleştirilmeden parça halinde de saklanabilmektedirler. Yakınılaştırması x40 seviyesinde olan bir slayt parçası birkaç gigabayt (gb) boyutunda olabilmektedir ve burada da tüm görüntünün birleştirilmiş hali düşünüldüğünde yüksek boyutlar ortaya çıkmaktadır. Alınan slaytların bölünme sayısında göre değişmekte olan boyutlar genelde 50 gb veya 60 gb civarında gözükmektedir. Her ne kadar günümüzün teknolojiyiyle çok yüksek görünmese de, bu görüntüleme işleminden tek bir merkezde günde onlara yapıldığı düşünüldüğünde depolama sıkıntısı yarattığı anlaşılmaktadır. Örneğin orta seviyede bir laboratuvarda gerçekleşen WSI çekimleri, büyük ölçekli bir taramada (görüntülerin yedeklenmesi haricinde), yapılan hesaplamalarla yılda 40 terabayta kadar devasa bir depolama ortamı gerektirmektedir (Al-Janabi ve diğerleri, 2012).



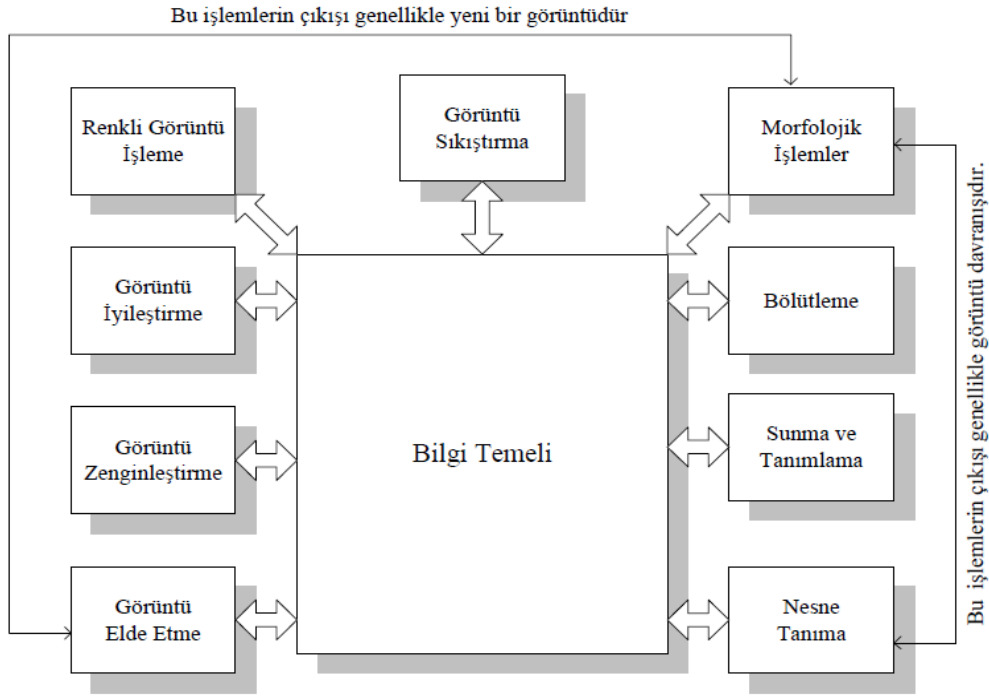
Şekil 10. Çinko formalin ile sabitlenmiş dokularda x60 yakınlaştırlarak boyaması ve sırasıyla 12, 24 ve 48 saat sonrası sonuçlar. Satır.1) H&E; Satır.2) FISH (Babic ve diğerleri, 2010)

Ortaya çıkan görüntüler, WSI işlemleri sırasında tarama işlemi yapıldıktan sonra dijital ortama geçiş yapılırken, kullanılan sistemlere de bağlı olarak farklı uzantılara sahip olabilmektedir. Bu uzantıların sıkıştırma oranını ve buna bağlı olarak görüntü kalitesini de etkilemektedir. Belli başlı görüntü formatları Birleşik Fotoğraf Uzmanları Grubu (Joint Photographic Experts Group, JPEG) ve Taşınabilir Ağ Grafiği anlamındaki (Portable Network Graphics, PNG) gibi genel olarak dünyada kullanılan görüntüleme formatlarıdır. Bu formatlara ek olarak Etiketlenmiş Görüntü Dosyası Formatı (Tagged Image File Format, TIFF) da kullanımda ilk sıralarda bulunmaktadır. Ancak burada TIFF formatını öne çıkmasının sebebi, çekim sırasında yapılan sıkıştırma miktarıdır ve görüntü kalitesidir. Bu format JPEG ile kıyaslandığında, daha az kayıpsız sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Çünkü TIFF formatı, görüntüyü oluşturan renk yoğunluğunu belirten her bir değer olan piksel üzerinden daha az kayıp ile daha çok veriyi kayıt altına alabilmektedir. Her iki formatta da sıkıştırılma yapılabilmektedir, ancak bu işlem sırasında JPEG formatında çok daha fazla kayıp yaşanmaktadır. Bu durum da, görüntü kalitesini daha düşük hale getirmektedir. TIFF

dosyalarının da genel problemi, bu tip tarama görüntü kayıtlarında da olduğu gibi bellekte yüksek miktarda yer depolaması gerektirmesidir. Bu soruna çözüm olarak birçok farklı sistem denenmektedir. Bunlardan birinde 2011 yılında Harvard Üniversitesi'nde yapılan bir araştırmada, bilgisayar sistemleri ve ekranları kullanılarak yapılan görüntülemelerin yerine, yüksek veri boyutlarından kaynaklanan görüntüleme hızındaki kaybı azaltmak amacıyla PlayStation®3 (PS3®) kullanılarak, sistemde çok büyük hız artışı sağlanmıştır (Yagi ve diğerleri, 2012).

2.2.1. Ön İşleme

WSI işlemi çok yaygın olarak birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların incelenmesi ve mikroskopik canlıların özelliklerinin belirlenmesi gibi birçok bilimsel araştırmada önemli bir yardımcıdır. Ancak insanlık için daha önemlisi olarak, hastalıkların teşhisi konusunda patoloğlara çok yardımcı olmaktadır. Histopatolojik inceleme yapılması gereken vakalarda farklı boyalar kullanabilmektedir. Ancak bu incelemeler büyük oranda WSI ile yapılmaktadır. İHK, H&E veya FISH fark etmeden hepsinin bu teknik ile görüntüsü alınmakta ve incelenmektedir. Her işlemde olduğu gibi WSI tekniğinde de belli bir süreç izlenmekte ve farklı işlemlerden geçilmektedir. Çünkü görüntülere bakıldığında, hepsi belli bir piksel sayısında ve bir matris düzeninde görülmektedir. Net bir görüntü için ise, bu matrislerin sırasıyla düzgün bir şekilde işleminden geçirilip kaydedilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde, görüntülerde veri kaybı oluşabilmekte ve bu durum yanlış tanıya sebep olabilmektedir. Çünkü görüntü, her zaman günlük fotoğraflardaki gibi net olmamaktadır. Özellikle bu durum medikal amaçlı çekilen görüntüler üzerinde daha net anlaşılmaktadır. Bu sebepten tetkik amaçlı yapılan her farklı boyama işlemi sonrasında, görüntünün incelenmesinden önce Şekil 10'da temel basamakları gösterilen bazı ön işlemlerden geçmek zorundadır (Suat TORAMAN, 2010).



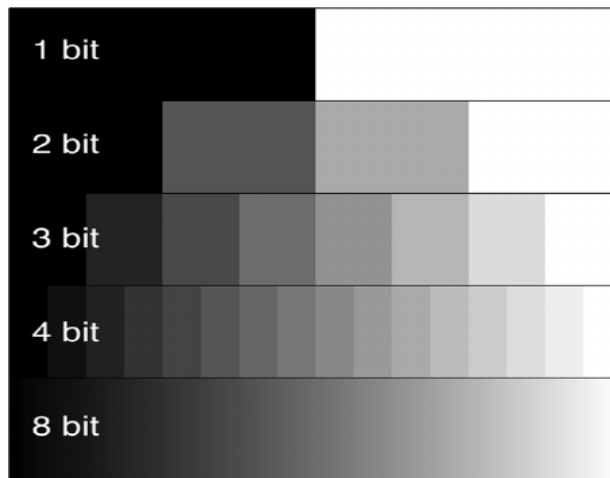
Şekil 11. Görüntü işlemede temel basamaklar (Suat TORAMAN, 2010)

Görüntü işleme, belli bir nesnenin incelenmesi için gerekli amaçlar doğrultusunda özelliklerinin farklı işlemlerden geçirilip bilgisayar için ve daha önemlisi insanlar için incelenebilir hale getirmeyi amaçlamaktadır. Bu sürecin ilk aşamasında görüntü üç boyutlu bir ortamdan alınıp bir matris dizisi halinde bilgisayara iki boyutlu olarak aktarılmaktadır. Her bir matrisin sahip olduğu değer onun içerdiği renk ile alakalı olmaktadır ve her görüntü farklı görüntüleme şekillerinde gösterilmektedir. Bu sebepten imge, renk kodunun kırmızı, yeşil ve maviden (red-green-blue, RGB) oluşan, gri alanı belirten (gray scale) ve ikili (binary) olmak üzere üç farklı şekilde incelenmektedir. RGB, imgedeki her piksel için üç ana rengin birleşimi olarak bir renk atanması sayesinde renkli görüntüyü oluşturmaktadır. Bu üç renk birleşimi sayesinde diğer renklerin oluşumu sağlanabilmektedir. Gri alan ise sadece siyah ve beyaz rengin birleşimiyle ortaya çıkmakta ve ortada gri rengi barındırarak görüntüyü oluşturmaktadır. Ayrıca, renk zıtlığı barındırmasından dolayı kontrast olarak da anılmaktadır. İkili görüntü ise gri alandan farklı olarak sadece siyah ve beyaz renk piksellerinden oluşmaktadır ve gri renk piksellerini içermemektedir.

Alınan her görüntünün pikselinin sahip olduğu renkler dışında, sahip olduğu bir

Çözünürlük değeri de bulunmaktadır. Çözünürlük değeri, görüntünün sahip olduğu satır ve sütun piksel sayılarının çarpımı olarak gösterilmektedir. Bunlara ek olarak bu değeri görüntünün sahip olduğu bit değeri ile çarparak, bellekte kapladığı alanı bulabilmek mümkündür. Piksellerin oluşturduğu bu çözünürlük sayılarının satır veya sütun fark etmeksizin azaltılması, görüntünün sahip olduğu ayrıntının kaybolmasına sebep olmaktadır. Çünkü bu değeri, her bir renk değeri için kaybolması anlamına gelmektedir. Ayrıca, piksellerin sahip olduğu parlaklık değeri de görüntü kalitesi etkilenebilmektedir. Parlaklık, imge üzerindeki her pikselin sahip olduğu gri seviye alanındaki değeri belirtmektedir. Gri seviyenin sayısının azaltılması, renk sayısını ve buna bağlı olarak bit değerini azaltarak görüntü üzerindeki çizgisel hatların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Farklı görüntüler sahip oldukları renkleri içlerinde bulundurdıkları matrisin içerisindeki rakamlara bağlı olarak elde etmektedirler. Gri alan 256 renk değeri içererek, sahip olduğu renkleri 0 ile 255 arasında değeri almaktadır. 256 değeri ikinin sekizinci kuvvetinin (2^8) alınmasıyla meydana gelmektedir. Burada sekiz, renklerin sahip olduğu sekiz bit değeri sahip olmasıdır. İkili görüntüde ise tek veya bir bittir, o da 2 (2^1) renk alanı oluşturmaktadır. RGB ise gri alan görüntüler gibi 256 renk değeri içermektedir, ancak bu durum her bir renk için geçerlidir. Kırmızı, yeşil ve mavi renk değeri görüntü matrisinde her piksel değeri için 0 ile 255 arasında değeri almaktadır. Her bir renk değeri 255 ile çarpılmaktadır ve bu durumda RGB görüntülerinin ~16.7 milyon renk aralığından meydana geldiği görülmektedir.



Şekil 12. Gri alan bit derinliği derecelerinin karşılaştırması (Lambert ve Waters, 2014)

RGB görüntüleri, gri alan görüntüleri ve ikili görüntüler bazı işlemler geçirerek birbirine dönüştürülebilmektedir. Sahip oldukları matrisler matematiksel bazı işlemler sonucu hesaplanmaktadır. RGB görüntüsü, gri alan veya ikili görüntüye dönüştürülebilmekte veya tam tersi işlemler de mümkün olabilmektedir. Ancak, ikili görüntüden RGB ve gri alan görüntülere dönüştürmede zorluklar yaşanabilmektedir.

Görüntü işleme yöntemlerinin iyileştirilmesi amacıyla, görüntü dijital ortama aktarıldıktan sonra ön işlemler (preprocessing) yapılmaktadır. Bu işlemler gerçekleşecek sürece göre değişse de, görüntüde farklı sebeplerden kaynaklı gürültüyü azaltma, boyama sonrası durumlar sebebiyle arka planı veya rengi normalleştirme, karşıtlık (kontrast) ve özellik geliştirme işlemleri olarak açıklanabilir.

Görüntü işleme sırasında yapılacak işlemler içerisinde renk yoğunluğunu oluşturan ve sahip olduğu değerlerin meydana getirdiği pikseller ile bazı hesaplamalar yapılmaktadır. Ön işlemler ile piksellerin üzerinde meydana gelen bozuklukların ilerde görüntü işleme sırasında işlem hatasına yol açmasının engellenmesi amaçlanmaktadır.

H&E Görüntüleri için Yapılan İşlemler: H&E boyama işlemleri, uygulandıktan sonra sitoplazma ve çekirdeği iki farklı renge boyayarak hücrel bozuklukları tespit edip tanı koymayı amaçlayan bir boyama yöntemidir. Özellikle kanser gibi zorlu hastalıklarda tanı koyma amacıyla bu yöntem çok sık başvurulmaktadır. Boyama işlemi sonrası görüntü taranıp bilgisayara atıldıktan sonra da farklı işlemlerden geçirilmektedir. Özellikle dijital histopatolojinin de geliştirilmesiyle ortaya çıkan yöntemler, hata oranının azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Görüntünün işlenmesi, hastalığın belirtilerinin ortaya çıkartılmasını ve görüntünün daha rahat incelenmesi sağlamaktadır. Özellikle FISH gibi farklı yöntemlerle birlikte kullanımı da işlemi kolaylaştırmaktadır.

Bilgisayarlı ön işlemlere başlanmadan önce, biyopsi ile canlıdan alındıktan sonra boyama işlemi gerçekleştirilen ufak parçalar, laboratuvarında bulunan mikroskopların lamelinin üzerine konmakta ve sahip olunan yüksek teknoloji fotoğraf makineleri ile çekilerek dijital ortama aktarılmaktadır. Dijital ortama aktarılan imge, direkt olarak incelenebilecek durumda incelenememektedir. Farklı etmenlere bağlı olarak görüntü üzerinde, gürültü ve boyama sırasında meydana gelen sıkıntılardan oluşan sorunlar meydana gelmektedir. Bu sorunların çözülebilmesi ve görüntünün incelenebilir

seviyeye gelmesi için boya normalleştirme (stain normalization) ve görüntü filtreleme (median filtering vb.) gibi çözümler kullanılmaktadır.

Histopatolojik işlemler sırasında birçok farklı boyama yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanması sonrasında, boya tipine göre farklı renkler ortaya çıkmaktadır ve görüntüler incelenmektedir. Ancak, aynı tip boyalar kullanılsa dahi, boyanmış doku parçaları üzerinde farklı renkte görünebilmektedir (Ciompi ve diğerleri, 2017). Bu sebepten de dijital ortamda inceleme sırasında boyanın bilinen özelliğine göre işlem yapılması sebebiyle farklı renkler yanlış sonuçlar doğurabilmektedir. Ortaya çıkan renk çeşitliliğinin önlenmesi amacıyla, renk-boya normalleştirme yöntemi denenmiştir. Öncelikle, RGB olarak elde edilen görüntünün tamamen gri ölçekli bir resme çevrilmesiyle farklı renk varyasyonlarının düzeltilmesi amaçlanmıştır. Ancak gri tonlu görüntüye çevrilmesi sonucu yüksek miktarda veri kaybı yaşanmaktadır. Çünkü boyama sırasında sahip olunan renklerin her birinin farklı verilere sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bu durumda, gri tonlamalı görüntülerde veri kaybı olduğu için net tanı da zorlaşmaktadır. Bu sebeple, olması gereken renkleri görüldüğü şekilde bırakarak görüntü kirliliği yapan farklı renkleri ayrıştırmak amacıyla, birçok farklı renk normalleştirme algoritması geliştirilmiştir. Bu tip algoritmalar histopatolojik tanı koyma yöntemlerinde büyük önem arz etmektedir. Hedeflenen görüntüye ulaşma sırasında birçok farklı aşamalardan geçilmesi gerekmektedir ve bu durum yeni araştırmalarla güncellenmektedir. Tablo 2’de birçok farklı histopatolojik renk normalleştirme yöntemleri, amaçları ve getirdiği avantajlarla birlikte açıklanmaktadır (Roy, ve diğerleri, 2018). Detaylı tablo Ek-2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Histopatoloji Görüntüleri İçin Farklı Renk Normalleştirme Yöntemleri (Roy ve diğerleri, 2018)

Amaç	İşlemler	Avantajlar
Histogram Tanımlaması (1992)	• RGB görüntünün $l\alpha\beta$ ($l*\alpha*\beta$) boşluğuna dönüştürülmesi. • Kaynak görüntünün histogramı ile hedef görüntü histogramının eşleştirilmesi.	• İşlenmiş görüntü ile hedef görüntüsünün aynı renk doygunluğuna sahip olması.

		• $l\alpha\beta$ ($l*\alpha*\beta$) görüntüsünden RGB dönüşümü.	
Bağımsız Bileşen Analizi (Independent Component Analysis, ICA) ve Negatif Olmayan Matris Çarpanlara Ayırma (Non-negative Matrix Factorization, NMF) Metotlarını Kullanarak Tayf Ayırımı (2002)	• Boya renk matrisinin (S) ve boyanın derinlik matrisinin (C) katsayılarının pozitif olduğu yerlerde NMF metoduyla çarpanlarına ayrılması • Matriste Özdeğerlerinin Ortak Yaklaşım Köşegenleştirilmesi (Joint Approximate Diagonalization of Eigenmetrics, JADE) yöntemi ile ICA ayrıştırma metodu ile bağımsız bileşenlerin kullanılması.	• Gözetimli metotta uygulanan tahminin aksine burada bütün katsayıların tahminine gerek yoktur. • Tekli Ayrıştırma Yöntemi aksine, burada negatif değer içeren katsayının bulunmaması.	
Işık dalgalarının birbirine karışması ile ortaya çıkan koyu çizgilerin uygulanması (Fringing) yöntemi (2009)	• RGB görüntüden Optik Yoğunluk (Optical Density, OD) formatına dönüşüm. • Tekli Ayrıştırma Yöntemi yapılması ve matristeki en büyük tekil değerlerin kullanılması ile yeni bir düzlem çıkarılması. • Yeni düzleme sahip olunan değerlerin aktarılması ile açılarının bulunması. • Sahip olunan en büyük ve en küçük açı değerleri α^{th} ve $(100-\alpha)^{\text{th}}$ yüzdelik yöntemi ile net bir şekilde bulunması.	• NMF metodunda ortaya çıkan belirsizlik sorununun bulunmaması. • S matrisinde negatif değer içeren katsayı bulunmaması.	

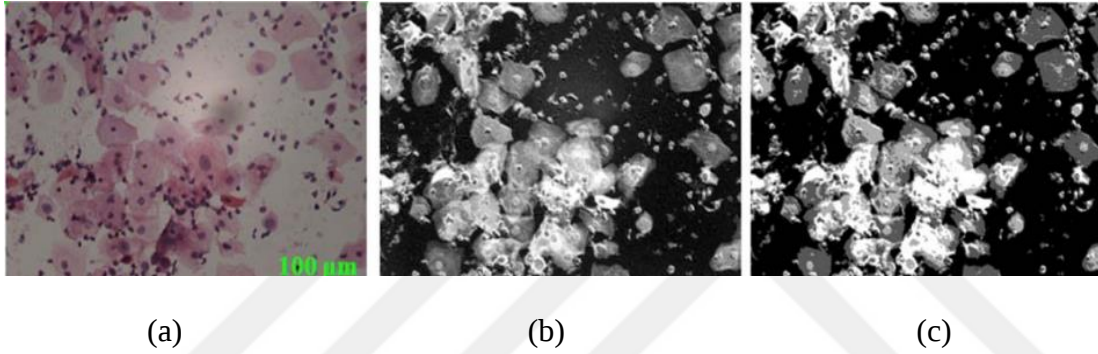
-
- Ekstrem değerlerin OD boşluğuna geri döndürülmesi.
-

Renk normalleştirme yöntemi Tablo 2’de gösterildiği üzere, çok farklı metotlar içermektedir. Zamanla farklı metotlar kullanım amacına göre düzenlenerek birçok farklı yol ve isim almıştır. Burada WSI ile bilgisayar tabanlı bir görüntüleme sistemi içermesi de etkili olmuş ve yapay zekâ ile alakalı makine öğrenmesi ve derin öğrenme yöntemleriyle uygun kullanma alanına sahip olmuştur.

Görüntülerin ayrıştırılıp, net bir şekilde çekirdek ve sitoplazma ayrımı ile görüntü biraz daha anlaşılabilir hale geldikten sonra, yapılabilecek bir diğer işlem de filtreleme işlemidir. Bu işlem görüntü üzerindeki gürültünün yok edilmesi ve net bir görüntünün elde edilmesi amacıyla yapılmaktadır. Gürültüler genellikle, imgenin sahip olduğu renk değerlerinin veya parlaklığının rastgele yer değiştirmesidir. Bu gürültüler görüntünün alındığı elektrik ile çalışan dijital cihazların, görüntü kaydedilirken sebep olduğu elektrik dalgalanmaları veya istenmeyen sinyaller sonucu oluşmaktadır ve sebebine göre farklı isimler de alabilmektedir. Genel olarak sınıflandırılması toplamalı, çarpımlı ve vuruş şeklinde yapılabilen gürültüler içerisinde alt başlıklarla farklı isimler almaktadır ve bu görüntü kirlilikleri gaussian gürültüsü, ayrı ayrı da olabilen tuz ve biber (salt and pepper) gürültüsü, poisson gürültüsü ve speckle (benek) gürültüsü olarak adlandırılmaktadırlar (Joshua ve diğerleri, 2019).

Tuz ve biber (impulse) kirliliğinde sahip olunan gürültü isminden de anlaşılacağı üzere, görüntünün üstünde sıfır piksel değeri ile tuz gibi ufak beyaz noktaların oluşması ve biber tanecikleri gibi siyah noktaların oluşmasına sebep veren gürültülerdir. Gauss gürültüsü ise, gauss dağılımı olarak da bilinen normal dağılımına eşit, olasılık yoğunluk hesabına göre tanımlanan istatistiksel bir gürültüdür ve bu gürültü sırasında piksel değerlerin değişmesiyle oluşmaktadır. Tüm bunlara ek olarak, Gauss gürültüsü sırasında meydana gelmesi gereken Gauss dağılımının anlaşılabilmesi için, görüntünün renk sıklığını belirten histogramın takibi gerekmektedir ve bu değerlerin takibiyle gürültü hakkında yorum yapmak da kolaylaşmaktadır (KÜPELİ ve BULUT, 2020). Yükseltici olarak da bilinen bu gürültü, Gauss dağılımı ilkesi ile görüntü elde edilmesi sırasında, ortaya çıkmaktadır.

Poisson veya foton atışı gürültüsü, Gauss dağılımı ile yakınlığı olmasından ötürü istatistiksel bir özellik içermektedir. Ancak bu durum, elektromanyetik dalgaların etkisi ile fotonların atışı sırasında yeterli istatistiksel verinin alınmamasından kaynaklanmaktadır (Rohit ve Ali, 2013). Speckle (benek) gürültüsü, yol açtığı görüntü bozukluğu açısından tanecikli olması sebebiyle tuz ve biber gürültüsüne benzemesine rağmen, meydana gelmesi bakımından ve çarpımlı bir gürültü olması bakımından gauss ve tuz&biber gürültülerinden farklıdır. Radar görüntülerinde gönderdiği sinyalin dönüş yolundaki değişikliği sebebiyle ve ultrason görüntüleme cihazlarında ses dalgası vurularının kendisine eşit değerde bir parazit yapması sonucunda ortaya çıkmaktadır (Maity ve diğerleri, 2015).



Şekil 13. H&E boyasının uygulanan görüntünün Gauss gürültüsü sonrası işlenmesi; a) Orijinal renkli görüntü, b) Kontrast geliştirmesi ve gürültü gidermesi, c) Multiple thresholding (Çoklu eşik belirleme) (L. Zhang ve diğerleri, 2014)

Görüntüler, sahip olduğu renklerinin değerlerini belirten piksellerin oluşturduğu büyük bir matristir. Gürültüler de, bu piksellerin her birinin üzerindeki değer kaymaları olarak bilinmektedir. Bu sebepten ötürü de, uygulanacak her düzeltme işlemi piksel ve onun yanındaki komşularına uygulanmaktadır. Uygulanan bu işlemler filtreleme olarak adlandırılmaktadır. Her bir filtreleme işlemi üzerinde uygulanan farklı matematiksel işlemler bulunmaktadır ve her biri, piksele uygulanan bu işlemlere göre adlandırılmaktadır. Bu filtreleme işlemlerinin amacı, gürültünün sebep olduğu görüntü bozukluklarını tamamen ortadan kaldırmak ve bunu her piksele uygularken, imgenin kenarlarının özelliğini kaybettirmeden yapabilmektir.

Filtreler öncelikle sinyalin işlenmesine bağlı olarak doğrusal ve doğrusal olmayan şekilde ayrılmaktadırlar. Çünkü lineer olan filtrelemeler, resim üzerindeki sinyal bozukluğunu giderirken daha çok, hızlı olarak düşük geçiş filtreleri ve yumuşatma

işlemini uygulayarak gerçekleştirilmektedir (veya bu durum doğrusal işlemlerin farklı girişten ayrı ayrı gerçekleştirilip ardından bu işlemleri bir araya getirmek olarak da tanımlanabilmektedir) (Kaur, 2015). Bu sebepten ötürü, görüntünün detaylarını tam olarak koruyamamaktadır. Ayrıca, görüntünün kenarlarında bulanıklaşma ve görüntü içerisindeki bazı ayrıntıları yok etmesi gibi olumsuz etkileri de bulunmaktadır (Smith ve Brady, 1997). Ancak bu işlem doğrusallık açısından faydalı görünmektedir. Lineer olmayan filtreleme işlemlerinde ise bu durum tam tersi şekilde olmaktadır. Detaylar daha iyi korunmakta ve görüntü içerisinde fazla kayıp olmadan görüntü işlenmektedir. Bu sayede imgenin kenarlarında etkili bir şekilde korunması sağlanmaktadır. Ancak yapılan işlemler doğrusal filtreleme işlemlerine göre daha zor ve bu sebepten daha yavaş gerçekleşmektedir. Ayrıca doğrusal olmayan filtreler, merkezdeki piksele aynı işlemin uygulanmamasından kaynaklanmasıyla da ayrılmaktadır. Daha iyi sonuçlar için filtrelemeler, gerçekleştirilecek işlemin çeşidine göre daha dikkatli seçilmekte ve iki işlem bir araya getirilerek eksik yanları azaltılmaktadır.

Filtreleme işlemlerinde yapılan matematiksel işlemlerin uygulanabilmesi için de 3×3 , 5×5 veya 7×7 boyutunda matrislerden biri kullanılmaktadır. Doğrusal olan ve doğrusal olmayan şekilde ayrılan bu matrisler, kare matris şeklinde parça parça görüntü matrisleri üzerinde işlemlerin gerçekleşmesiyle sorunlu ana görüntüden düzeltilmiş yeni bir matris ve görüntü ortaya çıkarmaktadır. İlk olarak uzaysal ve lineer olan Ortalama (Mean) filtreleme, uygulandığı imgenin boyutuna da göre kare matrislerden biri, adından da anlaşılabilceği üzere bulunduğu bu alan üzerinde çarpma işleme uygulanarak ortalaması alınıp yazılmaktadır ve bu işlem her piksel için yapılmaktadır. Bir diğer lineer teknik ise Wiener filtreleme işlemidir. Eklemeli ve istatistiksel bir işlem olan Wiener, tasarımı için sinyalin en yakın uzaysal değerleri ile birlikte doğrusal zaman değişkenli işlemler ile benzerlik oranının yakınlığının hesaplandığı ortalama kare hatasını en aza indirerek filtreleme yapmaktadır (Patidar ve diğerleri, 2010). Uyarlamalı (adaptive) filtre ise lineer filtreler içerisinde diğerleri gibi istatistiksel şekilde işlem yapsa bile, daha seçici olan olarak görülmektedir. Çünkü doğrusal filtrelerin sahip olduğu görüntü kenarlarındaki ve yüksek frekansta ortaya çıkan problemleri en aza indirmektedir.

Lineer olmayan filtreler, merkezdeki piksele odaklanmaksızın filtrenin temas ettiği alandaki filtrenin sonucuna göre hareket etmektedir. Maksimum ve minimum filtreleri

çarpıldığı filtrenin çıkışında ortaya çıkan sonuçlardaki en yüksek veya en düşük değeri karşılaştırarak değeri yerleştirmektedir. Bu filtreler tuz-biber gürültüsünde etkili olarak uygulanabilmektedir. En etkili ve en güçlü olarak kullanılan doğrusal olmayan filtre ise medyan filtresidir. Verimli bir şekilde ve basit olarak uygulanan bu filtre, her ne kadar doğrusal ortalama filtre ve minimum-maksimum filtresi ile yapılan işlemler açısından bazı benzerlikler gösterse de, görüntüdeki detayları daha iyi düzeltmesiyle onlardan ayrılmaktadır. Bu işlemde, aynı 3x3, 5x5 veya 7x7 bir matris ile görüntünün tüm alanı parça parça taranmaktadır ve işlem sonucu taranan bölgedeki piksel yoğunluk veya matris değerleri medyan işleminden geçerek küçükten büyüğe sıralanmaktadır. Ortanca değer komşu piksellerin değerleri ve yerleri değiştirilmeden, sadece taranan alanın ortasındaki bölüme yeni piksel değeri olarak atanmaktadır. Böylece detay ve keskinlik değeri açısından lineer filtrelemelere karşı çok daha etkili görünmektedir ve ayrıca gürültüyü daha büyük alanlarda daha etkili şekilde ortadan kaldırmaktadır (Singh ve Shree, 2016). Ancak, kenar değerleri keskinleştirme açısından iyi uygulanması önemli bir farklılık olarak görülse bile, bazı durumlarda medyan filtre tam etkili olarak da çalışamamakta ve ortalama filtreleme gibi filtreler ile kenarların düzeltilmesi amacı ile beraber kullanılabilmektedirler (Lee ve Kassam, 1985).

İşlemlerin yapıldığı alanın amacıyla alanın belirlenmesi amacıyla görüntü işleme tekniklerine ek olarak binary mask (ikili maske) işlemi uygulanmaktadır. Binary sistem bilindiği üzere ikili renk sistemini belirtmektedir ve bu renkler de siyah ve beyazdır. Bu sebeple binary ile uygulanan matris sadece 0 ve 1 değerlerinden oluşmaktadır.

Maskeleme yönteminde, bir RGB veya gri alan içeren görüntünün istenen kısmını ikili görüntüye çevrilmektedir ve bu görüntü daha sonra maskeleme için kullanılmaktadır. Başka bir açıdan bakıldığında bir görüntünün bir parçasının kesip çıkarılması olarak da tanımlanabilmektedir. Alınan ikili görüntü maskeleme için orijinal görüntüye uygulandığında, çıkış görüntüsünde istenen bölgenin değiştirilmesini sağlamaktadır.

FISH Görüntüleri için Yapılan Ön İşlemler: FISH görüntüleri, dokunun yapıldığı yer açısından in situ olarak yerinde olması sebebiyle H&E boyama yönteminden ayrılmaktadır. Ayrıca, doku üzerinde yapılan işlemler sonucu alınan görüntüdeki

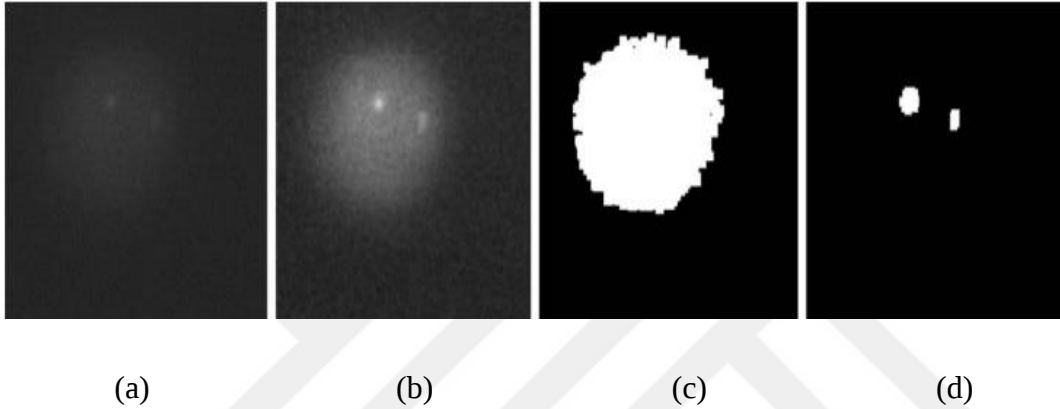
renkler de kullanılan boyaya göre ayrılmaktadır. Floresan içermesi onu görünmesi gereken yerin parlaması ile belirlenmesini sağlamaktadır. FISH yönteminde dokuya uygulanan işlem vücut içerisinde olabileceği için H&E yöntemindeki gibi mikroskop ve etrafında görüntü alacak kameralara gerek kalmamaktadır. Dijital ortama aktarılması için de herhangi bir aktarıma gerek yoktur, çünkü zaten direkt olarak bilgisayara kayıt edilmektedir. Ancak her ne kadar direk dijital alana kayıtlı olsa da, H&E gibi diğer boya türlerinde olduğu gibi imge üzerinde bir takım düzeltmeler yapılması gerekmektedir.

Görüntü üzerinde öncelikle FISH boyama yönteminden kaynaklı içerdiği floresanın ışıması sonucu meydana gelebilecek parlamaları ve ayrıca bu sebepten meydana gelen koyu noktalar oluşmaktadır (S. G. BALLARD ve WARD, 1993). Bu zıtlıkların meydana getirdiği farklılıkların düzeltilmesi amacıyla, görüntü sinyallerinin kontrastlarının ayarlanması gerekmektedir. Bu ayarlanmanın yapılabilmesi için yapılacak işlem gama düzeltmesi işlemidir. Bu işlem bir görüntü üzerindeki parlaklık değerlerini ayarlamaya yarayan ve doğrusal olmayan bir filtreleme işlemidir ve bu işlem için logaritmik düzenlemeler yapılarak, imgedeki kontrast oranı ayarlanmaktadır (Çetin ve diğerleri, 2018; Xu ve diğerleri, 2009).

FISH, her ne kadar H&E yönteminden farklı boyama tipleri, farklı renkler ve işlemler içerse de, etraftan kaynaklanan sinyal bozuklukları oluşabilmektedir. Bu yüzde alınan FISH görüntüsü üzerinde de, cihaz kaynaklı farklı gürültüler oluşabilmektedir. Bu gürültülerin yok edilmesi için, birçok farklı filtreleme yöntemi kullanılabilmektedir. Her türlü farklı gürültü altında bozukluk içerebilen FISH görüntüleri bu sebeple, doğrusal ve doğrusal olmayan fark etmeksizin filtreleme yöntemleri ile işleme alınabilmektedir. Etkili olarak işlenmesi için medyan filtreleme gibi lineer olmayan yöntemler tercih edilmektedir. Ancak buna ek olarak, lineer bir yöntem olarak Gauss filtreleme yöntemi de etkin şekilde kullanılmaktadır.

Doğrusal bir filtre olan Gauss filtreleme işlemi, gürültü azaltılmasında kullanılan bir görüntü kirliliğini indirgeme işlemidir. Bu işlem Gauss fonksiyonunun görüntü matrisi üzerine uygulanması yoluyla gerçekleşmektedir. İçerdiği standart sapma değeri ve onun karesi sonucu ortaya çıkan varyans değeri ile farklı boyutlardaki piksel değerlerine olan uzaklık ve logaritmik değer ile hesaplanmaktadır (Aurich ve Weule,

1995). Ancak buradaki ana etken, standart sapma değeridir. Çünkü standart sapma değeri, resmin bulanıklaşma değerini ve buna bağlı olarak gürültünün etkisini değiştirmektedir. Ayrıca, Gauss filtresi doğrusal bir filtre olmasından dolayı da değer arttıkça ve filtre büyüdükçe kenar değerleri kaybolmaktadır. Bu da görüntüyü daha bulanık hale getirmektedir. Bunun engellenmesi sebebiyle, farklı filtreler kullanılarak imgenin önceden işlenmesiyle kenarların kaybolmaması sağlanmaktadır veya görüntü matrisinin sahip olduğu varyans değerinin gürültünün derecesine, olduğu bölgeye ve imgenin kenarlarına göre ayarlanmasıyla çözülebilmektedir (Deng ve Cahill, 1994).



Şekil 14. Ön işlem uygulanmış bir FISH hücresi; (a) Muhtemel bir FISH hücresi; (b) Kontrast ölçeklendirmesi ve Gauss filtresi ile ön işlem yapılmış hücre ; (c) Ayarlanabilir eşik belirleme ve bölütleme uygulanmış FISH hücresi; (d) Bölütleme uygulanmış FISH sinyalleri (X. Wang ve diğerleri, 2012).

Tüm bunlara ek olarak ikili maskeleme yöntemi H&E metodunda kullanıldığı gibi, FISH işleminde de kullanılmaktadır. H&E kısmındaki işlemler benzer şekilde burada da gerçekleşmektedir. Ayrıca, FISH işlemi için bir sonraki aşamalarda meydana gelebilecek eşik belirleme kısmında da önemli yer tutmaktadır. Eşikleme, belirlenen bir değer ile görüntü matrisinin her bir piksel değerinin karşılaştırılması işlemidir. Bu eşik değerinin altındaki pikseller bir bit değerine veya siyah renge, üstündeki piksel değerleri ise sıfır bit değerine veya beyaz renge dönüştürülmektedir. Böylece eşik değeri sayesinde görüntünün ön veya arka planının ayrıştırılması sağlanmaktadır. Bu işlem tüm görüntüye uygulanabileceği gibi, farklı bölgelere ayrı olarak da uygulanabilmektedir. Burada da kernel boyutunun belirlenmesi, uygulanacak eşiklemede matrisin belirlenmesinde önemli yer almaktadır.

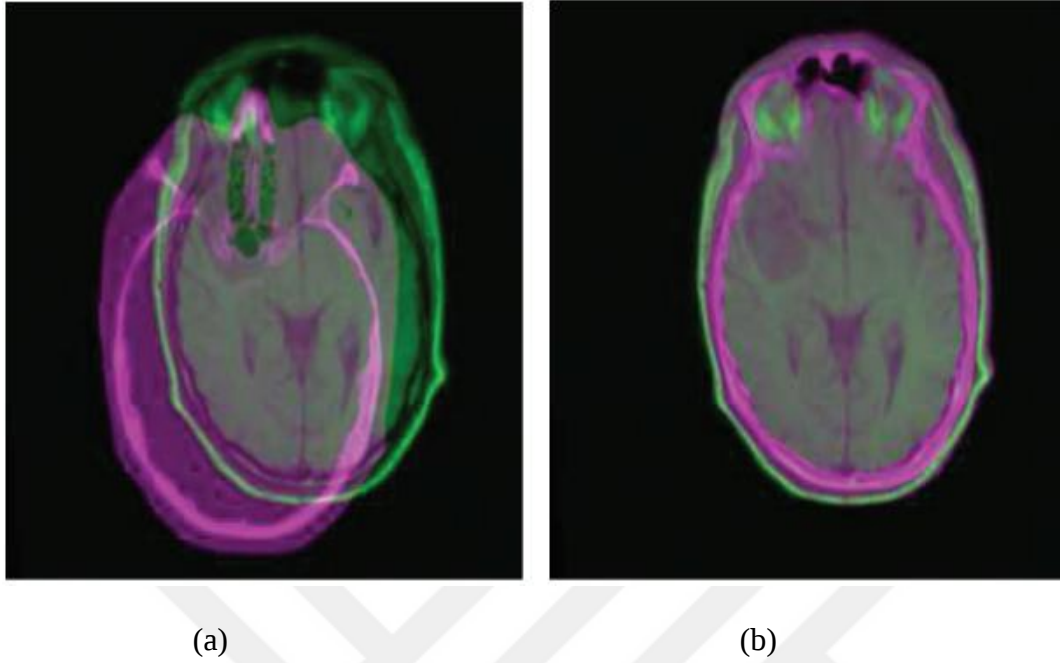
2.2.2. İmge Çakıştırma Teknikleri

Görüntü işleme teknikleri içerdikleri farklı yöntemler sayesinde uzun yıllardır farklı alanlarda kullanılmaktadır. Elde edilen görüntülerin verimli şekilde kullanılabilmesi ve farklı alanlarda istenilen sonuçların alınabilmesi gerekmektedir. Bu sebeple görüntülerin sınıflandırması, bölütlenmesi (segmentasyon) ve eşleştirilmesi gibi farklı işlemler yapılmaktadır. Özellikle medikal görüntü işleme alanında segmentasyon yöntemi ve imge çakıştırma (İÇ) işlemleri daha popüler olarak kullanılmaktadır. Çünkü medikal görüntüler, alındıkları yere bağlı olarak yerinde veya parça alınarak mikroskop altında incelenmektedir ve bu işlemler için kullanılan boyalar hücre içerisinde çekirdeği hedef alarak nano boyuttaki DNA ve RNA sarmallarını etkilemekte ve onları sitoplazma ile etkin olan boya tipine göre farklı renklerde göstermektedir. Bu renklerin daha anlaşılabilir halde olabilmesi için görüntülerin bölütlenmesi ve parça parça incelenmesi veya var olan görüntüler ile çakıştırılarak sonuca varılması gerekmektedir.

Segmentasyon yönteminde, özellikle farklı renklerde olan yerleri ayrı şekilde anlamlı bir düzlemde alarak incelemektedir. Bu işlemi de, daha kolay hale getirebilmek amacıyla eşikleme işlemi uygulanmaktadır. Çünkü eşikleme yöntemi sayesinde belirlenen değer ölçüsünde, ortaya çıkan görüntü daha rahat bir şekilde elde edilebilmektedir. Özellikle gri seviye içerisinde uygulanan eşikleme işlemi, bölütlemenin daha basit bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır.

İÇ işlemi için farklı kaynaklardan veya sensörlerden ve farklı zamanlarda gelen görüntüler kullanılabilir. Bu görüntüler daha sonra aynı koordinatlar altında bir araya getirilerek incelenmektedir ve bu sayede her görüntünün içerdiği farklı eksikliği tamamlayarak daha net bir sonucun elde edilmesi sağlanmaktadır. Bu işlem birçok farklı işlem için kullanılabilir. Tıbbi alanda hastalık tespiti amacıyla elde edilen görüntülerin birleştirilmesi ile zayıf noktaların eşleştirilmesi ve tanı koyulması sağlanmaktadır. Bu işlem için aynı yerde farklı zamanlarda çekilmiş görüntüler kullanılmaktadır. Özellikle medikal görüntüleme işlemleri için kullanılan manyetik rezonans (MR) ve bilgisayarlı tomografi (BT) görüntüleme yöntemleriyle farklı görüntüler alınabilmekte ve eşleştirilebilmektedir. Şekil 14'te gösterilen beynin BT/MR görüntüleme yöntemiyle alınmış ve farklı kontrastlarla ayrılmış örneklerin üzerinde yapılan İÇ işlemidir ve sürecin öncesi ve sonrası gösterilmektedir (Denis De

Senneville ve diğeri, 2016).



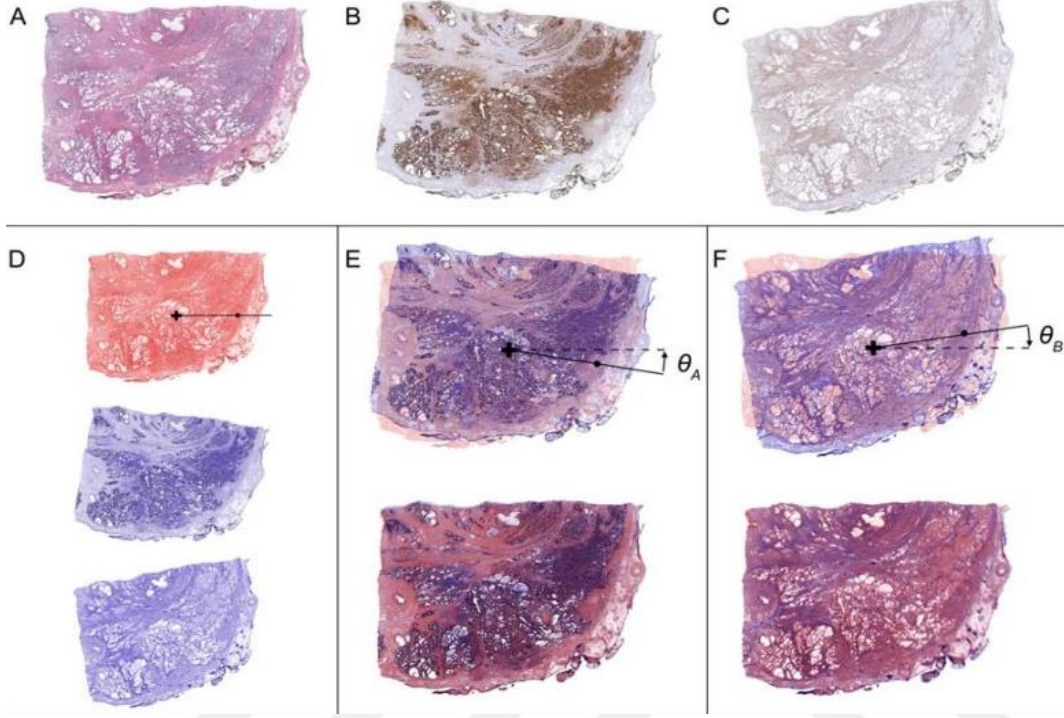
Şekil 15. Beynin transversal görüntüsüne farklı kontrastlarda İÇ uygulanması ; (a) İÇ öncesi
(b) İÇ sonrası (Denis De Senneville ve diğeri, 2016)

Tüm bu işlemler içerisinde dâhil olan uzaysal ve içsel değişim süreçleri içerisinde önemli olarak kullanılan metot, dönüşüm (transformation) olarak adlandırılmaktadır. Bu metot, diğer işlemlerle beraber etkin bir şekilde de kullanılmaktadır. Dönüşüm metodu aslında, tüm bu görüntülerin sahip olduğu piksel değerlerinin oluşturduğu matrislerin üzerinde değişim yapılmasına olanak veren matematiksel lineer cebir örneğidir. Bu işlem içerisinde, referans matrislerin üzerine düzeltilme yapılmak istenen gereken bölgenin üzerine eklenen bir işlemdir.

Dönüşüm matrisi, kendi içerisinde yapıldığı işlemler üzerinden geometrik dönüşüm ve benzerlik dönüşümü olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu ana temel dokunuşlar içerisinde de farklı içerisinde farklı gruplara ayrılmakta ve 2 boyutlu veya 3 boyutlu uzaysal işlemlerde farklı şekillerde uygulanabilmektedir.

İÇ karşılaştırma işlemleri kendi içerisinde farklı metotlara ayrılmaktadır. Bu metotlar, otomatik etkileşimli olarak iki ana temelden oluşsa da, alt başlıklarında öncelikle benzerlik dönüşümü olarak yoğunluk bazlı (intensity based) ve özellik bazlı (feature based) ; model tabanlı (model based) veya genel bazda; geometrik kısımlarda ise, çalışma aralığı olarak frekans veya uzaysal noktalarda; karşılaştırma içerisinde

geçirebilecekleri dönüşüme göre katı (rigid), afin (affine) ve yansıtma metotlarda; farklı sensörlerle çekilip, kaydedilmesine bağlı olarak da tekli ve çoklu modelleme yöntemleri olarak incelenmektedir (Lukashevich ve diğerleri, 2011).



Şekil 16. H&E lekeli imgenin referans bölümü görüntüleri ile İÇ yöntemi kullanılarak düzeltilmiş görüntüler ; (A) Ana görüntü; (B) ve (C) ve farklı yöntemlerle elde edilmiş doku örnekleri; (D) Çakıştırma için tek renk haline getirilmiş görüntüler; (E) Temel görüntü baz alınarak, hatayı en aza indirmek amacıyla İÇ ile döndürülmüş görüntü ; (F) Benzer şekilde ancak farklı bir açıyla ana görüntü baz alınarak, hatayı ortadan kaldırma amacıyla İÇ ile döndürülmüş görüntü (Metzger ve diğerleri, 2012)

Geometrik tabanlı dönüşüm metotlarında katı (rigid) olarak uygulanan metot üzerinde uygulanan işlemler sadece dönme (rotation) ve öteleme (translation) olarak, katı olmayan (non-rigid) formasyonunda döndürme, öteleme, ölçek bilgisi (inform-scale) şeklinde ve afin dönüşümü ise aynı işlemlere ek olarak kayma işlemi (shearing) uygulanarak yapılan işlemdir (Oliveira ve Tavares, 2014). Referans olarak kullanılan görüntünün, ana görüntüyle eşleştirilmesi amacıyla kullanılan bu dönüşüm işlemleri için T matrisindeki koordinatlara işlemler uygulanmaktadır (Athanasίου ve diğerleri, 2017).

Tablo 3. Dönüşüm İşlemleri Sırasında Kullanılan Modeller (Athanasious ve diğerleri, 2017)

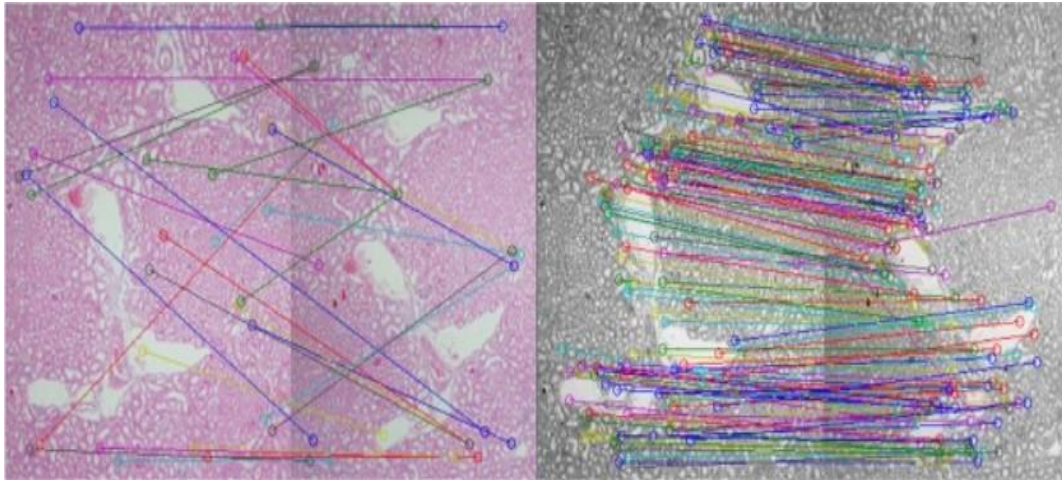
İşlemler	Formülasyon
Döndürme	$x' = x \cdot \cos \theta - y \cdot \sin \theta \text{ ve } y' = x \cdot \sin \theta + y \cdot \cos \theta$ $\begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} \quad (1)$
Öteleme	$x' = x + d_x \text{ and } y' = y + d_y$ $\text{Nokta için } P(x, y); P = \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}, P' = \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix}, T = \begin{bmatrix} d_x \\ d_y \end{bmatrix} \text{ ve } P = T + P'. \quad (2)$
Ölçeklendirme	$x' = s_x \cdot x \text{ ve } y' = s_y \cdot y \text{ veya } \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} s_x & 0 \\ 0 & s_y \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$ $P'(x, y'); P = S \cdot P', \quad S = \begin{bmatrix} s_x & 0 \\ 0 & s_y \end{bmatrix} \quad (3)$
Kayma	$T_{scale}(x, y) = \begin{bmatrix} x' \\ y' \end{bmatrix} = S \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}$ $SH_x = \begin{bmatrix} 1 & a & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ ve } SH_y = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ b & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (4)$ "a" ve "b" sırasıyla x ve y eksenini içerisindeki sabit değerler

Özellik tabanlı metoda bağlı işlemler, bu dönüşüm hesaplamaları ile beraber kullanıldığında daha iyi sonuçlar alınabilmektedir (Yasein ve Agathoklis, 2008).

İÇ birçok metoda bağlı olarak yapılabilmektedir. Ancak temel olarak, özellik tabanlı metod ve onun içerdiği aşamalar çoğunlukla tercih edilmektedir. Bu yöntemler ilk olarak özellik tabanlı yöntem girişi ile başlamaktadır. Arkasından sırasıyla, hem referans olan görüntü üzerinden hem de çekilmiş görüntülerdeki köşe, kenar, sınırlandırılmış alan ve çevre gibi görüntü özelliklerinin manuel veya bir algoritma ile otomatik olarak uygulanması ile benzer veya farklı detaylara bakılarak özellik tespiti (feature detection), detaylara bakılarak tespit edilen özelliklerin oluşturulan kontrol noktaları vasıtası ile imgeler arası ilişki kurulması olarak özellik eşleştirme (feature

matching), yakalanan görüntünün baz alınan görüntü ile hizalanarak yapılması gereken işlemlerin ayarlanması yoluyla dönüşüm modelinin tahmin edilmesi (transform model estimation) ve yapılan düzeltme işlemleri sonrası referans görüntü üzerinden tekrar düzeltilerek, yeniden haritalandırılarak ve bu işlemlerin interpolasyon tekniği kullanılarak yapılması ile imgenin yeniden örneklendirilip dönüştürülmesi (image resampling and transformation) işlemleri yapılmaktadır (Wyawahare ve diğerleri, 2009). Sırasıyla yapılan bu işlemler içerisinde, en dikkat edilmesi gereken yerlerden biri, farklı şekillerde seçilebilen kontrol noktası veya kilit nokta (keypoint) olarak nitelendirilen değerlendirme noktalarının doğru seçilmesidir. Çünkü diğer özelliklere bakılarak yapılan işlemler öncesi, bu noktaların seçilmesi gerekmektedir ve bu noktalar görüntünün farklı yerlerinden seçilebilmektedir. Özellikle ön işlemler sırasında köşelerde ve kenarlarda meydana gelen veri kaybı ihtimali düşünüldüğünde, bu işlem daha da zor hale gelebilmektedir.

Özellik tabanlı yapılan tüm işlemlerin en önemli amacı, ortaya çıkan sonucun boyamalar arası farklılıkları doğru ve sağlam şekilde yansıtmasıdır. Bu işlemleri özellik tanımlaması olarak gerçekleştiren en önemli algoritmalar ise, Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü (Scale Invariant Feature Transform, SIFT) ve Hızlandırılmış Kararlı Özellikler (Speeded Up Robust Features, SURF) olarak adlandırılmaktadır (Borovec ve diğerleri, 2018).



(a)

(b)

Şekil 17. H&E uygulanmış bir dokunun SURF ve SIFT algoritmaları uygulanmış halleri (a) SURF ; (b) SIFT (C. W. Wang ve diğerleri, 2014)

Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü: Ölçek Değişmez Özellik Dönüşümü (Scale Invariant Feature Transform, SIFT) yöntemi, Lowe tarafından geçen yüzyılın sonunda araştırılmıştır ve öncesinde kullanılan algoritmaları geliştirmek amacıyla da, görüntü üzerinde sahip olunan ve yapılan işlemler sonucu etkilenebilen öteleme, aydınlatma, döndürme ve ölçeklendirme gibi faktörlere karşı değişmez olarak kalan bazı bölgelerin belirlenmesini sağlamaktadır (Lowe, 1999). Bu yönleriyle ölçek değişmezliğine karşı eksikliğe, aydınlatma değişim hassasiyetine ve yansıtma bozulmasına duyarlılığına karşın farklılığı ile daha önce kullanılan algoritmalara karşın daha kullanışlı olarak görülmektedir.

SIFT algoritması özellik tabanlı bir uygulama olması sebebiyle, bu uygulamanın sahip olduğu içerikteki sıralama ile algoritma yürütülmektedir. Bu sebepten ötürü öncelikle bu uygulamadaki ilk işlem olarak anahtar noktalarının veya kontrol noktalarının tespit edilmesidir. Bu noktalar için de algoritma içerisinde farklı işlemler gerçekleştirilmektedir. Bu tarama işlemleri sayesinde görüntü içerisindeki kenar ve köşe gibi farklı noktalarda oluşabilecek sorunları indirgemektedir. Gerçekleşecek dört ana işlem sırasıyla ölçek boşluğunda ekstremum noktaların tespiti, anahtar noktalarının yerinin belirlenmesi, oryantasyon belirlenmesi ve anahtar noktalarının tanımlanması olarak anılmaktadır (Zhu ve diğerleri, 2013).

Ekstremum noktalar matematiksel işlemler içerisinde bilinen yerel maksimum ve minimum noktalarıdır. Bu işlemler türevsel işlemlerde grafiğin yön değiştirmesiyle bulunmaktadır. İlk aşama olan ölçek boşluğundaki ekstremum noktaların tespiti işleminde ise biraz daha farklı yöntemler kullanılmaktadır. Öncelikle, alınan bir görüntüye evrimsel Gauss filtresi, $G(x, y, \sigma)$, uygulanarak ölçek alanı hesaplanmaktadır.

$$G(x, y, \sigma) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-x^2+y^2/2\sigma^2} \quad (5)$$

$$L(x, y, \sigma) = G(x, y, \sigma) * I(x, y, \sigma) \quad (6)$$

Sonrasında bu işlem farklı ölçeklerdeki alanlara uygulanarak komşu ölçek alanları oluşturulmaktadır ve iki komşu ölçek alanı arasındaki fark veya Gauss'un Farkı (Difference of Gaussian, DoG) alınmaktadır.

$$D(x, y, \sigma) = (G(x, y, k \sigma) - G(x, y, \sigma)) * I(x, y) \quad (7)$$

$$= L(x, y, k \sigma) - L(x, y, \sigma)$$

Bu işlem, ortaya çıkan tüm sekiz komşu üzerinde uygulanarak yerel maksimum ve yerel minimum noktaları bulunmaktadır ve bu noktalar anahtar nokta adayı olarak seçilmektedir (Mahesh ve Subramanyam, 2012).

İlk aşamada birçok anahtar nokta adayı seçilmektedir. Ancak bu noktaların tamamı anahtar nokta olacak kalibrede olmayabilmektedir. Çünkü seçilen bazı noktalar gürültü ve ışıktan daha kolay etkilenebilmekte ve görüntüyü bozabilmektedir. Zayıf noktaların elenebilmesi için Taylor serisi adı verilen matematiksel seriyle eşik değeri belirlenmesi sonrası iki yönde gradyan alınmaktadır. Bu işlemde sonuç, gradyanın biri büyük diğerinin ufak olması durumunda kenar olarak, ikisinin de küçük olması durumunda köşe olarak algılanmaktadır (Brown ve Lowe, 2013).

Yönelim belirlenmesi işleminde, özellik tanımlaması işlemi yapılırken meydana gelen gradyan değişimlerinin yönlerine bakılarak baskın yön saptanmaktadır. Sahip olunan bu yönelim görüntünün döndürülme işlemi içerisinde değişmez olarak kalmasını sağlayarak konum bilgilerini açığa çıkarmaktadır. Sonrasında gradyanlarda meydana gelen yönelim hareketleri ile 360 derecelik 36 parçadan histogram oluşturulmakta ve bu sayede anahtar noktalar belirlenebilmektedir (Gonçalves ve diğerleri, 2011).

Önceki aşamalarda yapılan işlemler sonrasında, anahtar noktaların bulunması amacıyla yapılan yönelim hesaplamaları ve döndürülmeye karşı değişmez özellik sergilenmesi sonrası son işlem olarak, anahtar noktanın tanımlanması gerekmektedir. İlk aşamada önemli bir nokta olarak dönme değişmezliği ile sağlanan koordinasyon işlemi sonrası, 8*8 bir matris içerisindeki matristen gradyanlar ile her pikselde meydana gelen yönelimler alınarak ortada bir Gauss işlem merkezi oluşturmaktadır. Daha sonrasında ilk matrisin sahip olduğu her bir gradyan yönelimlerinin daha rahat koordine edilmesi amacıyla ikiye bölünerek, 4x4 alt penceresinde incelenmektedir. Özet olarak 8 yönden oluşan ve 2x2 toplam 4 parçadan oluşan bir kilit nokta ortaya çıkmaktadır (Ma ve diğerleri, 2017).

Hızlandırılmış Kararlı Özellikler Algoritması: Hızlandırılmış Kararlı Özellik (Speeded Up Robust Features, SURF) yöntemi isminden anlaşılabileceği üzere, Hessian

matrisinden temel alınarak tasarlanan ve SIFT yöntemine göre birkaç farklı işlemten geçirilerek daha hızlı hale getirilmiş versiyonudur ve bu işlemleri görüntü kalitesinde bir düşüş yaşanmadan gerçekleştirmektedir (Bay ve diğerleri , 2006).

Genel olarak SIFT benzer temel ilkelere dayansa da, SURF işleminde farklı detaylar hâkim olmaktadır. Nokta tespiti, özellik tanımlama gibi ana işlemler burada da yer almaktadır. Ancak uygulanma konusunda farklılıklar içermektedir. Görüntü matrisinde ilk işlemler sırasında kullanılan DoG metodu yerine kare filtreme ve integral görüntü uygulanarak daha net bir işlem gerçekleştirilmektedir ancak baştaki Gauss filtreleme işlemi aynı şekilde uygulanmaktadır (Patel, Patel ve Holia, 2015).

$$S(x, y) = \sum_{i=0}^x \sum_{j=0}^y I(i, j) \quad (8)$$

SIFT işlemine başlarken görüntü matrisine Gauss işlemi uygulanmakta ancak burada, Gaussyen'in Laplasyen'i (Laplacian of Gaussian, LoG) ile ikinci dereceden Gauss türevleri ile x noktasındaki bir Hessian matrisi oluşturulmaktadır.

$$H = \begin{bmatrix} L_{xx}(x, \sigma) & L_{xy}(x, \sigma) \\ L_{xy}(x, \sigma) & L_{yy}(x, \sigma) \end{bmatrix} \quad (5)$$

Bu işlem sonrası, son denklemde belirtilen matrisin determinanı ile benzer bir şekilde birçok ekstremum noktaları şeklinde anahtar noktalar elde edilmektedir. Bu işlem sonrasında maksimum olmayan noktaları zayıf noktaların elenebilmesi amacıyla, 9x9 bir matris ölçek σ değerini 1.2 olarak farklı katmanlardaki ve farklı boyutlardaki filtrelere 3x3x3 şeklinde bakılarak, 26 komşu ile karşılaştırılıp bakıldıktan sonra değerler büyük veya küçük olmasına göre özellik noktası olarak kabul edilmektedir (Durgam ve diğerleri, 2016).

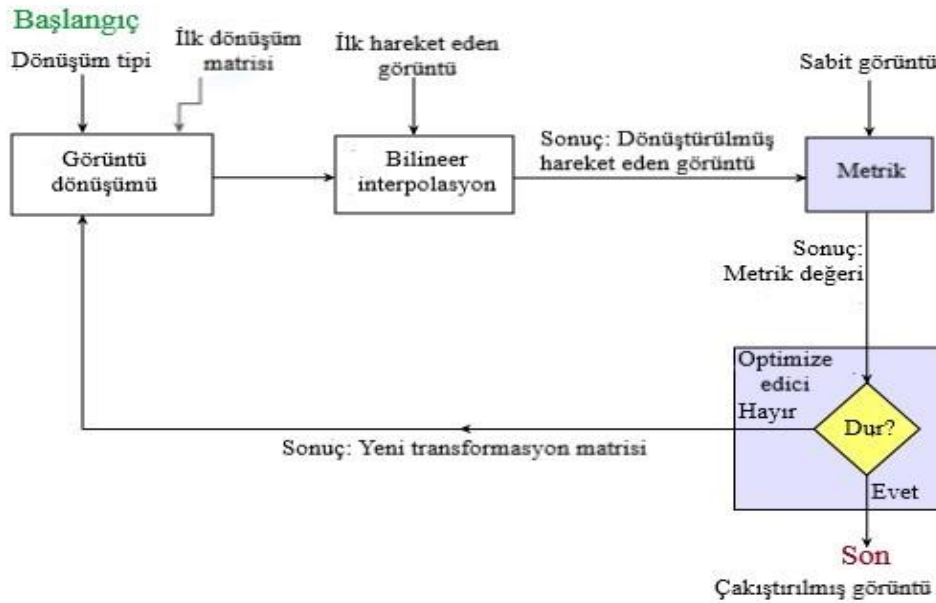
Yönelim belirlenmesi işleminde, özellik tabanlı uygulamalarda olduğu üzere dönme değişmezliğinin sağlanabilmesi amacıyla farklı bir işlem uygulanmaktadır. Haar işleminin ilk aşamasında bulunan noktaların çevresinde komşu bölgeleri kapsayacak bir alan içinde 4x4 boyutunda bir matrisle 60 derecelik bir açıyla dalgacıklar oluşturulmaktadır ve gelen yanıtlardan (gradyan hesaplamasına benzer şekilde) maksimum noktaların yönelim belirlenmesinin bulunması sağlanmaktadır. Devamında, 20x20 bir matris, 4x4 matris ile bölünmektedir. Oluşan Haar dalgacıklarının cevaplarının toplamı da 2x2 şeklinde, x ve y koordinatlarında dağılım

göstermektedir ve sonuç olarak da, 4x4x4 şeklinde her noktada 64 boyutlu tanımlama özelliği içermektedir (T. Zhang ve diğerleri , 2020). Bu sayede anahtar noktalar tespit edilmektedir.

Yoğunluk tabanlı yapılan işlemler, İÇ işlemlerinin içerisinde kullanılan önemli yöntemlerden biridir. Bu yöntem içerisinde, kullanılan işlemler özellik tabanlı işlemler benzer işlemler de içerse de, temel görüntünün ele alınması açısından farklı özellikler barındırmaktadır. Yoğunluk tabanlı işlemler, alınan iki görüntünün dönüştürülmeden önce yapılan işlemlerinde sahip olduğu piksel yoğunluk değerlerine odaklanmakta ve bu yüzden de benzerlik ölçüsünün alınması kısmı bu dönüşüm işleminde önemli bir yer tutmaktadır (Kim ve Fessler, 2004). İşlemlere bakılacak olunursa, öncelikle belirtildiği gibi öncelikle pikselin yoğunluk değeri hesaplanmaktadır. Bu hesap yapılırken yoğunluk farklarının derecelerini hesaplayarak en aza indirilmesi amaçlanmakta ve bu işlem yapılırken yoğunluk değeri tespitinde, korelasyon hesaplaması yöntemi ile metrik değeri atanmaktadır (Papademetris ve diğerleri, 2004). Sonrasında, görüntülerin tam hali veya alt kümesi halinde görüntüler oluşturulmaktadır. Sonrasında metrik değerinin doğruluğu hesaplanmaktadır. Bunun için de yinelenen (iterative) optimizasyon değeri atanmakta ve fazla tekrar ile metrik değerin benzerlik oranının ayarlanması sağlanmaktadır. Uygulanacak dönüşüm tipi ile birlikte hareket eden (genellikle yanlış hizalanmış) görüntü ve sabit (referans alınacak) görüntü arasındaki anahtar noktalarının tespiti sağlanmaktadır. Ek olarak dönüşüm matrisi üzerinde, noktaların yerinin tespiti amacıyla interpolasyon tekniği uygulanmaktadır. Bu teknik ile farklı noktaların dağılımı tahmini amaçlanmaktadır. Bu işlem sonrasında, hata oranının da tespiti amacıyla, aynı modelleme sayısına sahip görüntülerde Ortalama Karekök Sapması (Root Mean Square Error, RMSE) hesaplaması da yapılabilmektedir. Bu işlem noktalarda ortaya çıkan benzerlik oranı tespit edilerek, noktaların kolayca ayırt edilmesini sağlamaktadır (Klein ve diğerleri, 2010). Yapılan dönüşüm sonrasında, görüntüler karşılaştırılmakta ve metrik değeri hesaplanmaktadır. Maksimum yineme sayısına ulaşıldığında ve optimizasyon değerlerinde de sıkıntı olmadığı görüldüğünde işlem sona ermektedir. Bu işlemin özet hali Şekil 18’de gösterilmiştir.

İÇ işlemi içerisinde karşılaştırma yapıldığından sabit ve döndürülmüş olarak farklı görüntülerden yararlanılmaktadır. Bu sebepten dolayı, görüntüler aynı veya farklı

sensörlerden alınarak sırasıyla, tekli (mono-modality) ve çoklu (multi-modality) modelleme işlemini şeklinde sıkça kullanılmaktadır. Bu işlem geometrik, özellik ve yoğunluk tabanlı dönüşüm tiplerinin içerisinde yer almaktadır. Çünkü ana işlem konusu görüntü olduğundan, temel dönüşümlere girilmeden önce modelleme türü belirtilerek işleme giriş yapılmakta ve buna göre özellik noktaları belirlenmektedir.



Şekil 18. Yoğunluk tabanlı otomatik imge çakıştırma yöntemi algoritması (“Intensity-Based Automatic Image Registration - MATLAB & Simulink”, <https://www.mathworks.com/help/images/intensity-based-automatic-image-registration.html>)

2.2.3. Yöntemlerin Tezde Kullanımı

Yukarıda belirtilen SIFT ve SURF yöntemlerinin deneyde kullanılması gereğince yapılan işlemler kısaca burada anlatılmaktadır. Genel detaylar deneysel çalışma kısmında anlatılacaktır. Ana algoritma olduğu gibi burada da MATLAB® programı ve zaman zaman Python programlama dili kullanılmıştır.

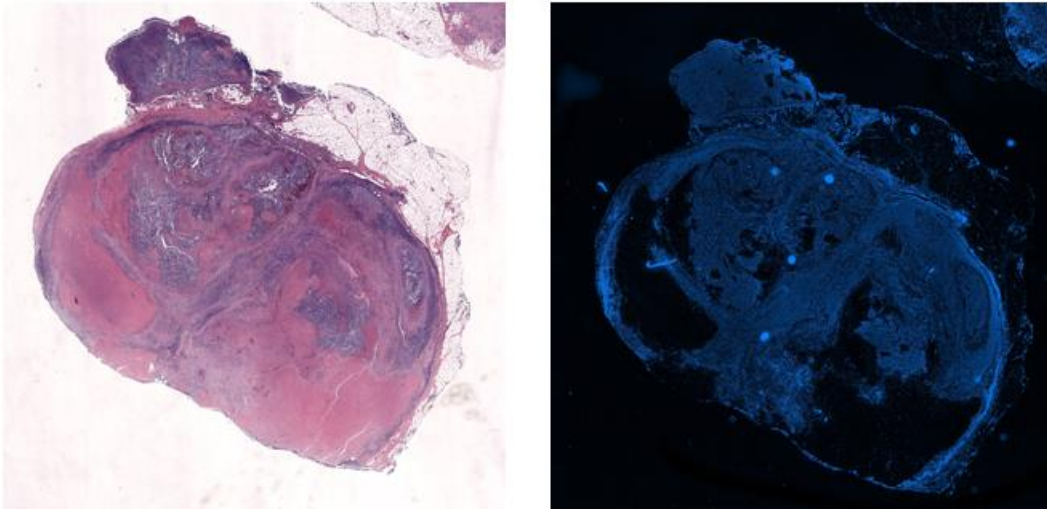
Öncelikle H&E ve FISH yöntemiyle elde edilmiş ve DAPI, FITC ve TR boyama teknikleri uygulanmış WSI parçaları, algoritmaların kullanılacağı bilgisayara aktarılmıştır. Daha sonra bilgisayardaki görüntüler ile önce algoritmaların içerisinde kullanılan döndürme, kesme, bulanıklaştırma, öteleme gibi farklı algoritmalar ile teker teker denenmiştir. Bu algoritmalar için, MATLAB® içerisindeki hazır kodlar uygulanmıştır. Elde edilmiş görüntüler, aynı klasör içerisinde tutularak, programın

alıştırılması sağlanmıştır. Sonuç olarak, İ işlemleri algoritmadan bağımsız bir şekilde düzgün çalıştırılmıştır. Bu işlemler sonrasında, dhili İ MATLAB® uygulamaları kullanarak SURF işlemi gerçekleştirilmiştir. SIFT uygulaması, dhili olarak MATLAB® 'da bulunmadığından ayrıca işlemler kodlar yazılarak denenmiştir. İşlemlerin karşılıklı denenmesi amacıyla Python programlama dili içerisinde denenmiş ve burada kaynak olarak OpenCV kütüphanesinin içerdiği kodlar ile SIFT, SURF ve MSER işlemleri uygulanmıştır. Sonuç olarak çıkan resimler karşılaştırılmış ve birbirine yakın eşleşmeler gözlemlenmiştir. Deneme sonrasında hazırlanan ana algoritmalar ile uygulanan eşleştirilen referans resimler ve kaynak resimler ile çalışma gerçekleştirilmiş ve sonuçlar elde edilmiştir.

MATLAB® uygulamasının içerisinde yazılan SIFT, SURF ve MSER uygulamaları sonucunda, dönüşüm matrisleri ile birlikte çakıştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, çakıştırma amaçlı H&E ve FISH görüntüleri içerisinden belli bir kısım kırıpılarak ve kontrol noktaları işaretlenerek beş adet veri seti oluşturulmuştur. ıkan her bir veri seti içerisinden hata oranı hesaplanarak, diğer dönüşüm işlemlerinden farklı olarak uygulanan MATLAB® işlemiyle, RMSE oranı hesaplanmıştır. Son olarak da, görüntülerin akıştırılmaması durumunda ortaya çıkacak sonucun görülmesi amacıyla bir uygulama hazırlanmış ve değerlerin arttırılması ve azaltılmasıyla birlikte H&E ve FISH değerleri transparan bir şekilde gözlemlenmiştir.

3. SONUÇ

Algoritmaların çalışması için ARGENİT firmasından temin edilen H&E ve FISH görüntüsünden parçalar çıkartılmıştır. İki adet yüksek çözünürlüklü görüntü parçalanarak 10 farklı görüntü türetilmiştir. Bu görüntüler H&E ve FISH görüntülerinin karşılaştırılması için kullanılmıştır. Algoritmalar ilk olarak 10 adet H&E görüntüsü üzerinden test edilmiştir. Bu imgelerden farklı alt imgeler çıkartılmış ve algoritmaların bunları sorunsuz olarak bulması beklenmiştir.



Şekil 19. 2854x2891 çözünürlüğünde, sırasıyla H&E ve FISH görüntüleri

Yüksek çözünürlükte elde edilmiş H&E ve FISH görüntülerinin renk tonları örnek olarak Şekil 19’da gösterildiği gibi ve tezin içerisinde anlatıldığı üzere görülmektedir. Ayrıca buradaki FISH görüntüsünde DAPI boyası kullanılmaktadır ve rengi mavi tonlarındadır.

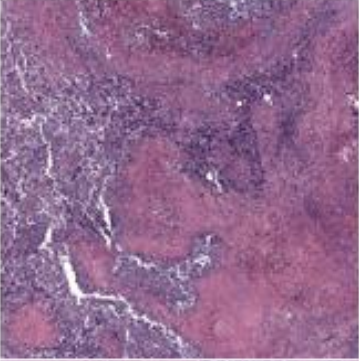
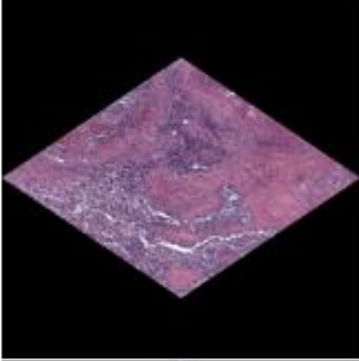
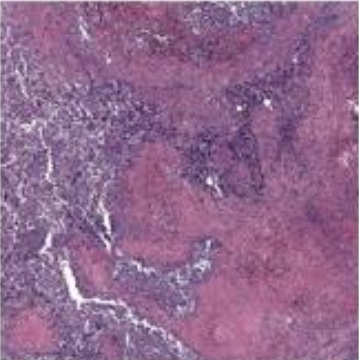
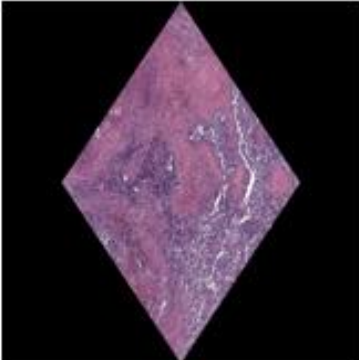
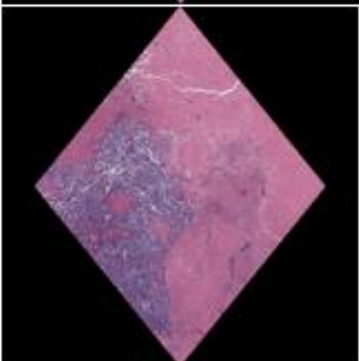
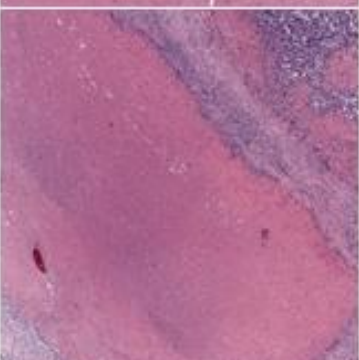
Elde edilen görüntüler FISH görüntüleri ile karşılaştırılmadan önce bazı denemelerden geçirilmiştir ve bu sayede yazılan algoritmanın net çalıştırılması amaçlanmıştır. Bu işlemler için öncesinde de bazı ön işlemlerden geçirilmiştir. Alınan görüntüler öncelikle basit bir görüntü normalleştirme işleminden geçirilmiş ve fazlalık yaratan görüntüler düzenlenmiştir. Ayrıca algoritma içerisinde de görüleceği üzere görüntü sırasıyla; öncesinde gri ölçekli görüntüye çevrilmiş, medyan filtresi ve gauss filtresi uygulanarak düzenlenmiştir. Sonrasında ise varsa kenar noktalarının düzeltilmesi amacıyla işlem yapılmıştır. Uygulanan bu filtreler, görüntüler üzerindeki boya

kaymasını ve varsa gürültüleri azaltarak hata oranını düşürmek amacıyla düzenlenmiştir.

Yapılan tüm ön işlemler sonrasında H&E görüntüleri, temel işlemler öncesi testlere tabi tutulmuştur.

3.1. H&E Görüntüleri Üzerinden Algoritmaların Testi

Ön işlem sonrasında elde edilen RGB H&E görüntüleri, dönüşüm ve diğer işlemlerin yapılabilmesi amacıyla gri alan görüntüsüne çevrilmiştir. Çevrilen bu görüntüler üzerinde işlem işlemler için bir dönüşüm matrisi oluşturulması gerekmektedir. Bu 3x3 matrisin değerleri “a,b,c,d,e,f,g,h,i” olarak öncesinden tanımlanmıştır. “a,e,i” köşegen elemanları “1” değerinden oluşmaktadır. Köşegenin üstünde kalan “c,f” elemanları “0” ve altında kalan “g,h” elemanlarına ise, (değerleri değişebilecek şekilde) sırasıyla “200,300” değerleri atanmıştır. Ancak burada daha olan önemli olan kısım “b,d” değerleridir. Bu elemanlara verilecek değerler ile gerdirmeye değerleri atanmaktadır. Test amacıyla yapılan işlemlerde de, görüntü üzerinde farklı sonuçlar için farklı değerler kullanılmıştır. Sonrasında ise, oluşturulan dönüşüm matrisi üzerinde uygulamak üzere yapılan dönüşüm işlemi olarak afin dönüşümü işlemi de uygulanmıştır. İçinde yapılan döndürme, öteleme, ölçekleme ve kaydırma işlemleri içermesi ile denenmektedir. Yapılan işlem sonrasında, görüntüye yamultma (warping) ve kodun içinde verilen değerle (döndürme açısı) birlikte görüntü döndürülmektedir. Bu görüntülerin orijinal halleri, farklı değerler ile yukarıda anlatılan işlemlere göre atanan değerler ve sonrasında ortaya çıkan son görüntü Şekil 20’de açıkça gösterilmiştir. Bu işlemler için, ilk dört görüntü üzerinden denemeler yapılmıştır.

Sabit Görüntü	Dönüştürülmüş Görüntü	Uygulanan Dönüşüm
		X ve Y yönünde 0.2 oranında gerdirme 45 derece döndürme
		X ve Y yönünde 0.2 oranında gerdirme 135 derece döndürme
		X ve Y yönünde 0.1 oranında gerdirme 135 derece döndürme
		X ve Y yönünde 0.2 oranında gerdirme 155 derece döndürme

Şekil 20. Dört ayrı H&E görüntüsü üzerinde yapılan görüntü dönüşümleri (detayları yanında açıklanmıştır)

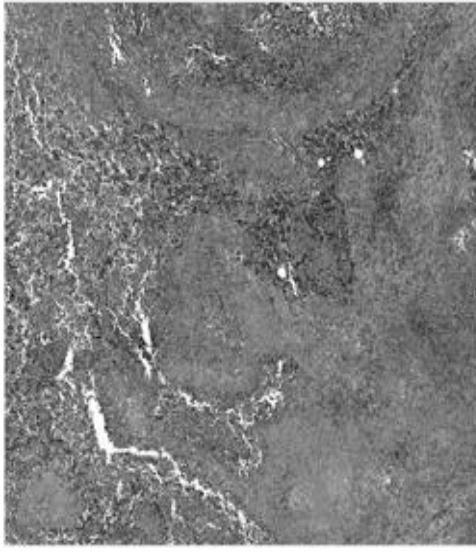
Elde edilen dönüşüm sonuçlarına göre oluşan dört görüntü ve sonuçları ile SIFT, SURF ve MSER dönüşümleri uygulanması sonrası, anahtar noktalar bulunup

çakıştırılmıştır.

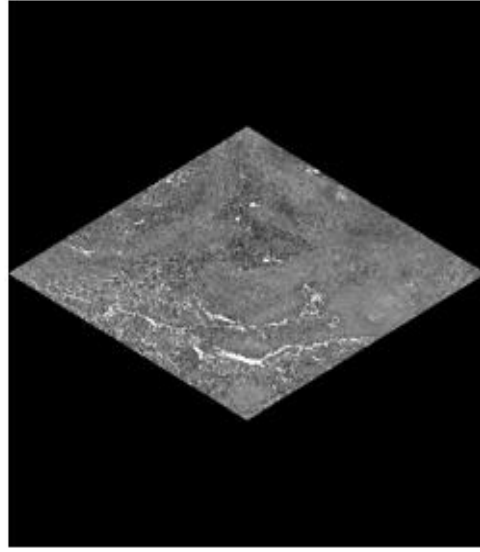
Öncelikle noktaların eşleşebilmesi için iki resmin uzaysal boyutları düzenlemektedir. Sonrasında her dönüşüm işlemi (SIFT, SURF ve MSER) içerisinde, referans ve sonuç görüntüleri için eşik değeri, taranacak alanın büyüklüğü ve en yüksek varyasyon değeri gibi değerler ile ayarlanmaktadır. Bu değerler her dönüşüm işlemi için aynıdır. Bu işlemler için “try-catch fonksiyonu kullanılmıştır ve sonuç olumsuz geldiğinde sıfırlar (zero) matrisi oluşturulmuştur.

Şekillerde ilk sırada referans ve sonuç görüntüsü gri alan şeklinde verilmiştir. Diğer iki satırlarda verilen görüntüler ise SIFT, SURF ve MSER işlemlerinin uygulanması sonrasında ortaya çıkan görüntüleridir. Sonuçlarda pembe noktalar, dönüşüm işleminin uygulandığı noktaları göstermektedir. Yeşil yerler ise aynı noktaların uyuşmalarını göstermektedir. Komple siyah kalan noktalar algoritma ile oluşturulan dönüşümlerde anahtar noktaların oluşmaması sonrasında, siyah olarak kaldığını göstermektedir. Bu durum Şekil 21’de MSER dönüşümünde ve Şekil 24’de SURF dönüşümünde görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre de, hiç bir pikselde anahtar nokta yakalanamadığı ve bu sebepten ötürü de net bir eşleşme görülememiştir.

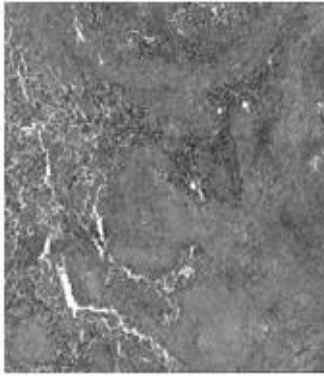
Şekil 21’de SURF, Şekil 22’de SURF ve MSER, Şekil 23 ve Şekil 24’te ise MSER dönüşümünde görülen kayma işlemi sonucunda, oluşan uzaysal görüntünün yeşil noktada farkları görüntülemeye çalıştığı ve pembe noktaların da dönüşüm uygulayarak eşleştirilmeye çalışıldığı görülmüştür. Ancak görüntüden anlaşılacağı üzere bu noktalar üst üste gelememiş ve sağlıklı bir eşleşme işlemi gerçekleştirilememiştir.



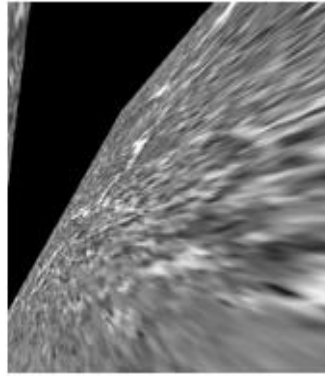
Sabit Görüntü



Dönüştürülmüş Görüntü



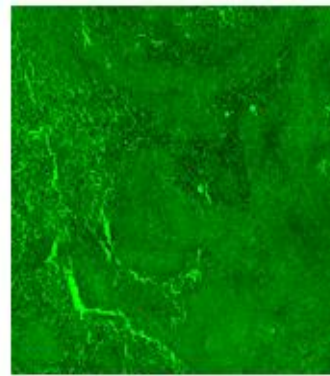
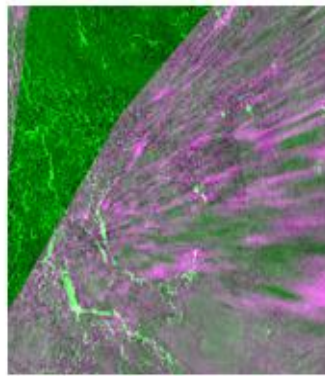
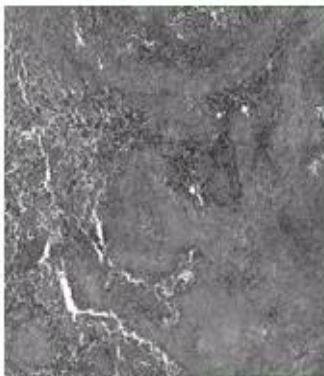
SIFT



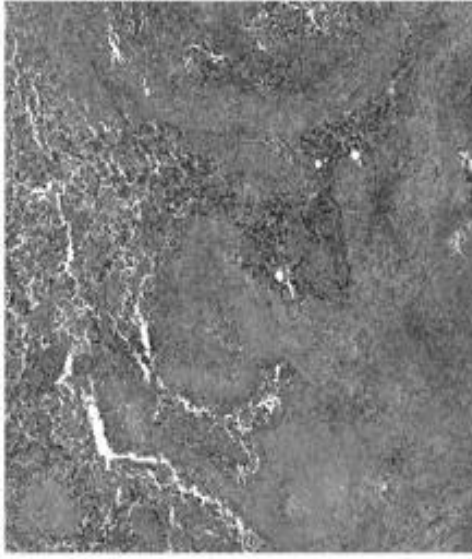
SURF



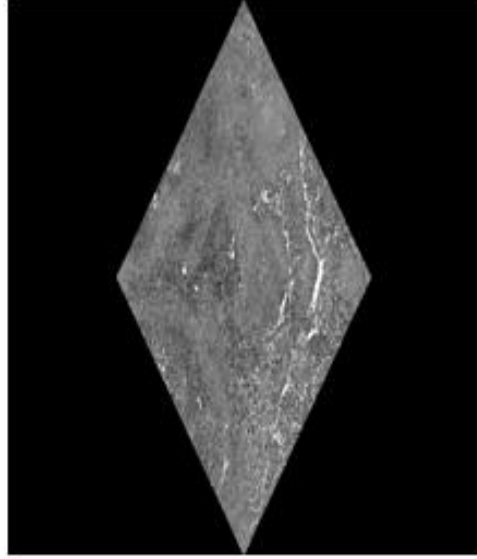
MSER



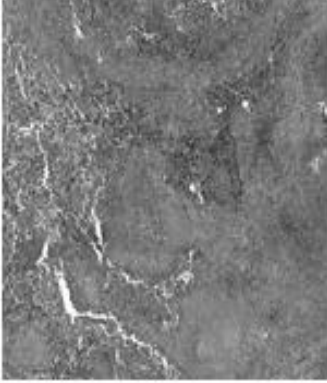
Şekil 21. 1 Numaralı görselin algoritmalar ile testi



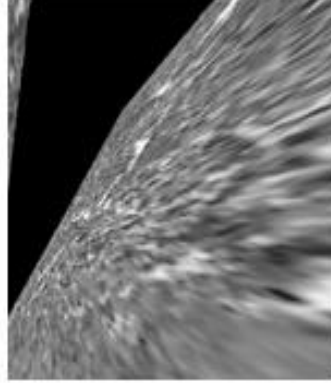
Sabit Görüntü



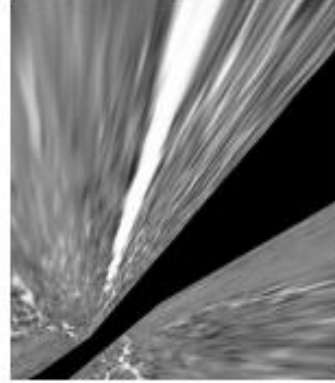
Dönüştürülmüş Görüntü



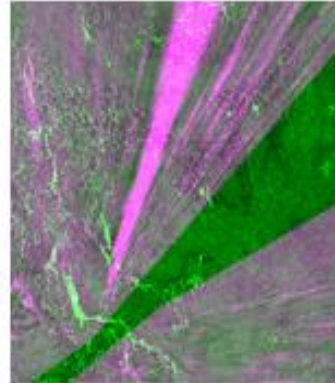
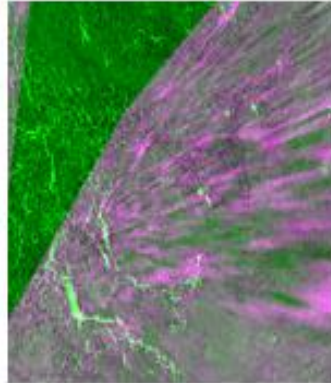
SIFT



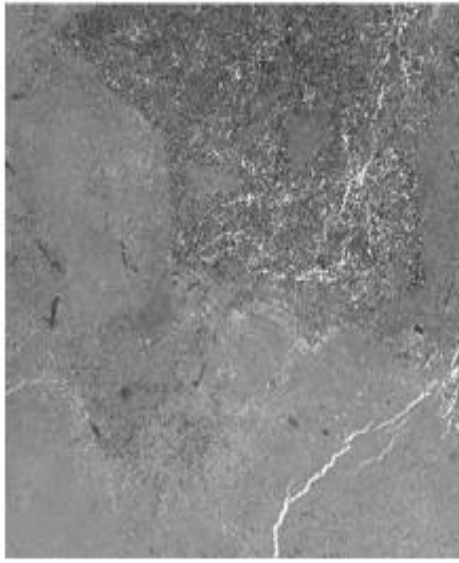
SURF



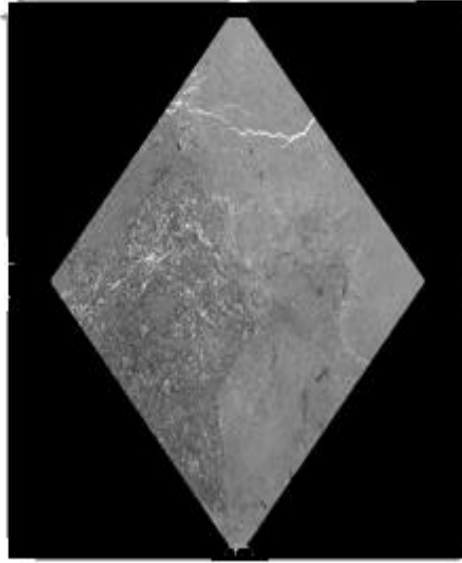
MSER



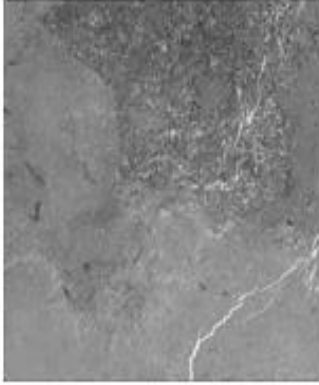
Şekil 22. 2 Numaralı görselin algoritmalar ile testi



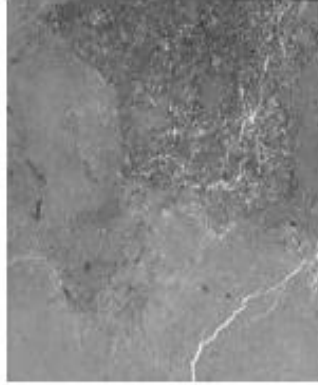
Sabit Görüntü



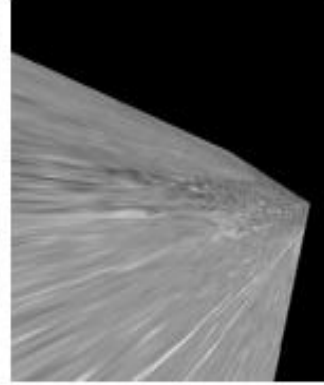
Dönüştürülmüş Görüntü



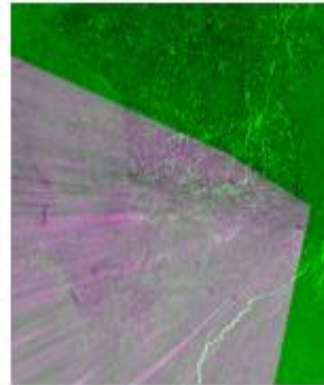
SIFT



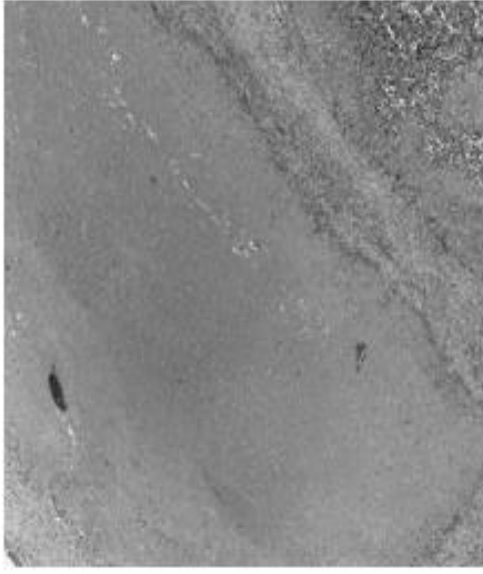
SURF



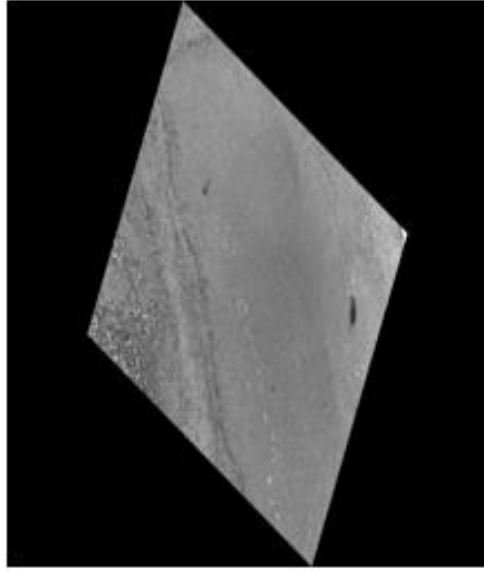
MSER



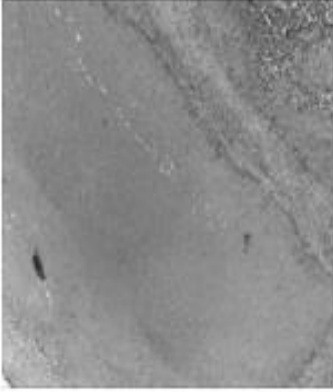
Şekil 23. 3 Numaralı görselin algoritmalar ile testi



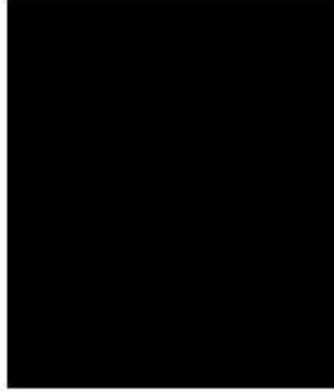
Sabit Görüntü



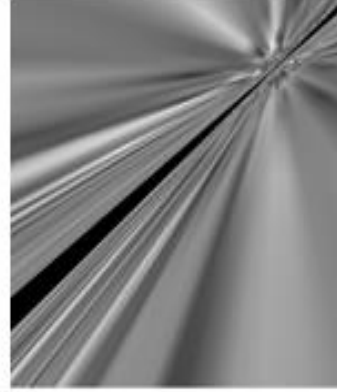
Dönüştürülmüş Görüntü



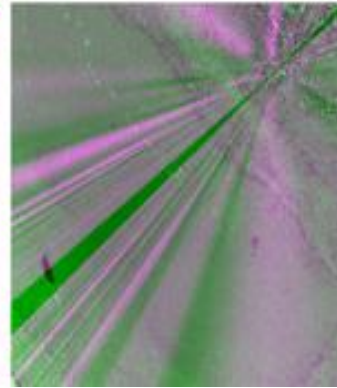
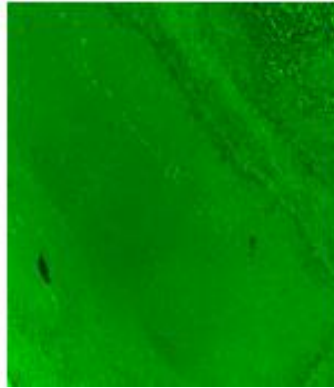
SIFT



SURF



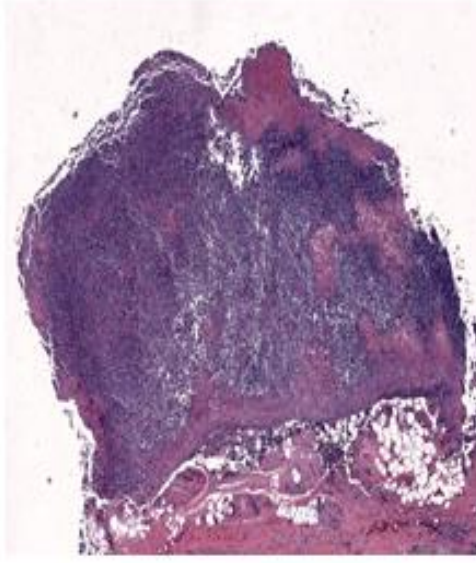
MSER



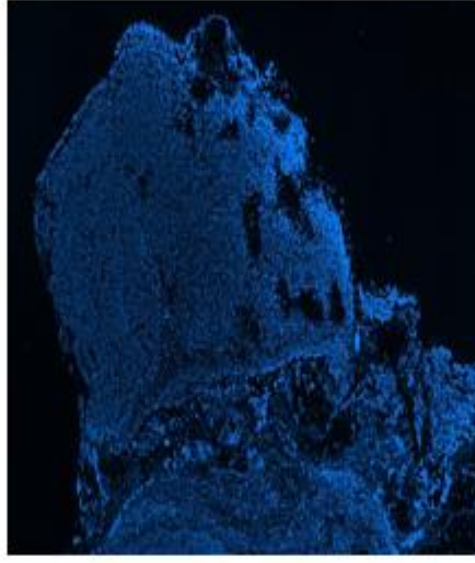
Şekil 24. 4 Numaralı görselin algoritmalar ile testi

3.2. H&E ve FISH Görüntülerinin Eşleştirilmesi

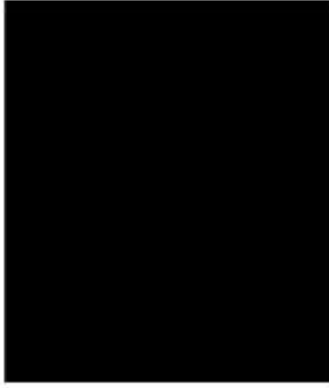
H&E ile kullanılan algoritmalar ile yapılan ilk işlemlerde ortaya çıkan sonuç Şekil 25'te görüldüğü gibidir. SIFT, SURF ve MSER işlemleri sonrasında pembe nokta bulanamamış ve bu sebepten ötürü anahtar nokta bulunamayarak eşleşme sağlanamamıştır. İşlem sadece, yeşil zemin noktalarının belirlenmesi ile karşılaştırma yapılamadan sonuçlanmıştır. Sonrasında, olumsuz sonuçlar veren algoritmanın üzerine farklı işlemler eklenmiştir. Düzenlenen algoritmada, yoğunluk bazlı dönüşüm işlemi ele alınmış ve görüntülerin farklı sensörlerden, farklı parlaklıklar ile alınmış olması sebebiyle de çok modellenmiş işlem kullanılmıştır. Bu ayarlardan sonra, afin dönüşümü ile üç ayrı görüntü çakıştırması uygulanmıştır. İlkinde bir değişiklik yapılmadan aynı değerlerde, ikincisinde başlangıç yarıçapı ayarlaması yapılmış ve üçüncüsünde ise maksimum öteleme sayısı artırılmıştır. Bu görüntüler tekil olarak incelenmiştir. En son olarak da, geometrik dönüşüm işlemi katı olarak ve afin olarak uygulanmıştır. Şekil 26'da görüldüğü gibi, çakışma işlemi için görüntülerin büyük bir kısmında, yeşil ve pembe noktaların üst üste geldiği gözlemlenmiştir. Tam görüntü olarak yapılan işlemde, görüntülerin benzer büyüklükte ve yakın alanları taraması sebebiyle eşleşme oranının yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



H&E Sabit Görüntüsü



FISH Görüntüsü



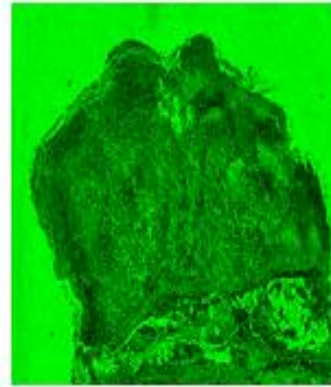
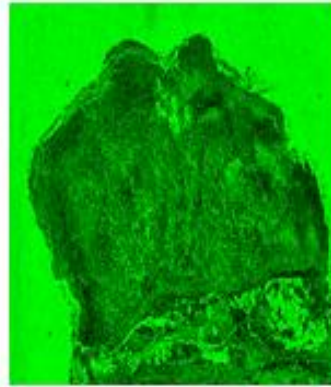
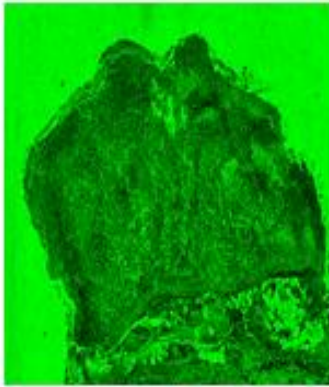
SIFT



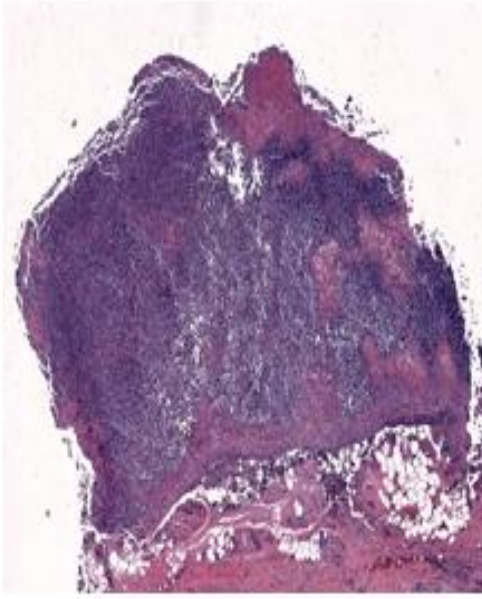
SURF



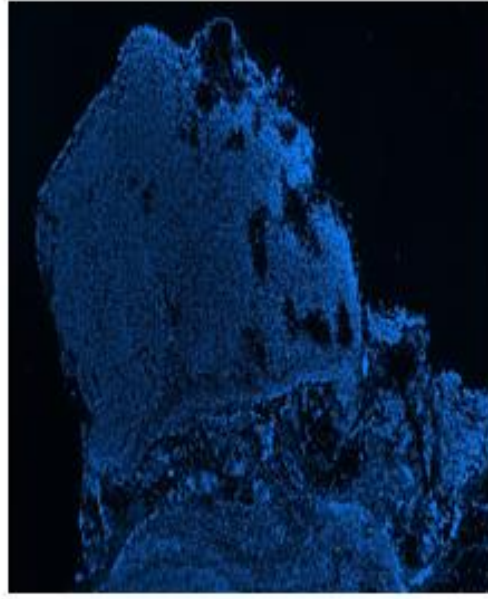
MSER



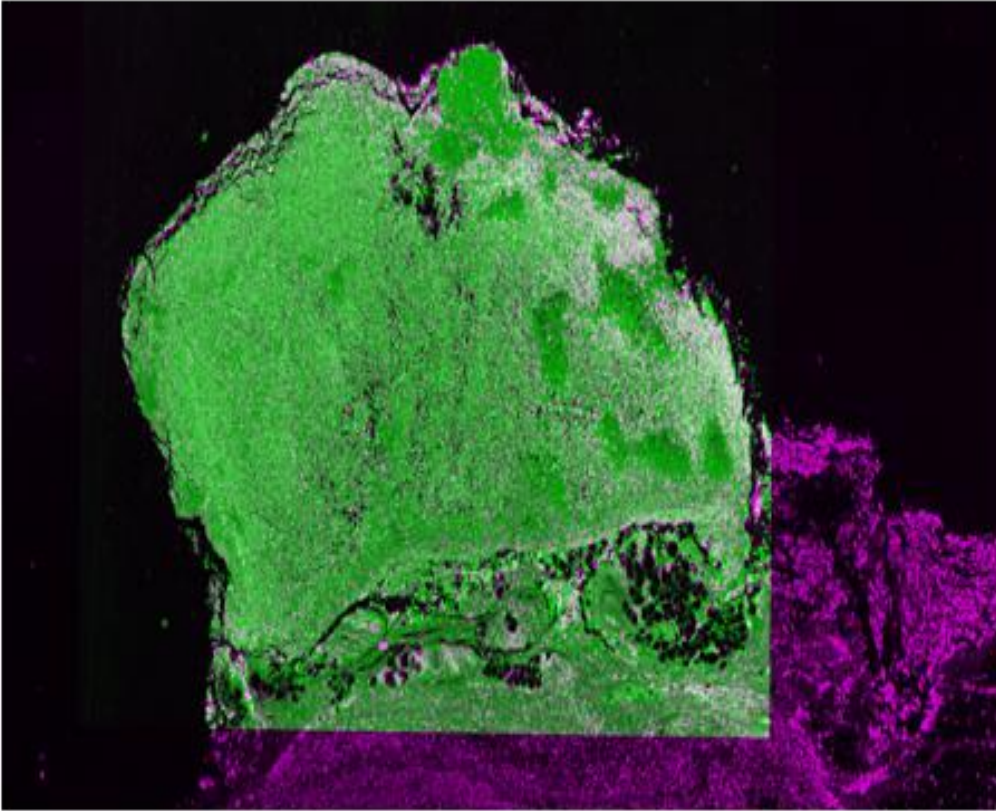
Şekil 25. H&E sabit görüntüsü ve FISH görüntüsü algoritmalar ile denenmesi



H&E Sabit Görüntüsü



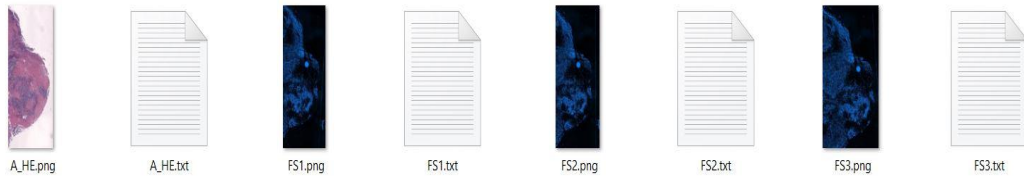
FISH Görüntüsü



Şekil 26. H&E sabit görüntüsü ve FISH görüntüsü eklenmiş algoritmalar ile uygulanması

3.3. Hata Oranın Hesaplanması ve Karşılaştırması İşlemi

Yapılan işlemde, daha önceki görüntülerden farklı H&E ve FISH görüntüleri kullanılmıştır. Bu görüntüler ile birlikte çalıştırılan kod içerisinde, kaydırılmamış bir şekildedirler. Ancak sonrasında FISH görüntüsü, daha iyi bir karşılaştırılma amacıyla beş derece döndürülmüştür. Sonrasında iki görüntünün de belirlenen alanlarının karşılaştırılması ve doktorlar veya patologlar tarafından daha rahat incelenebilmesi amacıyla kırpma fonksiyonu ile seçilmiştir. Sonrasında seçilen görüntülerin yakınlaştırılması ardından, kontrol noktaları manuel olarak seçilmiştir. Burada yapılan işlemin amacı, belirlenen her bölge ve nokta için veri seti oluşturmaktır. Bu işlem sırasında alınan her noktanın koordinatları kayıt altına alınmıştır. Ek olarak, bu işlem FISH görüntüsünün her seferinde döndürülmesi amacıyla bir döngü oluşturularak yapılmıştır. Şekil 27’de örnek olarak gösterilen veri setinden beş adet oluşturulması sağlanmıştır ve içerisinde seçilen görüntüler ile birlikte seçilen kontrol noktalarının koordinatlarını içeren dosyalar da bulunmaktadır. Veri seti sayısı da isteğe göre artırılabilir.

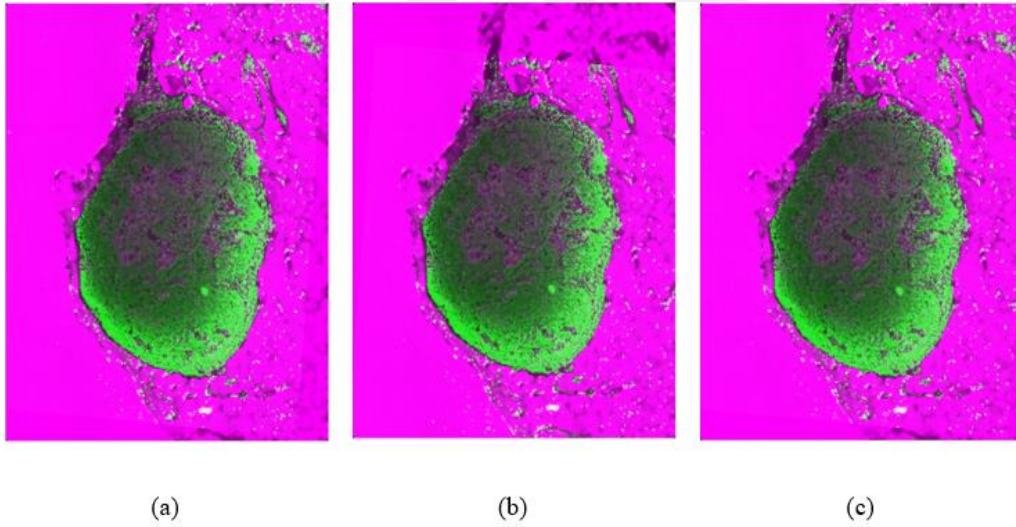


Şekil 27. Oluşturulmuş örnek veri seti

Oluşturulan veri setleri, yazılan kod üzerinde çalıştırılmıştır. Numaralandırılan veri setleri sırayla uygulama içerisinde çağırılmıştır. Sonrasında, atanması amacıyla boş RMSE matrisi oluşturulmuştur. Bir “for” döngüsü oluşturularak, içerisinde gri alana çevirme işlemi H&E görüntüsü ve sahip olduğu koyu tonlar sebebiyle, FISH görüntüsünün gri alan işleminin 255’ten çıkartılması ile gri tonda imgesi oluşturulmuştur. Ek olarak üzerlerine medyan filtreleme işlemi uygulanarak, görüntüler temizlenmiştir. Sonrasında modelleme tipi çoklu olarak belirlenerek, dönüşüm matrisi oluşturulmuştur. Kullanılan görüntülerin tüm bu işlemler sonrasında ne kadar hata ile çıktığını belirlemek amacıyla, oluşturulan matris için yeri değişen noktaların hata oranı olarak RMSE değerleri atanmıştır. Görüntülerde belirlenen kontrol noktalarının koordinatları dönüşüm öncesinde ve sonrasında karşılaştırarak, işlem bitiminde o noktaların yarıçap içerisinde nerede olduğuna bakılarak hata oranları

hesaplanmıştır. Sırasıyla tüm veri setlerinden elde edilen sonuçlar RMSE oranları ile birlikte; Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31 ve Şekil 32’de gösterilmiştir.

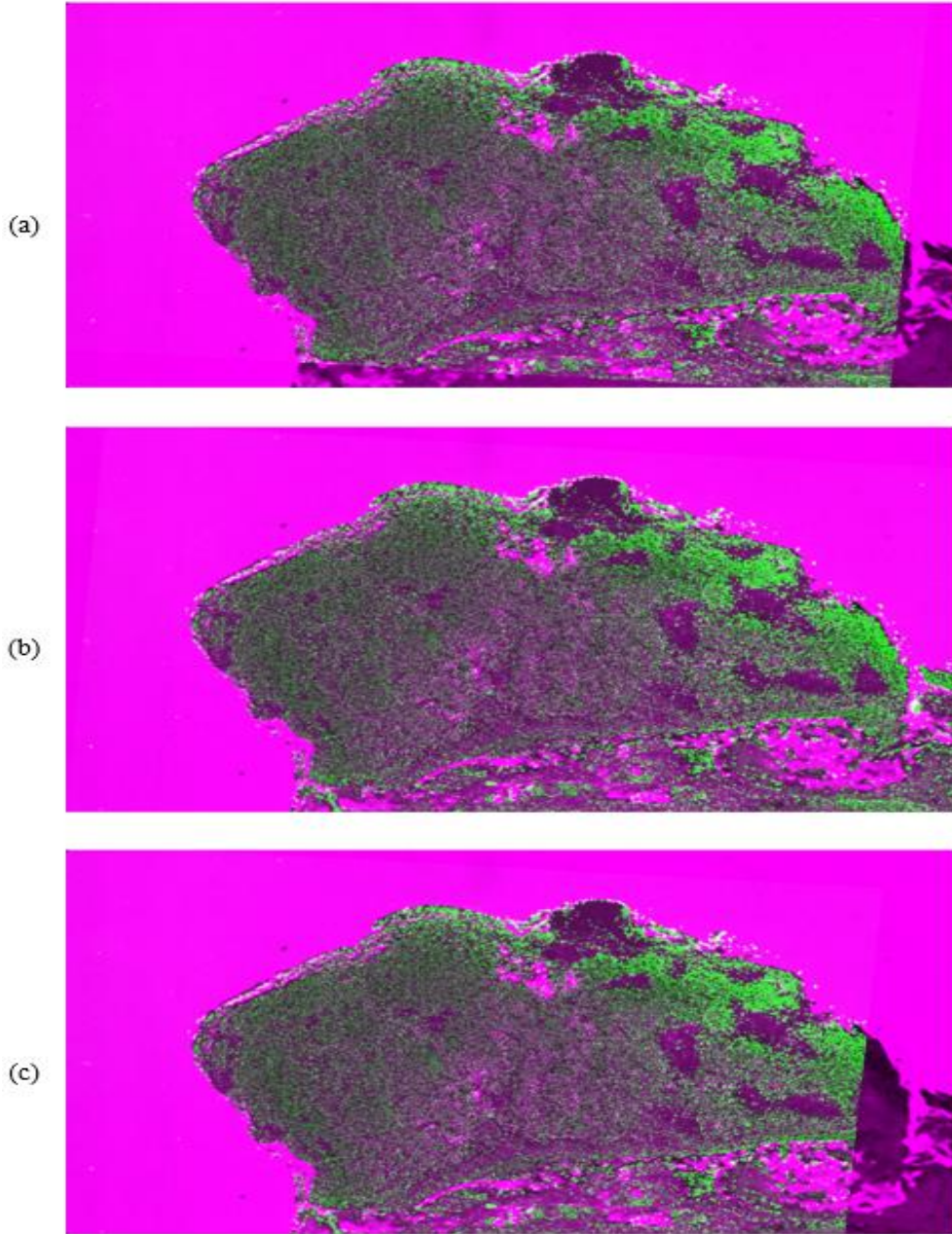
Manuel olarak göz kararı ile belirlenen kontrol noktaları ile yapılan bu işlemler sonrasında meydana gelen sonuçlarda birçok farklı sonuç gözlemlenmiştir. Kendi içerisinde döndürülerek yapılan her bir veri setinde, oluşturulan her bir alanla karşılaştırılmıştır. Şekil 28’de çıkan sonuçlarda, seçilen noktalar ile birlikte elde edilen noktaların boyalı alanın köşe noktalarından seçilmesi sebebiyle düşük oranda hata oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 29’da veya ikinci veri setindeki sonuçlarda, geniş alan yayılarak yapılan bu seçim yapılmış ve kontrol noktası olarak kıvrım noktaları seçilmiştir. Kontrol noktalarının geniş alanda birçok yerde eşleştiği ve H&E görüntüsü ile eşleşme oranında hata oranının çok daha düşük olduğu görülmüştür. Şekil 30’a bakıldığında, üçüncü veri setindeki görüntülerin yine geniş alana yayıldığı görülmektedir. Ancak ikinci veri setinin aksine, kontrol noktalarının seçildiği büküm noktalarının yönü sebebiyle hata oranı çok yüksek çıkmıştır.



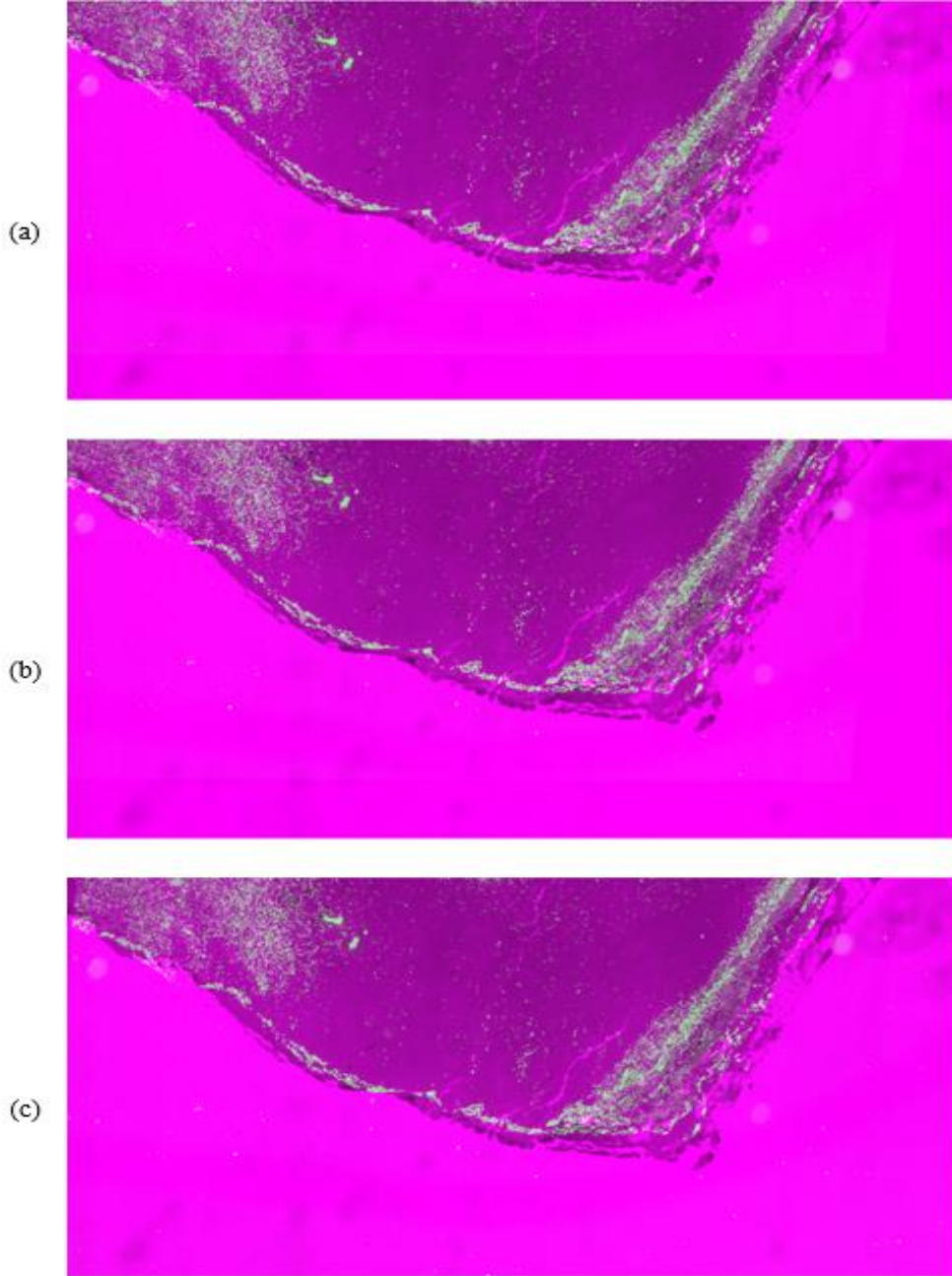
Şekil 28. Birinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 21.32, 22.62, 18.90

Şekil 31’de elde edilen veri setiyle yapılan işlemlere göre, dikey uzun alanda ve çok da yüksek olmayan oranlarda, ilk ikisi orta seviyede olmak üzere orta derecede hatayla eşleştirilmiştir. Üçüncü değerin yüksek olma sebebi olarak dikey alanda diğer görüntülere göre daha yüksek alanda eşleştirme yapmaya çalışması sebebiyle, yüksek eşleşmeme oranı görülmüştür. Son olarak Şekil 32 incelendiğinde, çok yüksek olmayan giriş seviyesindeki hatalarla karşılaştırıldığı görülmüştür. En ve boy oranlarının

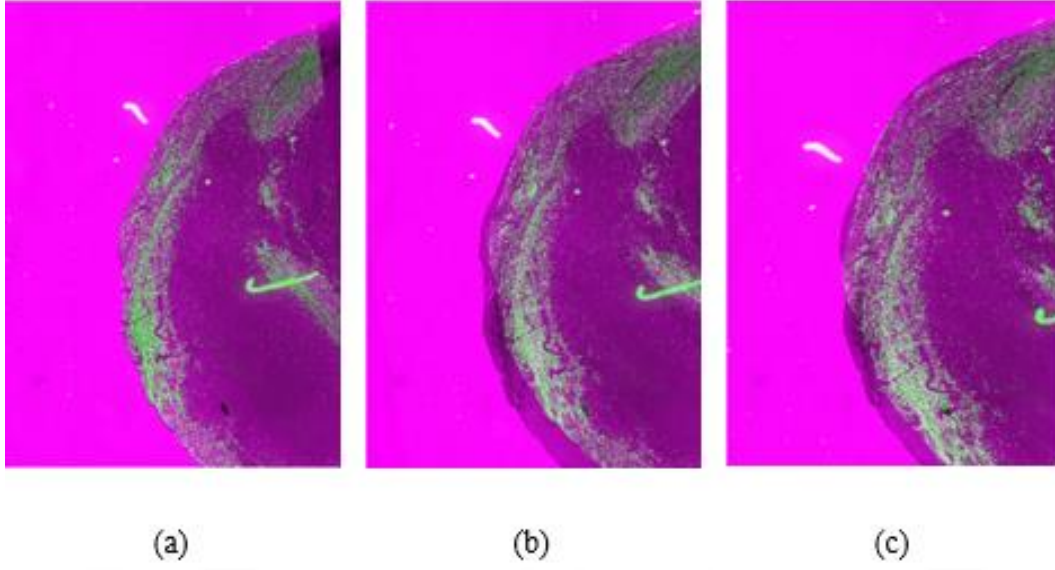
ve bakış yönlerinin H&E ve FISH görüntülerinde benzer olmasının bunda etkin olduğu anlaşılmaktadır. Diğer kodlarda yapılan SIFT, SURF ve MSER işlemleri ve bu işlemlerden alınan farklı sonuçlar sebebiyle, bu kod içerisinde bu dönüşüm uygulamaları kullanılmamıştır. Bu kod içerisinde, MATLAB® uygulamasının içerisinde bulunan “Mattes mutual information metric configuration” işleminden yararlanılmıştır (“Mattes mutual information metric configuration - MATLAB”, <https://www.mathworks.com/help/images/ref/registration.metric.mattesmutualinformation.html>).



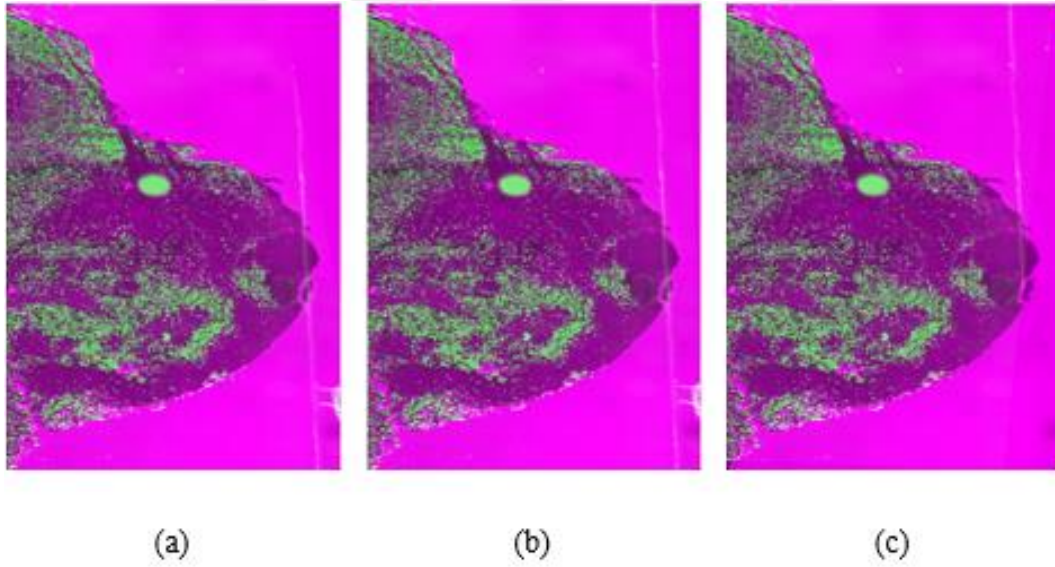
Şekil 29. İkinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 7.81, 18.31, 9.73



Şekil 30. Üçüncü veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 133.45, 134.58, 131.76



Şekil 31. Dördüncü veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 45.75, 64.28, 186.48



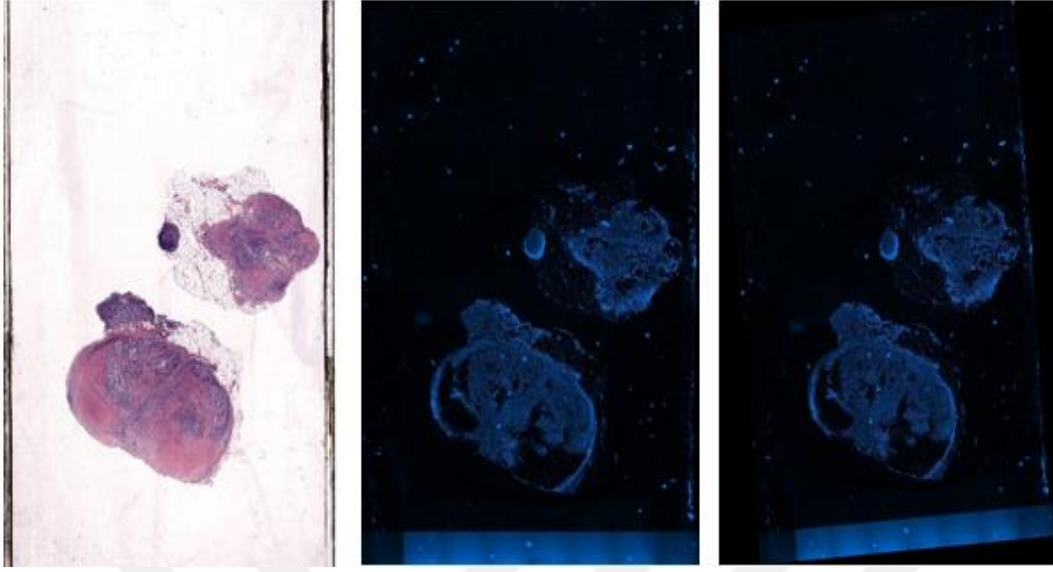
Şekil 32. Beşinci veri seti eşleşme sonuçları. Sırasıyla RMSE oranları: 36.82, 34.05, 32.37

Karşılaştırma İşlemi: İlk olarak uygulanan algoritmalarından alınan sonuçlar sonrasında, her görüntünün tek tek ele alınıp, istenilen belirli bir bölge dışında tüm imgenin eşleştirildiği görülmüştür. Bu durumun düzeltilmesi ve yalnızca belli bir bölgenin (doktorun veya patoloğun görmek istediği bölgenin) incelenebilmesi amacıyla yazılan kod ile düzenlenmiştir. Bu sebeple ilk işlemin yapıldığı doku görüntülerinden farklı parçalar kullanılarak, aynı bölgeden iki farklı H&E ve FISH boyalı doku parçaları alınmıştır. Algoritmanın düzgün çalışabilmesi ve günlük

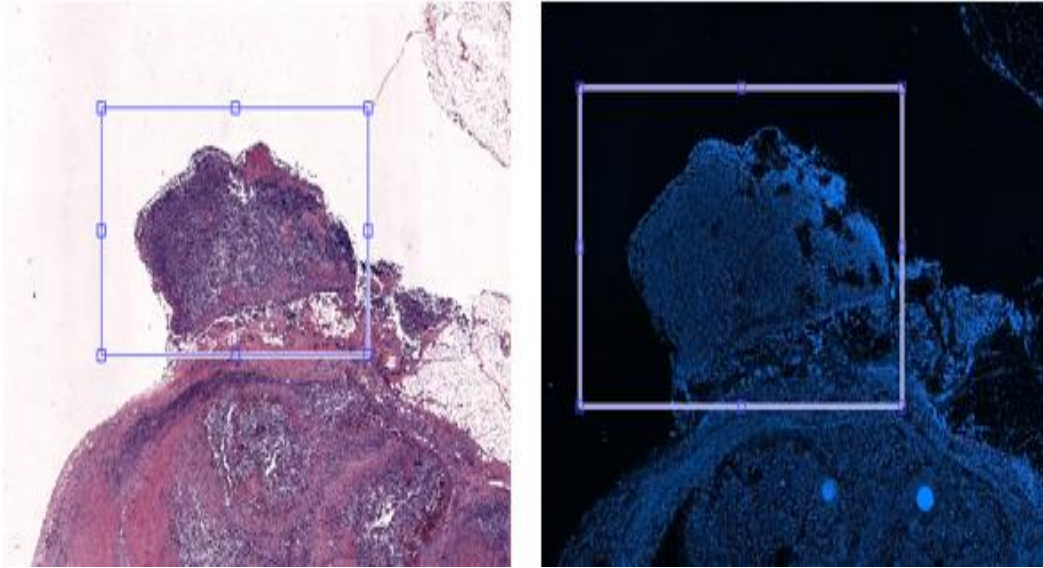
kullanımda meydana gelebilecek kayma vb. durumlarda nasıl çalıştığını daha iyi gözlemek amacıyla, FISH görüntüsü üzerinde kaydırma işlemi uygulanmıştır. Bu görüntüler sırasıyla Şekil 33'ün içerisinde gösterilmiştir. Sonrasında bu görüntüler üzerinde çakıştırma yapılması amacıyla, kırpma (crop) fonksiyonu kullanılarak belirli Şekil 34'te görüldüğü gibi, bir bölgenin seçilmesi sağlanmıştır. Sonrasında bu bölümlere medyan ve gauss filtreleri uygulanarak, koyu renkteki FISH görüntüsü ile daha rahat karşılaştırma yapılabilmesi için gri alana çevirme işlemi uygulanmıştır. Seçilen alanın, boyanmış dokunun köşe noktalarından seçilmesine özen gösterilmiştir. Çünkü orta kısımlardan alınan görüntülerin çoğunun, net bir eşleşme göstermediği gözlemlenmiştir.

Bir önceki algoritmadaki işlemlere benzer şekilde imgeler, sabit ve döndürülmüş görüntü olarak isimlendirilip tekrar optimizasyon işlemleri ve tekrar etme sayıları (iterations) gibi işlemlerden geçirilmiş ve sonrasında karşılaştırılmıştır. Ancak buradaki işlemlere ek olarak, çakıştırmanın yapılması ve yapılmaması durumundaki farklar için Grafiksel Kullanıcı Arayüzü (Graphical User Interface, GUI) bir görünürlük oranıyla birlikte kaydırma butonuyla birlikte hazırlanmış ve çakışmalar net bir şekilde gösterilmiştir. Şekil 34'ün eşleşme durumunu gösteren Şekil 35'te durum gözlemlenmiştir. Eşleşme öncesinde kaymış şekilde olan dönüm noktalarının çakışma sonrasında nasıl tam olarak çakıştığı görülmektedir. Sonrasında Şekil 36'da bir uç noktada yapılan işlemde dairesel hatlara sahip görüntülerin eşleşmesinde, Şekil 37'de görüldüğü üzere FISH görüntüsünün alanının aşağıda olmasına rağmen, gerekli işlemler sonrasında çakışma amacıyla H&E imgesinin üzerine geldiği görülmüştür. Şekil 38'de alınan bir kenar görüntüsüne bakıldığında sahip olduğu çıkıntılar sebebiyle zor bir eşleşme işlemi olduğu görülmektedir. Ek olarak, FISH görüntüsünün de sahip olduğu aç ve seçilen alanın daha geniş seçilmesi sebebiyle işlem zorlaşmaktadır. Ancak yapılan çakıştırma işlemi sonrasında, Şekil 39'da görüldüğü gibi imgelerin düzgün bir şekilde eşleştiği gözlemlenmiştir.

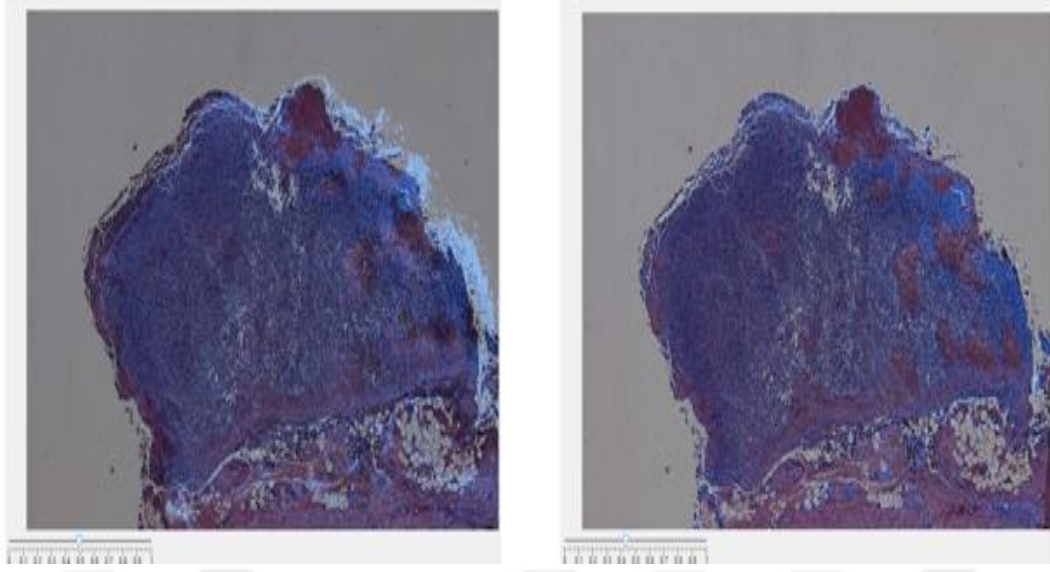
Son olarak algoritmaya, bir önceki işlemler ile karşılaştırılması amacıyla SIFT bölümünde bulunan kodlar da eklenerek gri alanda karşılaştırılmışlardır. Ancak işlemin sonucuna bakıldığında, Şekil 40'tan da anlaşılacağı üzere yukarıdaki uygulamanın aksine, düzgün bir eşleşme görülemez ve eksenler sadece kaydırılmış ve işlenmiş halde kalmıştır.



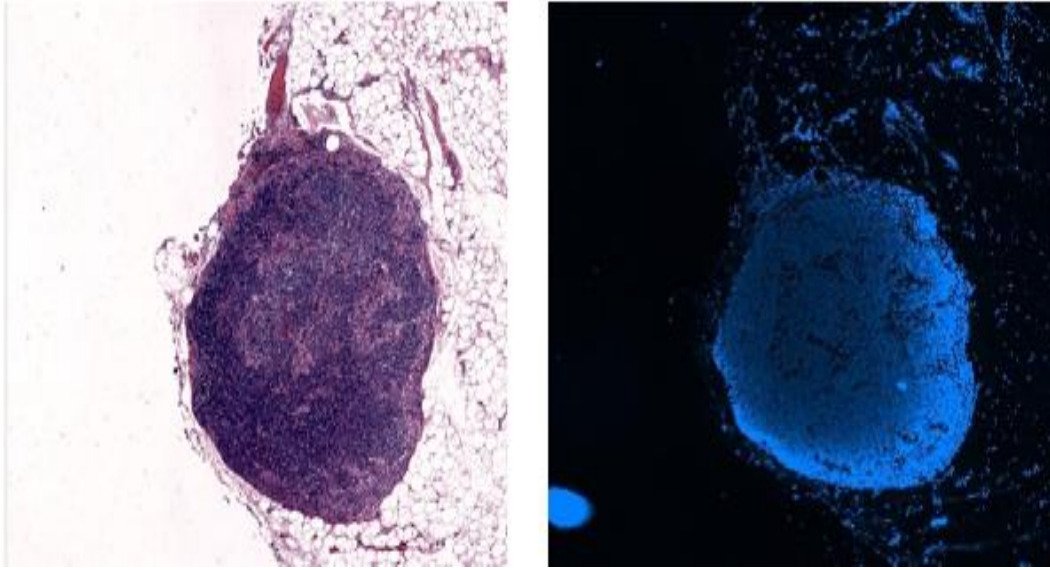
Şekil 33. 4712x7537 çözünürlüğünde sırasıyla H&E görüntüsü, sabit FISH görüntüsü ve 5° döndürülmüş hali



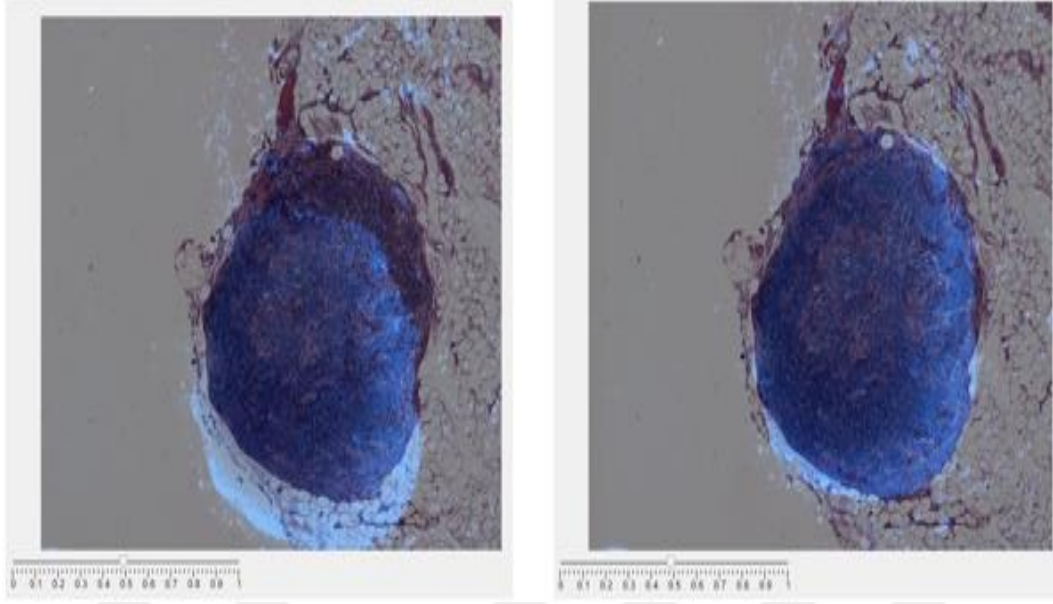
Şekil 34. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinden istenen noktaların benzer boyutlarda boyanmış görüntünün ortasından kesilmesi ve karşılaştırma



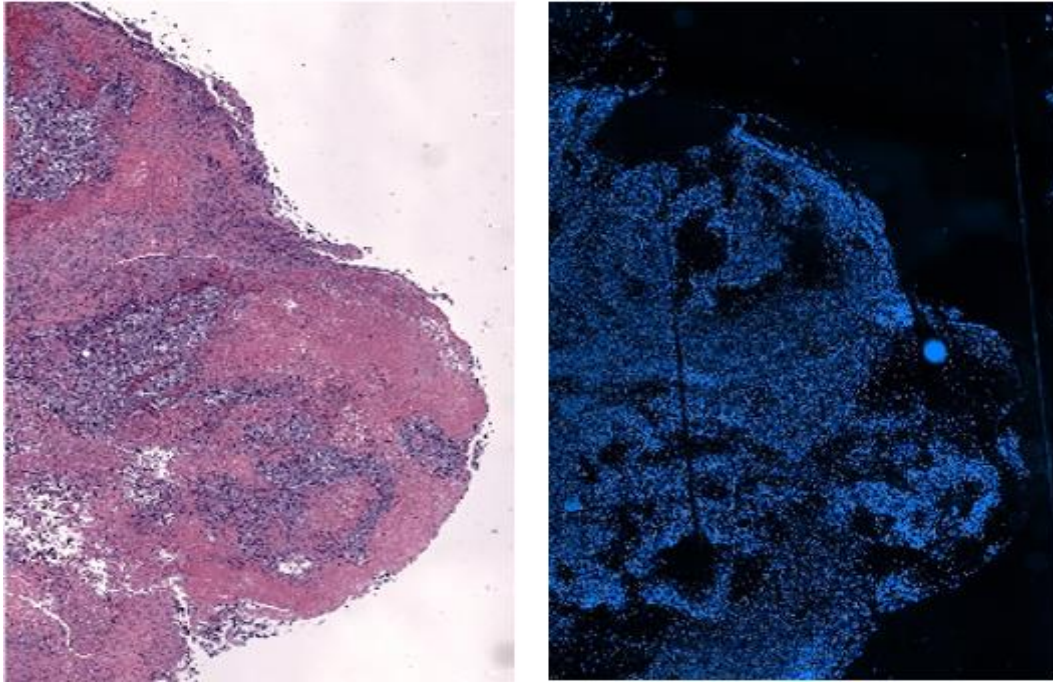
Şekil 35. Çakıştırma olmadan ve çakıştırma işlemi sonrası yapılan karşılaştırma



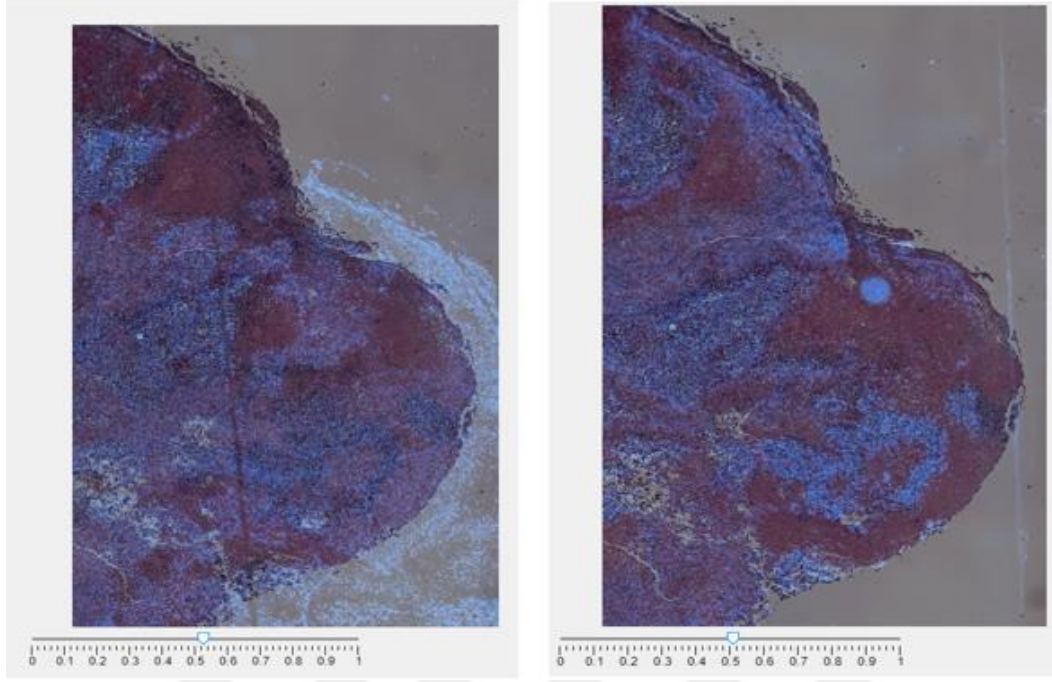
Şekil 36. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinin boyasının uç noktasından alınan ve dairesel hatlara sahip görüntüler



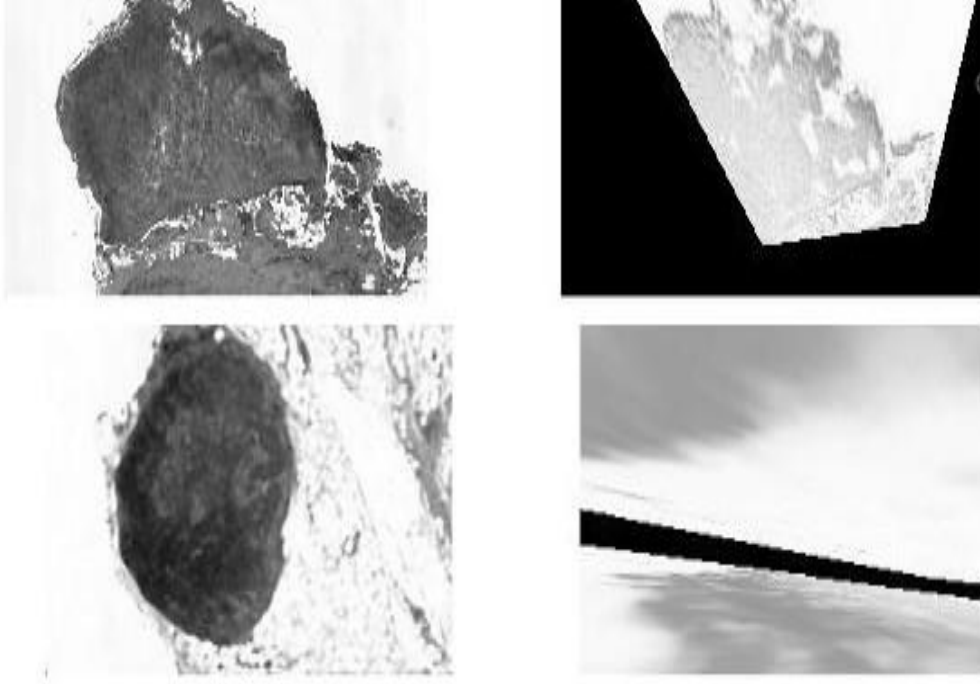
Şekil 37. Şekil 36'dan alınan görüntülerin sırasıyla eşleşme öncesi ve sonrası durumu



Şekil 38. H&E (solda) ve FISH (sağda) görüntülerinin alındığı çıkıntı içeren kenar görüntüsü



Şekil 39. Şekil 38’den alınan görüntülerin sırasıyla eşleşme öncesi ve sonrası durumu



Şekil 40. Sırasıyla Şekil 35 (üstte) ve Şekil 37’nin (altta) gri alan SIFT (sağda) eşleşme görüntüleri

4. TARTIŞMA

Bu çalışma, histopatolojik yöntemlerle elde edilen patolojik görüntülerin incelenmesinde farklı boyama yöntemlerinin beraber kullanılması sonucunda, hastalıkların patologların tarafından hızlı tespit edilmesi ve doktorlar için tanı sürelerinin azaltılması amacıyla yapılmıştır. Ayrıca nano düzeyde yapılan bu genetik araştırmaların, aynı büyüklükte yapılacak gelecek çalışmalara yardımcı olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçlarla H&E ve FISH yöntemleri, SIFT, SURF ve MSER gibi farklı İÇ yöntemleri ile birlikte kullanılmıştır.

H&E yöntemi, her ne kadar yüksek doğruluk oranıyla geniş anlamda altın standart boyama yöntemi olarak kullanılsa da, bazı noktalarda tek başına kullanımı yeterli kalmamaktadır. Bu sebepten FISH gibi birçok ek boyama yöntemi denenmiş ve birçok farklı yöntemin birlikte kullanılması literatürde yer almıştır.

Boyaların birlikte kullanılmaları kısmında patologların incelemesi önemli bir yer almaktadır. Ancak, tekil işlemlerde dahi insan hatasının oranı düşünüldüğünde, iki ayrı boyanın eşleştirilerek kullanılması sonucunda yapılacak işlemler, daha büyük sıkıntılara yol açabilmektedir. Bu sebepten ötürü, bu çalışmada kullanılan İÇ çakıştırma yöntemleri, dijital ortamda bilgisayar destekli olarak yapılmaktadır.

Bu çalışmada, ARGENİT firmasından elde edilen yüksek çözünürlüklü görüntüler dijital ortamda, WSI şeklinde bulunmaktadır. Parça parça alınan H&E ve FISH görüntüleri ile ana işleme geçmeden önce, ayrı ayrı ve beraber deneme işlemleri yapılmıştır. Yazılan algorithmada SIFT, SURF ve MSER adlı üç farklı dönüşüm işlemi yapılmıştır. Bu işlemlerden önce ilk aşamada döndürme, öteleme, ölçekleme ve kaydırma işlemleri ile afin dönüşümü işlemi ve görüntüye yamultma (warping) işlemleri H&E görüntülerine uygulanmıştır. Sonrasında bu görüntüler ile yapılan SIFT, SURF ve MSER yöntemleri bakılan şekillerde, anahtar noktaların eşleşmediği veya düşük kaldığı ve bazı görüntülerin ise eşleşmeyecek şekilde yamulduğu gözlemlenmiştir. Bunun sonrasında H&E ve FISH eşleşmesinde de aynı sonuçların alınması ile birlikte, farklı işlemler eklenmiş. Sonuç olarak da, yoğunluk bazlı ve geometrik bazlı afin işlemleri ile öteleme miktarı ve başlangıç yarıçapı değerleri değiştirilerek görüntüler eşleştirilebilmiştir. Bu sayede eşleşme oranının da arttığı ve

genel anlamda da SIFT algoritmasının daha yüksek başarı ile çalıştığı gözlemlenmiştir.

Sonradan yazılan kod ile birlikte, doktorlara ve patoloğlara yardımcı olması açısından belirli bir bölgenin seçilebilmesi amacıyla kırpma işlemi ile alan seçilmesi sağlanmıştır. Filtreleme ve gri alana dönüştürme gibi işlemler uygulanmıştır. Hazırlanan veri seti ile birlikte bakılan RMSE sonuçları ile eşleşmedeki hata oranları karşılaştırılmıştır. Seçilen alanının büyüklüğüne, alanın bakış yönüne ve seçilen noktaların konumuna göre farklı sonuçlar gözlemlenmiştir. İlk olarak seçilen alanın üzerinde etkisi az olduğu görüldüyse de, kontrol noktalarının seçilmesindeki manuel işlemler üzerinde etkisinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu seçme işlemleri, ilk olarak H&E üzerinde yapıldıktan sonra otomatik olarak FISH üzerinde ayarlanması, gelecekteki araştırmalarda daha net sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

Son olarak yazılan ek kod ile birlikte, benzer şekilde kırpma işlemi uygulanmış ve belirli bir alan seçilmiştir. Sonrasında hazırlanan GUI koduyla birlikte, ilk kod ile benzer işlemler uygulandıktan sonra görüntülerin çıkışma öncesi ve sonrası durumları karşılaştırılmıştır. Alınan sonuçların belirli bir bölgenin incelenmesi için hazırlanmasında, daha net tanı konması açısından daha yararlı olduğu ve karşılaştırma işlemi olmadan yapılan karşılaştırma işlemlerinin hatalı sonuçlara yol açabileceği gözlemlenmiştir. Ayrıca, karşılaştırma yapılırken H&E ve FISH görüntülerinden seçilen alanların, boyalı dokunun ortasından seçildiğinde hata vermesi olasılığı, algoritmanın geliştirilebileceği yerler arasında görülmüştür.

İlerleyen çalışmalarda bu görüntülerin, iterasyon oranının veya farklı iç değerlerin değiştirilmesiyle başarı oranı artırılabilir. Ayrıca gelecekte SIFT, SURF ve MSER gibi farklı dönüşüm algoritmaları kullanılarak başarı oranı gözlemlenebilir. Bu tarz uygulamalarda burada belirtilen kodlardaki gibi manuel seçim yapılması yerine otomatik olarak yapılması için, farklı derin öğrenme yöntemleri uygulanabilir. Bu işlemler hata oranını azaltıp daha net tanımlar konmasını sağlayabilir.

KAYNAKÇA

- Akila, S. A., Samarabandu, J., Knoll, J., Khan, W. ve Rogan, P. (2010). An accurate image processing algorithm for detecting FISH probe locations relative to chromosome landmarks on DAPI stained metaphase chromosome images. *CRV 2010 - 7th Canadian Conference on Computer and Robot Vision*, 223–230. doi:10.1109/CRV.2010.36
- Akkus, Z., Ali, I., Sedlar, J., Kline, T. L., Agrawal, J. P., Parney, I. F., ... Erickson, B. J. (2016). Predicting 1p19q Chromosomal Deletion of Low-Grade Gliomas from MR Images using Deep Learning. *arXiv*, 1–7. <http://arxiv.org/abs/1611.06939> adresinden erişildi.
- Al-Janabi, S., Huisman, A. ve Van Diest, P. J. (2012). Digital pathology: Current status and future perspectives. *Histopathology*, 61(1), 1–9. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03814.x
- Athanasίου, L. S., Fotiadis, D. I. ve Michalis, L. K. (2017). Validation Using Histological and Micro-CT Data: Registration and Inflation Using IVUS. *Atherosclerotic Plaque Characterization Methods Based on Coronary Imaging*, 167–180. doi:10.1016/B978-0-12-804734-7.00009-9
- Aurich, V. ve Weule, J. (1995). Non-Linear Gaussian Filters Performing Edge Preserving Diffusion, 538–545. doi:10.1007/978-3-642-79980-8_63
- Awan, R. ve Rajpoot, N. (2018). Deep autoencoder features for registration of histology images. *Communications in Computer and Information Science*, 894, 371–378. doi:10.1007/978-3-319-95921-4_34
- Babic, A., Loftin, I. R., Stanislaw, S., Wang, M., Miller, R., Warren, S. M., ... McElhinny, A. S. (2010). The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods*, 52(4), 287–300. doi:10.1016/j.ymeth.2010.08.012
- Bataille, F., Troppmann, S., Klebl, F., Rogler, G., Stoelcker, B., Hofstadter, F., ... Rümmele, P. (2006). Multiparameter immunofluorescence on paraffin-embedded

- tissue sections. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 14(2), 225–228. doi:10.1097/01.pai.0000162009.31931.10
- Bay, H., Tuytelaars, T. ve Gool, L. Van. (2006). LNCS 3951 - SURF: Speeded Up Robust Features. *Computer Vision–ECCV 2006*, 404–417. http://link.springer.com/chapter/10.1007/11744023_32 adresinden erişildi.
- Ben-Izhak, O., Bar-Chana, M., Sussman, L., Dobiner, V., Sandbank, J., Cagnano, M., ... Sabo, E. (2002). Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology*, 41(6), 519–525. doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01444.x
- Borovec, J., Munoz-Barrutia, A. ve Kybic, J. (2018). Benchmarking of Image Registration Methods for Differently Stained Histological Slides. *2018 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)* içinde (ss. 3368–3372). doi:10.1109/ICIP.2018.8451040
- Brown, M. ve Lowe, D. (2013). Invariant Features from Interest Point Groups, 23.1-23.10. doi:10.5244/c.16.23
- Butcher, E. C. ve Weissman, I. L. (1980). Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate. I. Technical aspects. *Journal of Immunological Methods*, 37(2), 97–108. doi:10.1016/0022-1759(80)90195-7
- Cardesa, A., Zidar, N., Alos, L., Nadal, A., Gale, N. ve Klöppel, G. (2011). The Kaiser’s cancer revisited: was Virchow totally wrong? *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 458(6), 649–657. doi:10.1007/s00428-011-1075-0
- Cetin, O., Yiran S, Flinner N, Ziegler P, Wild P ve Koepl H. (2022). Multi-magnification networks for deformable image registration on histopathology images | OpenReview. *10th International Workshop on Biomedical Image Registration*, 1–10. <https://openreview.net/forum?id=BAMUUQR25CK> adresinden erişildi.
- Çetin, Ş. B., Khameneh, F. D., Serteli, E. A., Çayır, S., Hatipoğlu, G., Kamaşak, M., ... Özsoy, G. (2018). Automated Cell Segmentation and Spot Detection in Fluorescence in Situ Hybridization Staining to Assess HER2 Status in Breast

- Cancer (C. 26, ss. 1–4).
- Chan, J. K. C. (2014). The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *International Journal of Surgical Pathology*, 22(1), 12–32. doi:10.1177/1066896913517939
- Chang, Y. H., Thibault, G., Madin, O., Azimi, V., Meyers, C., Johnson, B., ... Gray, J. W. (2017). Deep learning based Nucleus Classification in pancreas histological images. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 672–675. doi:10.1109/EMBC.2017.8036914
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6(1). doi:10.1101/pdb.prot5556
- CiOMPI, F., Geessink, O., Bejnordi, B. E., Souza, G. S. De, Baidoshvili, A., Litjens, G., ... Laak, J. Van Der. (2017). The Importance of Stain Normalization in Colorectal Tissue. *Proceedings of IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 160–163.
- Clement, C. G. ve Truong, L. D. (2014). An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Human Pathology*, 45(8), 1766–1772. doi:10.1016/j.humpath.2014.04.016
- DANDIL, E. ve SERİN, Z. (2020). Derin Sinir Ağları Kullanarak Histopatolojik Görüntülerde Meme Kanseri Tespiti. *European Journal of Science and Technology*, (August), 451–463. doi:10.31590/ejosat.780705
- Dann, O., Bergen, G., Demant, E. ve Volz, G. (1971). Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 749(1), 68–89. doi:10.1002/jlac.19717490110
- de Haan, K., Zhang, Y., Zuckerman, J. E., Liu, T., Sisk, A. E., Diaz, M. F. P., ... Ozcan, A. (2021). Deep learning-based transformation of H&E stained tissues into special stains. *Nature Communications*, 12(1). doi:10.1038/s41467-021-25221-2
- Deng, G. ve Cahill, L. W. (1994). Adaptive Gaussian filter for noise reduction and edge detection. *IEEE Nuclear Science Symposium & Medical Imaging*

- Conference*, (pt 3), 1615–1619. doi:10.1109/nssmic.1993.373563
- Denis De Senneville, B., Zachiu, C., Ries, M. ve Moonen, C. (2016). EVolution: An edge-based variational method for non-rigid multi-modal image registration. *Physics in Medicine and Biology*, 61(20), 7377–7396. doi:10.1088/0031-9155/61/20/7377
- Dunn, B. E., Almagro, U. A., Choi, H., Sheth, N. K., Arnold, J. S., Recla, D. L., ... Weinstein, R. S. (1997). Dynamic-robotic telepathology: Department of Veterans Affairs feasibility study. *Human Pathology*, 28(1), 8–12. doi:10.1016/S0046-8177(97)90271-9
- Durak, B. (2000). Hematoloji’de FISH, 20–23.
- Durgam, U. K., Paul, S. ve Pati, U. C. (2016). SURF based matching for SAR image registration. *2016 IEEE Students’ Conference on Electrical, Electronics and Computer Science, SCEECS 2016*. doi:10.1109/SCEECS.2016.7509292
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. ve Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissueand cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988. doi:10.1101/pdb.prot4986
- Foulds, L. (1958). The natural history of cancer. *Journal of Chronic Diseases*, 8(1), 2–37. doi:10.1016/0021-9681(58)90039-0
- Frankenstein, Z., Uraoka, N., Aypar, U., Aryeequaye, R., Rao, M., Hameed, M., ... Yagi, Y. (2021). Automated 3D scoring of fluorescence in situ hybridization (FISH) using a confocal whole slide imaging scanner. *Applied Microscopy*, 51(1). doi:10.1186/s42649-021-00053-y
- Gage, K. L. ve Kosoy, M. Y. (2005). Natural history of plague: Perspectives from more than a century of research. *Annual Review of Entomology*, 50(70), 505–528. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130337
- Girolami, I., Parwani, A., Barresi, V., Marletta, S., Ammendola, S., Stefanizzi, L., ... Eccher, A. (2019). The Landscape of Digital Pathology in Transplantation: From the Beginning to the Virtual E-Slide. *Journal of pathology informatics*, 10, 21. doi:10.4103/jpi.jpi_27_19

- Gonçalves, H., Corte-Real, L. ve Goncalves, J. A. (2011). Automatic image registration through image segmentation and SIFT. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 49(7), 2589–2600. doi:10.1109/TGRS.2011.2109389
- Guo, J., Ju, J. ve Turro, N. J. (2012). Fluorescent hybridization probes for nucleic acid detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(10), 3115–3125. doi:10.1007/s00216-011-5526-x
- Haring, M. T., Liv, N., Zonneville, A. C., Narvaez, A. C., Voortman, L. M., Kruit, P. ve Hoogenboom, J. P. (2017). Automated sub-5 nm image registration in integrated correlative fluorescence and electron microscopy using cathodoluminescence pointers. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1–9. doi:10.1038/srep43621
- Hayflick, L. ve Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
- He, X., Meile, C. ve Bhandarkar, S. M. (2022). Multimodal registration of FISH and nanoSIMS images using convolutional neural network models, 1. doi:10.48550/arxiv.2201.05545
- Intensity-Based Automatic Image Registration - MATLAB & Simulink. (y.y.). 18 Mayıs 2022 tarihinde <https://www.mathworks.com/help/images/intensity-based-automatic-image-registration.html> adresinden erişildi.
- Jež, M., Bas, T., Veber, M., Košir, A., Dominko, T., Page, R. ve Rožman, P. (2013). The hazards of DAPI photoconversion: Effects of dye, mounting media and fixative, and how to minimize the problem. *Histochemistry and Cell Biology*, 139(1), 195–204. doi:10.1007/s00418-012-1039-8
- Joshua, O., Ibiyemi, T. ve Adu, B. (2019). A Comprehensive Review On Various Types of Noise in Image Processing. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 10(November), 388–393.
- Juskowiak, B. (2011). Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(9), 3157–3176.

doi:10.1007/s00216-010-4304-5

- Kaur, S. (2015). Noise Types and Various Removal Techniques. *International Journal of Advanced Research in Electronics and Communication Engineering (IJARECE)*, 4(2), 226–230.
- Kim, J. ve Fessler, J. A. (2004). Intensity-based image registration using robust correlation coefficients. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 23(11), 1430–1444. doi:10.1109/TMI.2004.835313
- Klein, S., Staring, M., Murphy, K., Viergever, M. A. ve Pluim, J. P. W. (2010). elastix: A Toolbox for Intensity-Based Medical Image Registration. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(1), 196–205. doi:10.1109/TMI.2009.2035616
- KÜPELİ, C. ve BULUT, F. (2020). Görüntüdeki Tuz Biber ve Gauss Gürültülerine Karşı Filtrelerin Performans Analizleri. *Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 211–239. doi:10.46373/hafebid.768240
- Lambert, T. J. ve Waters, J. C. (2014). Assessing camera performance for quantitative microscopy. *Methods in Cell Biology* (1. bs., C. 123). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00003-3
- Langdale, J. A. (1994). In situ Hybridization BT - The Maize Handbook. M. Freeling ve V. Walbot (Ed.), (ss. 165–180). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4612-2694-9_18
- Langer-Safer, P. R., Levine, M. ve Ward, D. C. (1982). Immunological methods for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14 I), 4381–4385. doi:10.1073/pnas.79.14.4381
- Lee, Y. H. ve Kassam, S. A. (1985). Generalized Median Filtering and Related Nonlinear Filtering Techniques. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, ASSP-33(3), 672–683. doi:10.1109/tassp.1985.1164591
- Li, Q., Kim, Y., Namm, J., Kulkarni, A., Rosania, G. R., Ahn, Y. H. ve Chang, Y. T. (2006). RNA-Selective, Live Cell Imaging Probes for Studying Nuclear Structure and Function. *Chemistry and Biology*, 13(6), 615–623. doi:10.1016/j.chembiol.2006.04.007

- Liggett, W. H. ve Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 16(3), 1197–1206. doi:10.1200/JCO.1998.16.3.1197
- Lowe, D. G. (1999). Object recognition from local scale-invariant features. *Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision* içinde (C. 2, ss. 1150–1157 c.2). doi:10.1109/ICCV.1999.790410
- Lu, Y. J., Deng, Q., Hu, D. P., Wang, Z. Y., Huang, B. H., Du, Z. Y., ... Chow, C. F. (2015). A molecular fluorescent dye for specific staining and imaging of RNA in live cells: A novel ligand integration from classical thiazole orange and styryl compounds. *Chemical Communications*, 51(83), 15241–15244. doi:10.1039/c5cc05551b
- Lukashevich, P. V., Zalesky, B. A. ve Ablameyko, S. V. (2011). Medical image registration based on SURF detector. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 21(3), 519–521. doi:10.1134/S1054661811020696
- Ma, W., Wen, Z., Wu, Y., Jiao, L. ve Member, S. (2017). Remote Sensing Image Registration With Modified. *GeoScience and Remote Sensing Letters*, 14(1), 3–7.
- Mahesh ve Subramanyam, M. V. (2012). Automatic feature based image registration using SIFT algorithm. *2012 3rd International Conference on Computing, Communication and Networking Technologies, ICCCNT 2012*, (July). doi:10.1109/ICCCNT.2012.6396024
- Maity, A., Pattanaik, A., Sagnika, S. ve Pani, S. (2015). A comparative study on approaches to speckle noise reduction in images. *Proceedings - 1st International Conference on Computational Intelligence and Networks, CINE 2015*, (1), 148–155. doi:10.1109/CINE.2015.36
- Manzini, G., Xodo, L., Barcellona, M. L. ve Quadrifoglio, F. (1985). Interaction of DAPI with double-stranded ribonucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 13(24), 8955–8967. doi:10.1093/nar/13.24.8955
- Martino, F., Varricchio, S., Russo, D., Merolla, F., Ilardi, G., Mascolo, M., ... Staibano, S. (2020). A machine-learning approach for the assessment of the

- proliferative compartment of solid tumors on hematoxylin-eosin-stained sections. *Cancers*, 12(5). doi:10.3390/cancers12051344
- Mattes mutual information metric configuration - MATLAB. (y.y.). 18 Mayıs 2022 tarihinde
<https://www.mathworks.com/help/images/ref/registration.metric.mattesmutualinformation.html> adresinden erişildi.
- Metzger, G. J., Dankbar, S. C., Henriksen, J., Rizzardi, A. E., Rosener, N. K. ve Schmechel, S. C. (2012). Development of multigene expression signature maps at the protein level from digitized immunohistochemistry slides. *PLoS ONE*, 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0033520
- Moench, T. R., Gendelman¹, H. E., Clements, J. E., Narayan, O. ve Griffin, D. E. (1985). Efficiency of in situ hybridization as a function of probe size and fixation technique. *Journal of Virological Methods*, 11(2), 119–130. doi:10.1016/0166-0934(85)90035-7
- Montero, C. (2003). The Antigen – Antibody Reaction in Immunohistochemistry, 51(1), 1–4.
- Nacar, E. ve Nacar, A. (2017). Hematoksilen ve Eozin: Histopatologların Eskimeyen Dostları. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 8(29), 46–46. doi:10.17944/mkutfd.209597
- Nederlof, P. M., van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S. ve van der Ploeg, M. (1990). Multiple fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 11(1), 126–131. doi:10.1002/cyto.990110115
- Niazi, M. K. K., Parwani, A. V. ve Gurcan, M. N. (2019). Digital pathology and artificial intelligence. *The Lancet Oncology*, 20(5), e253–e261. doi:10.1016/S1470-2045(19)30154-8
- Oliveira, F. P. M. ve Tavares, J. M. R. S. (2014). Medical image registration: A review. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 17(2), 73–93. doi:10.1080/10255842.2012.670855
- Papademetris, X., Jackowski, A. P., Schultz, R. T., Staib, L. H. ve Duncan, J. S. (2004). Integrated Intensity and Point-Feature Nonrigid Registration BT - Medical Image

- Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2004. C. Barillot, D. R. Haynor ve P. Hellier (Ed.), (ss. 763–770). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Pardue, M. L. ve Gall, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(2), 600–604. doi:10.1073/pnas.64.2.600
- Patel, M. S., Patel, N. M. ve Holia, M. S. (2015). Feature based multi-view image registration using SURF. *2015 International Symposium on Advanced Computing and Communication (ISACC)* içinde (ss. 213–218). doi:10.1109/ISACC.2015.7377344
- Patidar, P., Gupta, M. ve Nagawat, A. K. (2010). Image Denoising by Various Filters for Different Noise Image De-noising by Various Filters for Different Noise Sumit Srivastava. *International Journal of Computer Applications*, 9(4), 975–8887.
- Ramos-Vara, J. A. ve Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87. doi:10.1177/0300985813505879
- Rana, A., Lowe, A., Lithgow, M., Horback, K., Janovitz, T., Da Silva, A., ... Shah, P. (2020). Use of Deep Learning to Develop and Analyze Computational Hematoxylin and Eosin Staining of Prostate Core Biopsy Images for Tumor Diagnosis. *JAMA Network Open*, 3(5), 1–15. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.5111
- Ratan, Z. A., Zaman, S. Bin, Mehta, V., Haidere, M. F., Runa, N. J. ve Akter, N. (2017). Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*, 9(6). doi:10.7759/cureus.1325
- Rohé, M.-M., Datar, M., Heimann, T., Sermesant, M. ve Pennec, X. (2017). SVF-Net: Learning Deformable Image Registration Using Shape Matching BT - Medical

- Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2017. M. Descoteaux, L. Maier-Hein, A. Franz, P. Jannin, D. L. Collins ve S. Duchesne (Ed.), (ss. 266–274). Cham: Springer International Publishing.
- Rohit, V. ve Ali, J. (2013). A Comparative Study of Various Types of Image Noise and Efficient Noise Removal Techniques. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 3(10), 2277–128.
- Roy, S., kumar Jain, A., Lal, S. ve Kini, J. (2018). A study about color normalization methods for histopathology images. *Micron*, 114, 42–61. doi:10.1016/j.micron.2018.07.005
- RUDKIN, G. T. ve STOLLAR, B. D. (1977). High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature*, 265(5593), 472–473. doi:10.1038/265472a0
- RUSSELL, W. C., NEWMAN, C. ve WILLIAMSON, D. H. (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, 253(5491), 461–462. doi:10.1038/253461a0
- S. G. BALLARD ve WARD, D. C. (1993). Fluorescence In Situ Hybridization Using Digital Imaging Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41(12), 1755–1759. doi:10.1088/2058-7058/8/5/36
- Scholzen, T. ve Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311–322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- Shi, Q., Xu, L., Yang, R., Meng, Y. ve Qiu, L. (2019). Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. *Oncology Letters*, 18(2), 1351–1355. doi:10.3892/ol.2019.10430
- Singh, P. ve Shree, R. (2016). A Comparative Study to Noise Models and Image Restoration Techniques. *International Journal of Computer Applications*, 149(1), 18–27. doi:10.5120/ijca2016911336
- Smith, S. M. ve Brady, J. M. (1997). SUSAN - A new approach to low level image processing. *International Journal of Computer Vision*, 23(1), 45–78.

doi:10.1023/A:1007963824710

- Suat TORAMAN. (2010). HİSTOPATOLOJİK İMGELERİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE ÖRÜNTÜ TANIMA TEMELLİ KARAR DESTEK SİSTEMLERİ, 4, 75–82.
- Tareen, S. A. K. ve Saleem, Z. (2018). A comparative analysis of SIFT, SURF, KAZE, AKAZE, ORB, and BRISK. *2018 International Conference on Computing, Mathematics and Engineering Technologies: Invent, Innovate and Integrate for Socioeconomic Development, iCoMET 2018 - Proceedings, 2018-Janua*, 1–10. doi:10.1109/ICOMET.2018.8346440
- The, T. H. ve Feltkamp, T. E. (1970). Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II. A reproducible method. *Immunology*, 18(6), 875–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4913804> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1455722> adresinden erişildi.
- Titus, J. A., Haugland, R., Sharrow, S. O. ve Segal, D. M. (1982). DNP, 2,4-dinitrophenyl; BSA, bovine serum albumin; FITC, fluo- rescein isothiocyanate; FMF, flow microfluorometry. *Computer*, 50, 193–204.
- Trask, B. J. (1991). DNA Sequence Localization in Metaphase and Hybridization, 35, 3–35.
- Trilla, A., Trilla, G. ve Daer, C. (2008). The 1918 “Spanish Flu” in Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 47(5), 668–673. doi:10.1086/590567
- Tuls, J., Geren, L. ve Millett, F. (1989). Fluorescein isothiocyanate specifically modifies lysine 338 of cytochrome P-450(scc) and inhibits adrenodoxin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16421–16425. doi:10.1016/s0021-9258(19)84723-3
- Wang, C. W., Ka, S. M. ve Chen, A. (2014). Robust image registration of biological microscopic images. *Scientific Reports*, 4, 1–12. doi:10.1038/srep06050
- Wang, X., Chen, X., Li, Y., Liu, H., Li, S., Zhang, R. R. ve Zheng, B. (2012). Fluorescence in situ hybridization (FISH) signal analysis using automated generated projection images. *Analytical Cellular Pathology*, 35(5–6), 395–405. doi:10.3233/ACP-2012-0068

- Wetmur, J. G. ve Fresco, J. (1991). DNA probes: Applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3–4), 227–259. doi:10.3109/10409239109114069
- Wilcox, J. N. (1993). Fundamental principles of in situ hybridization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(12), 1725–1733. doi:10.1177/41.12.8245419
- Wyawahare, M. V, Patil, P. M. ve Abhyankar, H. K. (2009). Image Registration Techniques : An overview. *International Journal of Signal Processing, Image Processing and Pattern Recognition*, 2(3), 11–28.
- Xu, G., Su, J., Pan, H., Zhang, Z. ve Gong, H. (2009). An image enhancement method based on gamma correction. *ISCID 2009 - 2009 International Symposium on Computational Intelligence and Design*, 1, 60–63. doi:10.1109/ISCID.2009.22
- Yagi, Y., Yoshioka, S., Kyusojin, H., Onozato, M., Mizutani, Y., Osato, K., ... Louis, D. N. (2012). An ultra-high speed whole slide image viewing system. *Analytical Cellular Pathology*, 35(1), 65–73. doi:10.3233/ACP-2011-0042
- Yasein, M. S. ve Agathoklis, P. (2008). A feature-based image registration technique for images of different scale. *Proceedings - IEEE International Symposium on Circuits and Systems*, 3558–3561. doi:10.1109/ISCAS.2008.4542228
- Zhang, L., Kong, H., Ting Chin, C., Liu, S., Fan, X., Wang, T. ve Chen, S. (2014). Automation-assisted cervical cancer screening in manual liquid-based cytology with hematoxylin and eosin staining. *Cytometry Part A*, 85(3), 214–230. doi:10.1002/cyto.a.22407
- Zhang, T., Zhao, R. ve Chen, Z. (2020). Application of migration image registration algorithm based on improved SURF in remote sensing image mosaic. *IEEE Access*, 8, 163637–163645. doi:10.1109/ACCESS.2020.3020808
- Zhao, B., Chen, X., Li, Z., Yu, Z., Yao, S., Yan, L., ... Han, C. (2020). Triple U-net: Hematoxylin-aware nuclei segmentation with progressive dense feature aggregation. *Medical Image Analysis*, 65, 101786. doi:10.1016/j.media.2020.101786
- Zhu, Y., Cheng, S., Stanković, V. ve Stanković, L. (2013). Image registration using

BP-SIFT. *Journal of Visual Communication and Image Representation*, 24(4), 448–457. doi:10.1016/j.jvcir.2013.02.005



EKLER

EK-1. FISH Boyama Tipleri Ve Kullanım Amaçları (Ratan ve diğerleri, 2017)

Numara	FISH Tipleri	Kullanım amaçları
1	Alpha (1cen), classical (klasik) (1q12) ve midi (1p36.3) kromozom 1 uyduları ile FISH (ACM-FISH)	Sperm hücrelerinde meydana gelen kromozomlardaki yapısal ve sayısal saptanması
2	ArmFISH	M-FISH 42 renk içeren varyantı olan boyama, kromozomdaki uzun kollardaki (p ve q kolları) değişimler
3	Katalize edilmiş iletici birikimi ile FISH (Catalyzed reporter deposition FISH) (CARD-FISH)	Peroksinaz kullanılarak yapılan işlemlerde etrafında çoğalan parçacıkların sinyal ile tespit edilmesi
4	FISH ile temporal aktivitenin hücrel bölünme analizi (Cellular compartment analysis of temporal activity by FISH) (CAT-FISH)	Beyinde gerçekleşen nöron aktivitelerinin RNA problemleri ile incelenmesi
5	Kromozom yönlendirmeli (Chromosome Orientation) CO-FISH	Standart FISH yönteminden elde edilen bilginin bir kromozom içindeki iki veya daha fazla DNA dizisinin yönlendirmesini içerecek şekilde genişletilmesi
6	Cytochalasin (Sitokalazin)	Mikroçekirdekleşme ve anöplöidi içeren

	B FISH (CB-FISH)	çift çekirdekli hücrelerin CB ile tamir edilerek bloke edildiği hibridizasyonu işlemi
7	Chromosome Orientation and Direction (Kromozom yönlendirmeli ve yönetimli) FISH (COD-FISH)	Genin kendini kopyalama miktarını ve hücredeki protein miktarının tespit edilmesi
8	Comet-FISH	Belirli genom bölgelerindeki DNA hasarının tespit edilmesi.
9	Double Fusion (Çift Kaynaşmalı) FISH (D-FISH)	BCR/ACL allel genlerinin translokasyonunun tespiti
10	DNA Breakage Detection (DNA parçalanma tespiti) FISH (DBD-FISH)	DNA'nın bir parçasında meydana gelen parçalanma veya bozulma tespiti
11	Fiber-FISH	Kromatin ipliklerinin veya DNA ipliklerinin içerisinde bulunan kromozoların yüksek çözünürlükte haritalanması
12	Flow-FISH	Akış(Flow) Sitometri tekniği kullanılarak hücre içerisinde telomerlerin boyutunun hesaplanması
13	Harlequin-FISH	Kontrollü hücre çoğalma döngüsü içerisinde kromozom hasarının insan lenfositleri içerisindeki kesin tespiti

14	Immuno-FISH	İmmünofloresan ve FISH yöntemi birleşimi ile DNA ve proteinlerin aynı örnek üzerinden tespit edilmesi
15	Multiplex (Çoklu katmanlı) FISH (M-FISH)	Farklı boyaların tek bir gen üzerinde farklı kromozomları işaretlemek için kullanılması
16	Multilocus FISH (ML-FISH)	Çoklu mikro-silinme sendromlarının, çok renkli FISH yönteminde farklı problemlerle belirlenmesi
17	Premature Chromosome Condensation (Erken Kromozom Yoğunlaşması) FISH (PCC-FISH)	Radyasyona veya ışın tedavisine maruz kalmış kromozomda hasar tespiti
18	Quantitative (Sayısal) FISH (Q-FISH)	Bir kromozomun üzerindeki kendini çokça tekrar etmiş telomerlerin tespit edilmesi
19	Quantum Dots (Kuantum noktalar) FISH (QD-FISH)	İnsan metafaz kromozomları, insan sperm hücreleri ve bakteri hücrelerinde kullanılan nano-boyuttaki inorganik floroforlar ile FISH analizi
20	Reverse-FISH	İşaretleyici ve bölgesel kanser kromozomlarının çoğalmalarının tanımlanması
21	Recognition of Individual Genes (Bireysel Genlerin Tanınması) FISH (RING-FISH)	Bir bakteri hücresindeki genetik materyalin herhangi bir bölümünün görselleştirilmesini ve hassasiyetini artırmak için yüksek konsantrasyonlarda polinükleotid problemleri ile ortaya çıkan

			yüzük şekilli hibridizasyon kullanılması
22	RNA-FISH	mRNA	moleküllerinin tespiti, lokalizasyonu ve sayısındaki herhangi bir değişikliğin tespiti
23	Tissue (Doku) FISH (T-FISH)	Genlerde bulunan	parçacıkların haritalanması ve spesifik parçaların tespiti



EK-2 Histopatoloji Görüntüleri İçin Farklı Renk Normalleştirme Yöntemleri (Roy ve diğerleri, 2018)

Amaç	İşlemler	Avantajlar
Histogram Tanımlaması (1992)	• RGB görüntünün $l\alpha\beta$ ($l*\alpha*\beta$) boşluğuna dönüştürülmesi. • Kaynak görüntünün histogramı ile hedef görüntü histogramının eşleştirilmesi. • $l\alpha\beta$ ($l*\alpha*\beta$) görüntüsünden RGB dönüşümü.	• İşlenmiş görüntü ile hedef görüntüsünün aynı renk doygunluğuna sahip olması.
Bağımsız Bileşen Analizi (Independent Component Analysis, ICA) ve Negatif Olmayan Matris Çarpanlara Ayırma (Non-negative Matrix Factorization, NMF) Metotlarını Kullanarak Tayf Ayırımı (2002)	• Boya renk matrisinin (S) ve boyanın derinlik matrisinin (C) katsayılarının pozitif olduğu yerlerde NMF metoduyla çarpanlarına ayrılması • Matriste Özdeğerlerinin Ortak Yaklaşım (Joint Approximate Diagonalization of Eigenmetrics, JADE) yöntemi ile ICA ayırıştırma metodu ile bağımsız bileşenlerin kullanılması.	• Gözetimli metotta uygulanan tahminin aksine burada bütün katsayıların tahminine gerek yoktur. • Tekli Ayırıştırma Yöntemi aksine, burada negatif değer içeren katsayının bulunmaması.
Işık dalgalarının	• RGB görüntüden Optik	• NMF metodunda

birbirine karışması ile ortaya çıkan koyu çizgilerin uygulanması (Fringing) yöntemi (2009)	Yoğunluk (Optical Density, OD) formatına dönüşüm. • Tekli Ayırıştırma Yöntemi yapılması ve matristeki en büyük tekil değerlerin kullanılması ile yeni bir düzlem çıkarılması. • Yeni düzleme sahip olunan değerlerin aktarılması ile açılarının bulunması. • Sahip olunan en büyük ve en küçük açı değerleri α^{th} ve $(100-\alpha)^{\text{th}}$ yüzdelik yöntemi ile net bir şekilde bulunması. • Ekstrem değerlerin OD boşluğuna geri döndürülmesi.	ortaya çıkan belirsizlik sorununun bulunmaması. • S matrisinde negatif değer içeren katsayı bulunmaması.
Doğrulama Matrisi ile Renklerin Ayarlanması (2014)	• Doğrusal olmayan matrisin doğrusal matrise dönüştürülmesi. • Renk doğrulama matrisinin, heder görüntü ile kaynak görüntü arasındaki en küçük kare hata ile hesaplanması. • Doğrusal RGB görüntünün üzerinde renk düzeltmesi işlenmesi ve devamında gama düzeltmesi yapılması.	• Küresel dönüşüm uygulanması sayesinde, işlem kolaylaşmaktadır.

		Görüntünün asıl RGB formuna dönüştürülmesi.	
Boya Tanımlanması (Stain Color Descriptor, SCD) ve Uygunluk Renk Makinesi sınıflandırması (2014)	Renk	- Sayısal olarak ayarlanmış histogram deneme setlerinde kullanılan renk histogramlarını türetme. - Uygunluk Vektör Makinesi (Relevance Vector Machine) regresyon ve olasılıklı sınıflandırma yaparak, her boyanın renginin ayrı olarak tespit etmek için denetimli sınıflandırma metodu ile temel olasılık haritalarının öğretilmesi. - Kaynak görüntüye rengi aktarmak amacıyla eğri doğrusal olmayan fonksiyon kullanılması.	- Denetimli yöntemler arasında diğerlerinden ayrılan bir yöntemdir. - Piksel boyutunda çalıştığından görüntü ayırımında daha etkili sonuçlar vermektedir.
WSI standartlaştırması (2016)	renk	- Ton-doygunluk-yoğunluk (Hue-saturation-density) modellemesi uygulanarak RGB renk skalasındaki görüntüyü iki farklı kromatik ve bir yoğunluk parçasından oluşan bir yapıya dönüştürmesi. - H&E bazlı boya ile kromatik ve yoğunluk	- WSI içerisindeki boya parçalarının denetimsiz bir metot ile uyumlu bir şekilde çalışması. - Görüntünün içerdiği uzaysal bilginin algoritmanın

	dağılımı elde edilmesi.	sağlamlığını arttırmasını sağlar.
	- Kullanılan boyanın katkısının ağırlıklandırılması. - Görüntünün Ton-doygunluk-yoğunluk modellemesinden RGB alanına geri dönüştürülmesi.	
Merkezileştirme kullanılarak yapılan renk normalleştirme yöntemi (2017)	- RGB ağırlıklı görüntüyü, insan renk algılamasına daha yakın olan ton-doygunluk-değer (hue-saturation-value) renk tonlarına çevrilmesi. - Bütün piksel değerlerinin kartezyen koordinat sistemine aktarılması ile kümelenmesi. - Kümelenmiş her pikselin merkezileştirme yapılmış ton-doygunluk-değer içeren renk değerleri ile eşleştirilmesi.	- Alınan dokunun görüntüdeki ana yapısını korumaktadır. - Ton-doygunluk-değer renk alanındaki değerlerin çeşitliliği 6 ile 16 kat arası azalmıştır.
Ayrık otomatik kodlayıcılar kullanılan renk normalleştirme (2017)	Rastgele alınan örneklerin denetimsiz derin öğrenme algoritması olan ayrık otomatik kodlayıcılar kullanılarak eğitilmesi.	- Farklı tarayıcıların sebep olduğu renk çeşitliliğinin azaltılması. - Evrensel olarak

	• Öğrenilmiş filtrenin kaynak görüntü ve hedef görüntü üzerinde kullanılması. • Denetimsiz bir kümeleme yaklaşımının, K kümelenmesinin merkezini bulmak amacıyla kaynak görüntüye uygulanması. • Kümeler ile renklerin histogram eşleştirmesi.	kullanılan normalleştirme tekniklerinin zayıf kalması sebebiyle, Ayrık otomatik kodlayıcılar kullanılan renk normalleştirme tekniği ile birlikte etkinlik seviyesi arttırılmıştır.
Ayırt edici modelleme üzerinden boya normalleştirme (2017)	• Göreve uygun ayırt edici model kullanılarak, farklı dağılım gösteren görüntüler arasında doğrusal olmayan haritalama ile boya normalleştirilmesine sahip olması. • Boyalar veya lekeler arasında transfer amacıyla kodlayıcı veya kod çözücü kullanılması.	• Düşük seviyede bilgi içeren bölgeler dâhil olmakla birlikte orijinal görüntüdeki tüm bilgileri korumaktadır. • Düzenleme kaybını da kullanarak görüntünün yapısal bilgilerini korumaktadır.
Üretken Çekişmeli Ağ kullanılan boya normalleştirme (2018)	• RGB içeren görüntüyü Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (Commission internationale de l'éclairage, CIE) Lab renk skalasına çevrilmesi.	• Kaynak yoğunluk bilgilerini korumaktadır. • Kaynak görüntünün parlaklığını

	• Üretici ağ ile korumaktadır. renklendirilmiş H&E elde edilmesi. • Yardımcı ağ kullanımı ile dönüştürülmüş H&E görüntüsünde oluşan gürültünün tespiti. • Ayırt edici ağ kullanılarak oluşturulan renkli görüntünün ana görüntüden farkının ayırt edilmesi. • CIE Lab renklerine sahip görüntünün, RGB renk aralığına geri dönüşümü.	• Normalleştirilmiş görüntünün karşıtlık oranı arttırılmaktadır.
Çekişmeli Sürekli Döngü Ağı bağıntılı derin öğrenme çözümü (2018)	• Çekişmeli Sürekli Döngü Ağı bağıntılı Eşlenmemiş, Görüntüden Görüntüye çeviri yapılması. • Boya veya leke normalleştirme problemleri için biçim transferi yapılması.	• ROC eğrisinin altında kalan alanının %12 artışı ile birlikte meme kanserinde kullanılmaktadır. • Hedef aralık ile yüksek görsel benzerlik içermektedir. • Manuel olarak rastgele seçilmiş örneğe ihtiyacın kalmaması.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Zafer SÜNETCİ

Uyruğu: T.C.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü/NanoBilim-NanoMühendislik	2019-2022
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi, Yönetim Bilişim Sistemleri	2020-...
Lisans	Yeditepe Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü (Başlangıçta 1 yıllık İngilizce Hazırlık Eğitimi)	2018
Lise	Çemberlitaş Anadolu Lisesi	2012

DENEYİMLER

Tarih	Kurum	Görev
Temmuz – Ağustos 2017	Yeditepe Hastanesi	Üniversitesi Mühendis Stajyer

YABANCI DİLLER

Türkçe	Anadil seviyesinde
İngilizce	İleri seviye
Almanca	Başlangıç Seviyesi

