ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAREKETLİ HÜCRELERİN DERİN ÖĞRENME İLE BÖLÜTLENMESİ VE TAKİP EDİLMESİ

Mehmet Emin BAKIR

BİLGİSAYAR MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2021

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HAREKETLİ HÜCRELERİN DERİN ÖĞRENME İLE
BÖLÜTLENMESİ VE TAKİP EDİLMESİ

Mehmet Emin BAKIR

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hacer YALIM KELEŞ

Mikroskop görüntülerinde hücrelerin tespiti ve takibi araştırmacıların üzerinde yoğun olarak çalıştığı aktif araştırma konularından biridir. Bu çalışmalar, hücrelerin davranışlarını hesaplamalı modellerle takip etmek ve anlamak için oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında, mikroskop ile elde edilen görüntü setlerindeki hareketli hücrelerin derin öğrenme yöntemleri kullanılarak otomatik olarak bölütlenmesi ve takip edilmesi konusunda çalışmalar yürütülmüştür. Çalışma sonunda, başarı oranı yüksek sonuçlar ortaya çıkarmanın yanı sıra, az sayıda parametre içeren bir model ile bunu gerçekleştirerek modelin kullanılabilirliğinin yüksek olması amaçlanmıştır. Daha önce var olan yöntemlerin bitişik hücreleri ayırmada zorluk yaşadığı gözlemlendiğinden, problem iki kısımda çözülmeye çalışılmıştır. Önce bir konvolüsyonel sinir ağı kullanarak her bir farklı hücrenin yeri tespit edilmiştir. Daha sonra bu ağın sonucu öncü bilgi olarak kullanılarak yeni bir konvolüsyonel ağ ile hücre sınırları belirlenmiştir. Her iki ağ da medikal görüntülerde çok kullanılan U-Net mimarisinde tasarlanmıştır. Tam bölütleme için model çıktılarına watershed algoritması uygulanarak her bir hücrenin etiketlenmesi ve görüntü seti üzerindeki takibi sağlanmıştır. Görüntülerdeki hücre yoğunluğuna uygun kayıp fonksiyonu kullanılarak başarı artırılmıştır. Önerilen yöntem ile DIC-C2DH-HeLa veri setinde 0.958 tespit, 0.850 bölütleme performansı ile bu veri setindeki en başarılı çalışmalara oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Ocak 2021, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: hücre bölütlenmesi, hücre takibi, derin öğrenme, watershed,U-Net

ABSTRACT

Master Thesis

SEGMENTATION AND TRACKING OF MOVING CELLS
WITH DEEP LEARNING

Mehmet Emin BAKIR

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

Supervisor: Doç. Dr. Hacer YALIM KELEŞ

Detection and tracking of cells in microscope images is one of the active topics that researchers are working on. The studies in this field are very crucial for tracking and understanding the behavior of cells with computational models. In this thesis, our aim is to automatically segment and track the images that are obtained using microscopes with deep learning methods. In addition to achieving a high success scores, we also aim to design a computational model with fewer parameters. Since we observed that previously existing methods had difficulty in separating touching cells, we approached solving the problem in two parts. First, the location of each different cell is determined using a convolutional neural network. Then, using the output of this network as the prior information, a new convolutional network is trained to determine cell boundaries. U-Net architecture, which is a widely used model in medical image segmentation, is used in both our networks. For full segmentation, each cell is labeled on the dataset by applying the watershed algorithm to the model outputs. The model performance is improved by using the focal loss function, which is appropriate for imbalanced data. On the DIC-C2DH-HeLa data set, 0.958 detection and 0.85 segmentation scores are obtained with our proposed method. These scores are very close to state-of-art methods in this data set.

January 2021, 43 pages

Key Words : cell segmentation, cell tracking, deep learning, watershed, U-Net

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşerî ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Hacer YALIM KELEŞ'e (Ankara Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı), çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar göstererek beni destekleyen kıymetli eşime ve aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Mehmet Emin BAKIR
Ankara, Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Tezin Amacı **2**
1.2 Hücrelerin Bölütlemesi **2**
1.3 Hücrelerin Takibi **3**
1.4 Veri Seti **4**
1.5 Zorlayıcı faktörler **6**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **7**
2.1 Hücre Bölütleme Çalışmaları **9**
2.2 Hücre Takip Çalışmaları **11**
2.3 Başarının Ölçütleri **11**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **14**
3.1 Veri Seti Düzeltme **16**
3.2 Ön İşlemler **18**
3.3 Hücrelerin Bölütlemesi İşlemleri **19**
3.3.1 Histogram eşitleme **19**
3.3.2 U-Net mimarisi **20**
3.3.3 Önerilen yöntemin yapısı **22**
3.3.4 Kayıp fonksiyonu **24**
3.3.5 Hücre tespit ağı **25**
3.3.6 Hücre bölütleme ağı **26**
3.3.7 Modellerin eğitimi **27**
3.3.8 Eşikleme işlemi **28**
3.3.9 Watershed işlemi ve etiketleme **28**
3.4 Hücrelerin Takibi İşlemleri **29**
4. DENEYSEL BULGULAR **31**
4.1 Hücre Bölütleme Deneyleri **31**
4.2 Hücre Takip Denemeleri **35**
5. SONUÇ VE TARTIŞMA **38**
KAYNAKLAR **40**
ÖZGEÇMİŞ **44**

SİMGELER DİZİNİ

CNN	Konvolüsyönel Sinir Ağları
CTC	Cell Tracking Challenge
DIC	Diferansiyel Girişim Kontrast Mikroskobu
PhC	Faz Kontrast Mikroskobu
FLuO	Florasan Mikroskobu
Konv	Konvolüsyon Katmanı
ReLU	Doğrultulmuş lineer birim fonksiyonu
HTA	Hücre Tespit Ağı
HBA	Hücre Bölütleme Ağı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Hücre bölütlemesi (Yukarıdan aşağıya) Orijinal görüntü, bölütlenmiş görüntü, etiketlenmiş görüntü 3

Şekil 1.2 Hücrelerin (Şekil 1.1'deki) zamanla takibi 4

Şekil 1.3 Farklı türdeki etiketler (a) Orjinal görüntü (b) altın bölütleme (c) gümüş bölütleme (d) altın takip 5

Şekil 1.4 Zorluklar ile ilgili örnekler (Soldan sağa) Düzensiz hücre şekilleri, düşük hücre zemin kontrast farkı, hücre içi heterojenlik, yüksek hücre yoğunluğu 6

Şekil 2.1 Orijinal görüntü, tespit için kullanılan etiket ve örnek tam bölütlemiş çıktısı 12

Şekil 2.2 (Soldan sağa) Orijinal görüntü, doğru zemin, tahmin sonucu, sonuç ile doğru zemin karşılaştırması 13

Şekil 3.1 İki sınıflı model denemesi (a) Orijinal görüntü (b) Gerçek zemin (c) Model sonucu 14

Şekil 3.2 Farklı hücre sınırları. Kırmızı zemin, mavi hücre, yeşil hücre sınırı (Soldan sağa) Hücre sınırı yok ve sırasıyla 2,32,64 piksel genişliğinde hücre sınırı olarak düzenlenmiş hali..... 15

Şekil 3.3 Tek U-Net ile İki bağlantılı U-Net karşılaştırması (Soldan sağa) Orijinal görüntü, tek U-Net ağı çıktısı, iki ağlı U-Net Çıktısı, gümüş etiket görüntüsü ... 16

Şekil 3.4 Ardışık iki görüntüdeki etiketleme eksikliği (a) Orijinal görüntü (b) Gümüş bölütleme seti (c) Altın takip seti (d) Düzeltilmiş veri seti 17

Şekil 3.5 Etiketlerin üç sınıflı hale getirilmesi (kırmızı) zemin (mavi) hücre (yeşil) hücre sınırı..... 18

Şekil 3.6 Histogram eşitlemesi. (a) Orijinal görüntü (b) histogram eşitlemesi sonucu (c) etiketli görüntü..... 20

Şekil 3.7 (a) Şekil 3.6(a)'da ki görüntünün histogramı (b) Histogram eşitlemeden sonra elde edilen histogram 20

Şekil 3.8 U-Net Mimarisi..... 21

Şekil 3.9 Önerilen Yöntemin Yapısı (a) Orijinal görüntü (b) U-Net mimarisindeki hücre tespit ağı (c) Eşikleme (d) İkinci ağ için oluşturulan girdi verisi (e) U-Net mimarisindeki hücre bölütleme ağı (f) Çok sınıflı ikinci ağ çıktısı (g) Faklı hücreleri etiketlmek için Watershed algoritması (h) Önerilen yöntem çıktısı 23

Şekil 3.10 Hücre tespit ağı sonuçları (a) Orijinal görüntü (b) Ön işlemden geçirilmiş ağ girdi görüntüsü (c) Çıktı görüntüsü 25

Şekil 3.11 Hücre bölütleme ağı girdi görüntüsü oluşturma 26

Şekil 3.12 Hücre bölütleme ağı örnek çıktısı 26

Şekil 3.13 Hücre tespit ağı eğitim doğruluk grafiği 27

Şekil 3.14 Birinci model çıktısı ve eşikleme uygulanmış hali 28

Şekil 3.15 Watershed algoritması girdi ve çıktıları (a) İkinci model sonucu (b) waterhed işaret girdisi (c) watershed girdi görüntüsü (d) watershed çıktısı 29

Şekil 3.16 Ardışık iki bölütlenmiş görüntü ve bu görüntüler arası değişim 30

Şekil 4.1 Farklı eşik değerlerinin etkisi (Soldan sağa) Birinci ağ çıktısı , uygun eşik değeri, yüksek eşik değeri, düşük eşik değeri 32

Şekil 4.2 Önerilen yöntemin aşamalarının örnek üzerinde gösterimi (a) Orijinal görüntü (b) histogram eşitlemesi (c) Birinci model çıktısı (d) ikinci model çıktısı (e) Önerilen yöntemin sonucu (f) Gerçek zemin..... 33

Şekil 4.3 Örnek sonuçlar (a) Orijinal görüntü (b) Gerçek zemin (c) Önerilen yöntem çıktısı (d) Önerilen yöntem çıktısının orijinal görüntü üzerinde gösterimi..... 34

Şekil 4.4 Bölütlenmiş ardışık görüntülerde hücre takibi..... 36

Şekil 5.1 Fazla Bölütlenme Sorunu (Soldan sağa) Orijinal görüntü, bölütlenmiş görüntü, Orijinal üzerine eklenmiş bölütlenmiş görüntü 39

Şekil 5.2 Önerilen yöntemin başarılı örneği 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Etiket detayları 5

Çizelge 2.1 Hücre takibinde başarı oranını düşüren durumlar ve ağırlıkları 13

Çizelge 3.1 DIC-C2DH-HeLa veri setinde farklı hücre sınırı kalınlığında tespit. skorları 15

Çizelge 3.2 Kullanılan veri artırma teknikleri 19

Çizelge 3.3 DIC-C2DH-HeLa veri setinde farklı kayıp fonksiyonlarında başarı skorları 24

Çizelge 3.4 Eğitilen ağların girdi ve çıktıları 27

Çizelge 4.1 DIC- C2DH -HeLa veri seti görüntü dağılımı 31

Çizelge 4.2 DIC-C2DH-HeLa Eğitim Set 2 üzerinde farklı yöntemlerin sonuçları 32

Çizelge 4.3 Farklı koşullarda yapılan deneyler ve skorları 33

Çizelge 4.4 DIC-C2DH-HeLa yarışma setinde elde edilen sonuçlar. * ilgili sonucun 15 Aralık 2020 tarihinde CTC websitesinde alındığını belirtir. CALT-US : Fidel A. G. Pena, Federal University of Pernambuco, Brazil;MU-Lux-CZ : Filip Lux, Masaryk University, Czech Republic; UVA-NL : Andreas Panteli,University of Amsterdam, The Netherlands;TUG-AT : Christian Payer, Graz University of Technology,Austria;BGU-IL : Assaf Arbelle, Ben-Gurion University. of the Negev, Israel;CVUT-CZ : Tomáš Sixta,Czech Technical University in Prague, Czech Republic 35

Çizelge 4.5 Veri setlerindeki takip başarı oranları 37

Çizelge 4.6 Takip algoritması benzerlik oranı deneyleri 37

1. GİRİŞ

Hücreler canlılar üzerinde çalışan bilim insanlarının sürekli incelediği ve merak ettiği yapılardan biridir. Hücrelerin hareketlerini algılamak, zaman içinde çoğalmalarını takip etmek hem normal doku gelişiminde, hem de birçok hastalıkta etkilerini anlamak için önemlidir. Hücrelerin göç hareketlerini ve birbirleriyle olan etkileşimlerini anlayarak birçok hastalığın önceden fark edilmesi sağlanabilmektedir (Vicente vd. 2011 ve Trepat vd. 2012). Hücreler, farklı teknolojilerdeki mikroskoplar ile görüntülenebilmektedir. Elde edilen bu görüntülerdeki hücreleri bölütlemek ve hareketlerini takip etmek manuel olarak çok vakit almaktadır. Ayrıca bu görüntülerin kalitesi düşük olanlarında hücreleri insan gözü ile ayırt etmek oldukça güçtür. Bu durumda, hareketli hücrelerin bölütlenmesi ve takip edilmesi bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu konu üzerinde birçok araştırma çalışması yürütülmektedir. Görüntü işleme algoritmaları ile hücrelerin bölütlemesini yapan yöntemler olduğu kadar derin öğrenme kullanan yöntemler de başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak, yöntemlerin başarısı kadar kullanılabilirliği de önemlidir. Çok fazla kullanıcı müdahalesi gerektiren yöntemlerin kullanılabilirliği azdır. Bu yüzden bilim insanları daha çok öğrenme tabanlı yöntemlere yönelmişlerdir ve derin öğrenme yöntemlerini kullanarak birçok yöntem geliştirilmiştir.

Bu alandaki önceki çalışmalar incelediğinde, hücre bölütlemesi için basit eşikleme yöntemleri, histerezis eşikleme, kenar algılama, şekil eşleştirme, kısa uzun dönem hafıza (Arbelle vd. 2019), konvolüsyonel sinir ağları (CNN) kullanan derin öğrenme metotları ve enerji azaltma yaklaşımları kullanılmıştır (Ulman vd. 2017). Derin öğrenme yöntemleri ile görüntü işleme algoritmalarını birlikte kullanan çalışmalar daha başarılı sonuçlar elde etmiştir (Schmidt vd. 2018, Pena 2018, Lux vd. 2019). Ronneberger vd, (2015) tarafından geliştirilen ve U-Net mimarisi olarak bilinen konvolüsyonel sinir ağı bu çalışmalara temel olmuştur. Hücre takibi için ise ardışık görüntülerdeki benzerliklerden yola çıkılarak yöntemler geliştirilmiştir (Ulman vd. 2017).

Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda, U-Net mimarisini kullanan sinir ağları, eşikleme işlemi ve watershed algoritmasının birlikte kullanılmasıyla bölütleme yapılmıştır. Geliştirilen bölütleme yöntemi, diğer yöntemlerden farklı olarak, birbiriyle bağlantılı iki

konvolüsyonel sinir ağından oluşmaktadır. Ayrıca bölütlenen hücrelerin konum benzerlik oranlarına göre görüntü dizini üzerindeki takibi yapılmıştır.

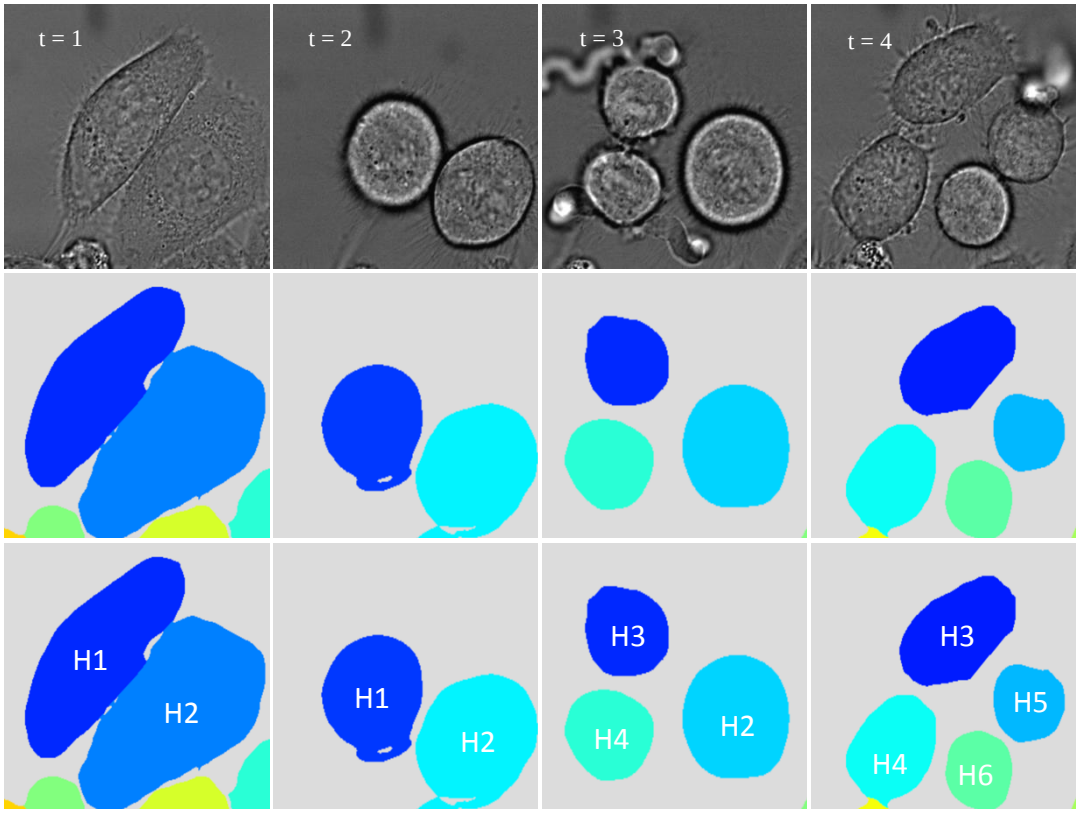
Bu bölümde tezin amacı, çalışılan veri seti, hücrelerin bölütlenmesinin ve takip edilmesinin nasıl olacağı ve bu problem için zorlayıcı faktörler hakkında bilgi verilecektir. Sonraki bölümlerde sırasıyla bu konuda literatürde yer alan araştırmalar, bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntem, elde edilen deneysel bulgular ve sonuç ve tartışma bölümleri yer alacaktır.

1.1 Tezin Amacı

Bu tezin amacı farklı türden mikroskop görüntü dizinlerindeki hareketli hücreleri bölütlemeye ve dizin boyunca takip etmeye çalışmaktır. Bir ya da birkaç veri setine odaklanıp o sete özgü yöntem geliştirmek yerine farklı veri setlerinde çalışabilecek genelleyici bir çözüm oluşturmaktır. Bunun için öğrenme tabanlı yöntemler kullanılarak farklı veri setlerine adapte olabilmesi hedeflenmiştir. Tüm bunları gerçekleştirirken parametre sayısını makul seviyede tutarak farklı alanlarda çalışan bilim insanları ve araştırmacılar tarafından kullanılabilir olmak da önemli amaçlardan biridir. Hücre üzerinde araştırma yapan kişilere uygun çalışma ortamı sağlayarak onların araştırma ve geliştirme sürecini kısaltmasına ve kolaylaştırmasına imkan sağlanması hedeflenmektedir. Bu sayede, göz ile ayırt etmenin bile zor olduğu durumlarda hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi sağlanacaktır. Hücrelerin zamanla nasıl çoğaldığının takibi gösterilecektir. Böylelikle araştırmacıların doku gelişimi, hastalıklar gibi konularda hücrelerin hareketlerini anlamak, çoğalmalarını takip etmek ve şekil değişikliklerini incelenmek daha kolay şekilde mümkün olacaktır.

1.2 Hücrelerin Bölütlemesi

Hücrelerin bölütlemesi bir görüntüdeki her bir farklı hücrenin belirlenmesi işlemidir. Sadece hücreler ve zeminin ayrılması değil farklı hücrelerin de ayrılması beklenmektedir. Şekil 1.1'de görüldüğü gibi her farklı hücreye farklı bir etiket verilmelidir. Her hücreye verilen etiketin dizin boyunca aynı kalması beklenmektedir. Bu hücre takibi için gereklidir.



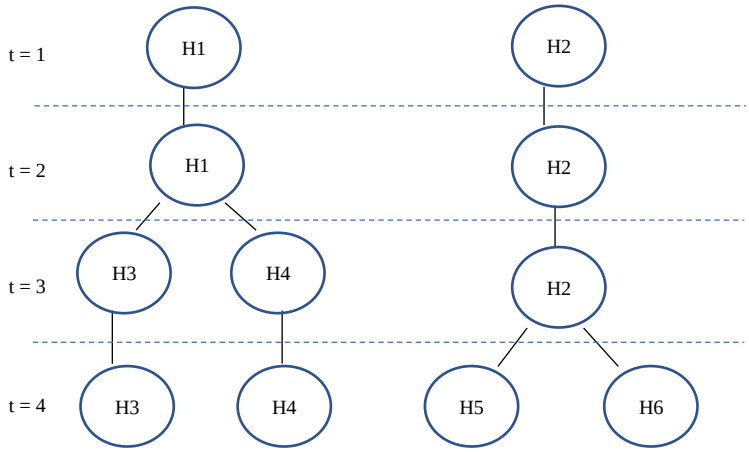
Şekil 1.1 Hücre bölütlemesi (Yukarıdan aşağıya) Orijinal görüntü, bölütlenmiş görüntü, etiketlenmiş görüntü

1.3 Hücrelerin Takibi

Hücrelerin takibi bir görüntü dizini veya videoda yer alan hücrelerin hayat ağacını çıkarmaktır. Mikroskop görüş alanına giren hücre aşağıdaki farklı durumlarda bulunabilir.

- Tüm dizin boyunca büyüyerek veya şekil değiştirerek bulunabilir.
- Parçasının bir kısmını kaybederek bulunabilir.
- Mikroskop görüş açısından çıkıp kaybolabilir.
- Hücre bölünmesi gerçekleştirip yeni hücreler oluşturabilir.
- Hücre ölümü gerçekleştirip kaybolabilir.

Şekil 1.1'de gösterilen örnek hücre bölütlemesine karşılık gelen hücre takibi Şekil 1.2'de gösterilmektedir. Bu şekilde aynı hücrenin etiketi korunmuş ve hücre bölünmeleri gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Hücrelerin (Şekil 1.1'deki) zamanla takibi

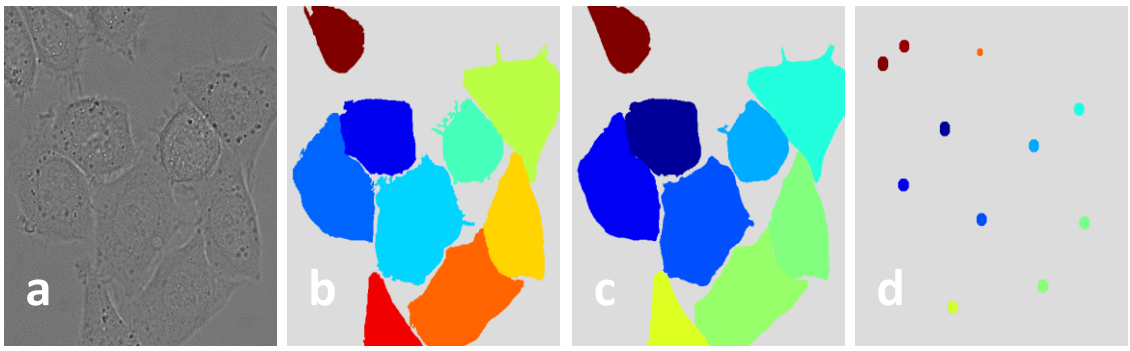
1.4 Veri Seti

Medikal görüntüleme alanında veri seti hazırlamak oldukça zahmetli bir işlemdir. Bu görüntüleri elde etmek için erişimi kolay olmayan tıbbı teknolojik cihazlar kullanılır. Ayrıca, elde edilen bu görüntülerin derin öğrenme çalışmalarında kullanması için alanında uzman kişiler tarafından etiketlenmesi gerekmektedir. Bu çalışma kapsamında, sonraki bölümde detaylı olarak anlatılacak Cell Tracking Challange (CTC) yarışması veri setleri kullanılmıştır. Veri setleri farklı türden mikroskoplarla veya bilgisayar simülasyonları ile elde edilmiş 18 farklı türden 50'den fazla zaman atlamalı hızlandırılmış görüntü dizininden oluşmaktadır. Ayrıca görüntü dizininin bir kısmı uzmanlar tarafından manuel olarak bölütlenmiştir. Bu veri setleri, eğitim ve yarışma olarak iki gruba ayrılmıştır. Canlı hücre görüntülerini almak için faz kontrast mikroskobu (PhC), diferansiyel girişim kontrast mikroskobu (DIC) ve floresan mikroskobu gibi farklı türden mikroskoplar kullanılmıştır. Videolar çok çeşitli hücre türlerini ve kalitesini kapsamaktadır. Hem iki boyutlu hem üç boyutlu veri setleri bulunmaktadır. Her bir veri seti için iki farklı türde etiket mevcuttur. Tüm farklı etiket grupları için detaylar Çizelge 1.1'de ve örnekler Şekil 1.3'de gösterilmektedir.

Birinci tür etiketler, uzman kişiler tarafından oluşturulmuş ve altın etiket olarak adlandırılmıştır. Bu etiket grubu da kendi içinde ikiye ayrılmıştır. İlki az sayıda görüntüde hücrelerin büyük kısmını gerçeğe yakın şekilde bölütlemeyi amaçlamıştır (Şekil 1.3 b). Hem alan bilgisi hem de çok fazla vakit gerektireceğinden bütün hücreleri bölütlemek

mümkün olmamıştır. Diğeri ise her bir hücrenin ayrı etiketlendiği takip görüntü dizinidir (Şekil 1.3.d). Bu etiketler tam bölütleme yapmamıştır ancak tüm görüntülerde, bazı istisnalar ile, tüm hücreler etiketlenmiştir.

İkinci tür ise gümüş etiket olarak adlandırılan yüksek başarı sağlamış yazılımlarla bilgisayar ortamında oluşturulmuştur (Şekil 1.3 c). Bu etiketler daha fazla görüntüde ve hücrede sağlanmıştır. Ancak uzmanların etiketleri kadar gerçeğe yakın değildir.



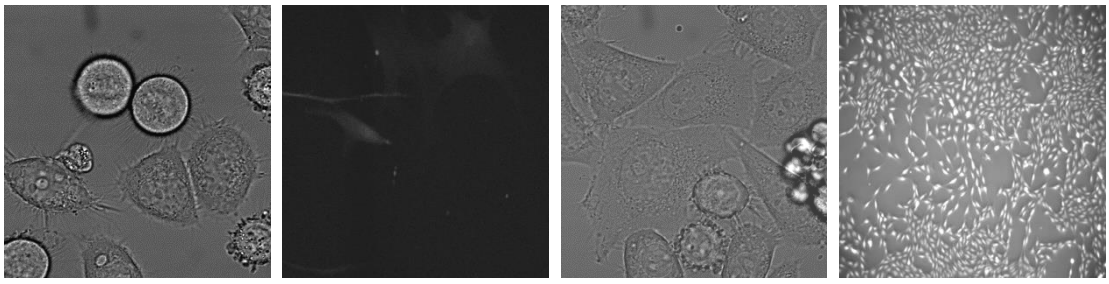
Şekil 1.3 Farklı türdeki etiketler (a) Orjinal görüntü (b) altın bölütleme (c) gümüş bölütleme (d) altın takip

Çizelge 1.1 Etiket detayları

Veri Seti Grubu	**Detay**
Altın bölütleme	Uzmanlar tarafından, gerçeğe oldukça yakın, çok az sayıda örnekte, çok az hücrede
Gümüş bölütleme	Bilgisayar programları ile, gerçeğe yakın, tüm örneklerde, çoğu hücrede
Altın takip	Uzmanlar tarafından, sadece hücre konumları, tüm örneklerde, tüm hücrelerde

1.5 Zorlayıcı faktörler

Bu problem için birçok zorlayıcı faktör vardır. Bunların başlıcaları görüntü setindeki düşük sinyal gürültü oranı, düşük kontrast, yüksek hücre yoğunluğu, düşük çözünürlük, hücre içi heterojenliği ve düzensiz hücre şekilleridir. Yüksek yoğunluktaki çözümü daha karmaşık hale getirmektedir. Bu sorun bir bölgedeki bitişik hücrelerin fark edilememesine yol açmaktadır. Hücre içindeki çekirdek gibi diğer organellerin kontrastının fazla olduğu durumlarda önemli bir zorluktur. Özellikle farklı büyüklükteki hücrelerin yer aldığı görüntülerde bu hücre içi heterojenlik fazladan hücre algılanmasına sebep olmaktadır. Bu zorluklar ile ilgili örnekler Şekil 1.4'de gösterilmektedir. Bu zorluklarla başa çıkmak problemin çözümü için çok gereklidir. Gürültü azaltma ve kontrast artırma algoritmalarının ön işlem olarak uygulanması bu zorlayıcı problemlerin çözümüne yardımcı olarak bölütleme başarısını artırmıştır (Ulman vd. 2017).



Şekil 1.4 Zorluklar ile ilgili örnekler (Soldan sağa) Düzensiz hücre şekilleri, düşük hücre zemin kontrast farkı, hücre içi heterojenlik, yüksek hücre yoğunluğu

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Görüntü bölütleme, nesneleri görüntü üzerinde ayırma işlemidir. Pikselleri anlamsal olarak gruplandırarak, görüntüyü analiz etmek için kullanılmaktadır. Anlamsal bölütleme (semantic segmentation) ve örnek bölütleme (instance segmentation) olarak iki farklı türdedir. Anlamsal bölütleme pikselleri nesnelerin sınıflarına göre gruplandırılır. Örnek bölütleme ise her bir nesneyi sınıfından bağımsız olarak ayrı şekilde gruplandırır. Bölütleme işleme için kenar, bölge ve öğrenme tabanlı yöntemler bulunmaktadır (Song vd. 2017).

Kenar tabanlı yöntemler, piksel değerlerindeki ani değişimlere göre belirlenen kenarlar ile bölütleme yapmaktadır. Kenarlar iki bölge arasındaki sınırlardır. Sınırların belirlenmesi farklı nesnelerin ayrılmasını sağlayacaktır (Kaur vd. 2014). Bölütleme için çoğunlukla kullanılan kenar algılama yöntemleri Sobel, Canny ve Robert algoritmalarıdır (Senthilkumaran vd. 2009, Zaitoumn vd. 2015).

Bölge tabanlı yöntemler, görüntüyü benzer karakteristikteki bölgelere ayırır. Yinelemeli olarak bölgelere ayırma ve benzer komşu bölgeleri birleştirme işlemleri uygulanır. İşlemler sabit bölgeler elde edilinceye kadar devam eder (Singh vd. 2010). Bu işlemler ile aynı sınıftaki bölgeler ayrılmış olur. Eşikleme ile bölütleme de bölgesel tabanlı yöntemlerdendir (Song vd. 2017). Eşikleme teknikleri global ve lokal olarak iki kategoridedir. Arka plan ile ön plandaki pikseller arası fark daha fazla olan durumlarda tek bir eşik değeri kullanılabileceği için global eşikleme kullanılmaktadır. Lokal eşiklemede ise eşik değeri bölgesel olarak hesaplanır ve birden fazla sayıda belirlenir (Senthilkumaran vd. 2016).

Bölütleme için kullanılan başlıca öğrenme tabanlı mimariler; kodlayıcı-çözücü modeller (encoder-decoder), bölgesel konvolüsyonel ağlar (R-CNN), kısa-uzun dönem hafıza (LSTM), tekrarlayan sinir ağları (RNN), üretken çekişmeli ağlar (GAN) ve konvolüsyönel sinir ağlarıdır (Minaee vd. 2020). Noh vd. (2015) anlamsal bölütleme için konvolüsyonel ve ters konvolüsyonel katmanlardan oluşan kodlayıcı-çözücü model tabanlı yöntem geliştirmişlerdir. Kodlayıcı kısmında VGG-16 modelini (Simonyan vd.

2014) baz almışlardır. Çözücü kısımda ise piksellerin anlamsal sınıfını tahmin etmişlerdir. Long vd. (2015) bölütleme için tam konvolüsyonel ağları (FCN) geliştirmişlerdir. Bu modelin girdi ve çıktı çözünürlükleri eşittir. Sınıflandırma skoru yerine bölütleme haritasını çıkarmaktadır. Visin vd. (2016) yinelemeli sinir ağı tabanlı ReSeg modelini geliştirmişlerdir. ReSeg modeli, önceden eğitilmiş VGG-16 konvolüsyonel ağ ile çıkarılan lokal öz nitelikleri kullanarak bölütleme yapmaya çalışır. Bölgesel konvolüsyonel ağlar, nesne algılama için kullanılan ağlardandır. He vd. (2017) bölgesel konvolüsyonel ağların bir varyasyonu olan Mask R-CNN modelini geliştirmişlerdir. Bu model ile bölütleme türünde COCO veri setinde (Lin vd. 2014) oldukça yüksek başarı elde etmişlerdir.

Mikroskop görüntülerinden hücre ve hücre çekirdeği bölütlemesi ve manyetik rezonans görüntülerinden (MRI) beyin tümörü bölütlemesi, üzerinde çalışılan medikal görüntüleme problemlerindendir (Brebisson 2015, Dawoud 2020). Medikal görüntü problemlerinde genellikle derin öğrenme yöntemleri tercih edilmiştir (Litjens vd. 2017). Derin öğrenme ile birleştirilen görüntü işleme yöntemleri oldukça başarılı sonuçlar elde etmiştir. Derin öğrenme kullanan yöntemler içinde konvolüsyonel sinir ağlarını kullanan yaklaşımınlar oldukça fazladır (Ronneberger vd. 2015, Chen vd. 2017, Kervadec vd. 2019, Chen vd. 2019). Bu yaklaşımlar içinde ise en bilinenlerinde biri U-Net mimarisidir (Ronneberger vd. 2015). Farklı kişiler tarafından bu mimari ve çeşitli varyasyonları oldukça fazla kullanılmıştır. Düşük çözünürlükte olsa dahi farklı türden medikal görüntülerin bölütlemesinde oldukça iyi sonuçlar vermektedir. Bu mimarinin bu kadar çok tercih edilmesinin bir başka nedeni ise, az sayıda veri içeren veri setlerinde de iyi sonuçlar çıkarabilmesidir. U-Net mimarisi diğer medikal bölütleme problemlerinde kullanıldığı gibi hücre bölütlemesi çalışmalarında da oldukça fazla kullanılmıştır. Bu çalışmalarda U-Net tabanlı bir ağ ve görüntü işleme algoritmalarından oluşan çözümlerle başarılı bölütlemeler yapmışlardır.

U-Net mimarisi ile medikal görüntülerde başarılı sonuçlar elde edilse de, eksik kaldığı noktalar da bulunmaktadır. Bu eksiklerden en önemli ikisi, bağlantı atlama kısmından gerekli bilginin gelmemesi ve çözünürlük düşerken bilgi kaybedilmesidir (Zhou vd. 2020). Bu yüzden, U-Net mimarisinde çeşitli değişiklikler yapılarak karşılaşılan sorunlar

çözülmeye çalışılmıştır (Seo vd. 2020 ve Zhou vd. 2020). Bu çalışmalarda, çözüm olarak bağlantı atlama kısımlarına yönelerek, kodlayıcı ağdan çözücü ağa iletilen öznitelikler öğrenilen filtrelerden geçirilmektedir.

2.1 Hücre Bölütleme Çalışmaları

Hücrelerin bölütlenmesi ve takibi için bir yandan bilgisayar bilimcileri teknik çalışmalar yaparken, diğer yandan biyolojistler bu yöntemleri çalışmalarında kullanıp hem hız kazanmak hem de fark edemedikleri sonuçları görmek istediklerinden, 2013 yılından itibaren IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) tarafından Cell Tracking Challenge (CTC) adında bir yarışma organize edilmiştir. Bu yarışma, bu alana yoğunlaşmak isteyenleri ayrıca motive etmiştir. Şimdiye kadar beş kez düzenlenen yarışmanın altıncısı 2021 yılında yapılacaktır. Yarışma aynı zamanda biyolojistlere ve bilgisayar bilimcilere ortak çalışma alanı sağlamıştır. Hedefleri belirleyerek sonuçların genel olarak farklı ortamlar için kullanılabilir olması amaçlanmıştır. Bu hedefler; kısaca, tüm hücreleri tespit etmek, bölümlere ayırmak ve etiketlemektir. Ayrıca hücre zarlarının parçalanması nedeniyle birkaç parçaya ayrılan hücreler aynı etiketi tutmalı yeni hücre gibi görülmemelidir. Olağan hücre ölümlerini anlayabilmelidir. Yarışma için farklı teknolojilerdeki mikroskoplardan elde edilmiş 18 veri seti oluşturulmuştur. Alanında uzman kişilerce buradaki veri setlerinden bazı görüntüler etiketlenerek katılımcıların kullanması sağlanmıştır.

Hücre bölütlemesi, bölütleme türleri içerisinden örnek bölütleme türündedir. Her bir hücre hem zeminden hem de diğer hücrelerden ayrı olacak şekilde bölütlenmelidir. Hücre bölütlemesi için görüntü işleme algoritmaları ve derin öğrenme tabanlı çözümler oldukça fazla kullanılmıştır.

Hücre bölütlemesi bölümüne katkı koyan çalışmalarda; gürültü azaltma, kontrast artırma, ışıklandırma düzeltmesi, yoğunluk normalizasyonu ve histogram eşitlemesi gibi yöntemler ön işlem olarak kullanılmaktadır. Bu işlemlerin yöntemlerin başarısını artırdığı açıkça görülmüştür (Ulman vd. 2017).

Görüntü işleme algoritmaları ile hücre bölütlemesi yapan birçok yöntem bulunmaktadır (Meijering, 2012). Yaygın olarak kullanılan algoritmalar; yoğunluk tabanlı eşikleme (intensity based thresholding), özellik tespiti (feature detection) ve bölge birikimidir (region accumulation). Bu algoritmalar öğrenme tabanlı değillerdir. Ayrıca, otomatik olarak hücre bölütlemeye çalışsalar da başlangıçta oldukça fazla kullanıcı müdahalesi gerektirirler. Yoğunluk tabanlı eşikleme, hücre ve zemin arasındaki kontrast farkından yararlanarak bölütleme işlemi yapmaya odaklanmıştır. Belirlenen lokal ve global eşik değerlerini kullanarak, hücre ile zemin ayrımı yapmaktadır (Wu, 2008). Özellik tespiti algoritması, hücre kenarlarını ve parçalarını tespit etmek için görüntüyü Gaussion ve Laplacian gibi farklı filtrelerden geçirmektedir (Meijering, 2012). Bu filtreler ile hücreyi zeminden ayıracak kısımları tespit ederek bölütleme yapılması amaçlanmıştır. Bölge birikimi algoritması, verilen başlangıç noktalarından başlayarak, tekrarlamalı döngüler ile bağlı olan bölgeleri bulmayı amaçlar (Wu, 2008). Bu yöntem ile her bir ayrı hücreyi bölütlemeye çalışır. Besbes (2004) ve Eschweiler vd. (2018) bölge tabanlı bir yöntem olan watershed algoritiması ile hücre bölütlemesi yapmışlardır.

Son dönemde yürütülen çalışmaların büyük bir bölümü derin öğrenme tabanlı yaklaşımları içermektedir. Konvolüsyonel sinir ağları ve kodlayıcı-çözücü tabanlı birçok yöntem geliştirilmiştir. Diğer bölütleme türlerinde olduğu gibi konvolüsyonel ağları ve U-Net mimarisini kullanan oldukça fazla yöntem vardır. Schmidt vd. (2018), U-Net mimarisini kullanarak hücre çekirdeklerinin yerini ve her pikselin hangi hücreye ait olabileceğinin olasılığını tahmin etmeye çalışmıştır.

Lux ve Matula (2019), işaretçi kontrollü watershed (marker-controlleed watershed) yöntemini geliştirmiştir. Paralel olarak çalışan iki U-Net tabanlı konvolüsyonel sinir ağı eğitmişlerdir. Bu ağlar ile hücre işaretleri ve hücre sınırları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu ağların çıktıları, işaret ve hücre bölgeleri olarak watershed algoritmasında kullanılmıştır. Watershed algoritmasıyla tam bölütleme yapılmaya çalışılmıştır. Kayıp fonksiyonu olarak ağırlıklı ortalama kare fonksiyonu kullanılmıştır.

Pena vd. (2020), eksik etiket ve dengesiz veri seti olduğu için kayıp fonksiyonuna yoğunlaşmışlardır. Çalışmalarında, U-Net eğitiminde çokça kullanılan ağırlıklı çapraz entropi, dice katsayısı, Youden'in J istatistiğini(Jouden 1950) karşılaştırmıştır. J

istatistiği ile çapraz entropiyi birleştirerek daha iyi sonuçlar elde etmiştir. Ayrıca her bir görüntüyü zemin, hücre, dokunan pikseller ve boşluk pikselleri olarak dört sınıfa ayrılmışlardır. Bu sayede, bitişik hücreleri ayırt etmede ağın gücü artırılmıştır. Bu yöntem ile DIC-C2DH-HeLa veri setinde %97,9 bölütleme oranıyla en yüksek başarıyı sağlamıştır.

2.2 Hücre Takip Çalışmaları

Hücrelerin takibi için izlenen yöntemler genel olarak ikiye ayrılabilir. Bunlar algılamayla takip ve sınır evrimi ile takiptir. Her iki yöntem de bölütlenmiş hücreler üzerinde çalışmaktadır. İlk yaklaşımda ana fikir, ilk olarak tüm görüntülerdeki hücreleri tespit etmek ve ardından algılanan hücreleri olasılıksal olarak ilişkilendirmektir. İkinci gruptaki yaklaşımların prensibi, ilk karede hücrelerin bulunmasını ve önceki kareden elde edilen sonucu göz önüne alarak diğer tüm görüntüler boyunca hücrelerin konumlarını, şekillerini ve yönlerini güncellemeyi temel alır. Yapılan çalışmalar detaylı olarak incelendiğinde algılama ile takip metodu ile hücrelerin takibi konusunda daha başarılı sonuçlar elde edildiği anlaşılmıştır (Ulman vd. 2017). Aynı zamanda yapılacak ön işlemler performansı önemli derecede etkilemiştir.

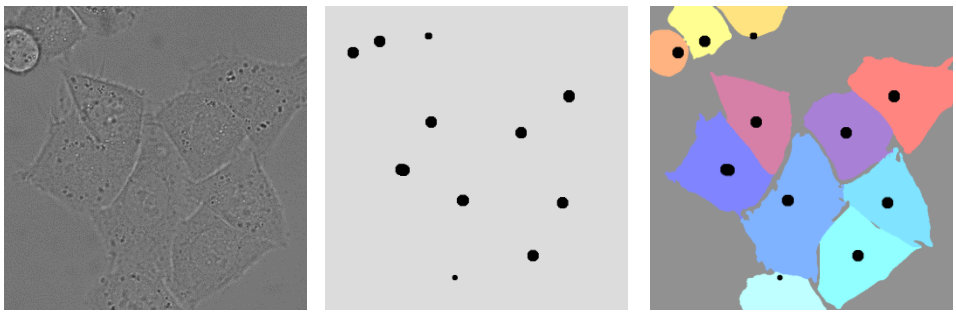
Lugagne vd. (2017), U-Net mimarisindeki konvolüsyonel ağ ile ardışık görüntüler arasındaki hücre bölünmelerini tespit etmeye çalışmışlardır. Hernandes vd. (2018), algılama ile takip yöntemini izleyerek hücre takibi yapmışlardır. Önce bölütlenmiş hücreleri ikili sisteme çevirmişlerdir. Sonraki adımda, ardışık görüntüler arasında hücre işaretlerini bağlamışlardır. Bu bağlama işlemini uygularken Viterbi algoritmasını (Viterbi, 2009) kullanmışlardır. Viterbi algoritması, başlangıç ile sonuç arasındaki en olası yolu bulmak için kullanılmaktadır. Moen vd. (2019), ardışık görüntüler arasında derin öğrenme ile nesne takibi yöntemini uygulamışlardır. Her hücre zaman atlamalı görüntü dizini boyunca ayrı ayrı takip edilmeye çalışılmıştır.

2.3 Başarının Ölçütleri

Farklı yöntemlerin başarılarını karşılaştırmak için üç farklı parametre belirlenmiştir. Bunlar tespit, takip ve bölütleme doğruluk oranlarıdır. Bu parametreleri hesaplamak için,

yöntemlerin sonuçları ile uzmanlar tarafından manuel olarak oluşturulmuş gerçek zemin karşılaştırılmıştır. Her bir görüntü ile altın etiketli veri seti karşılaştırılmaktadır.

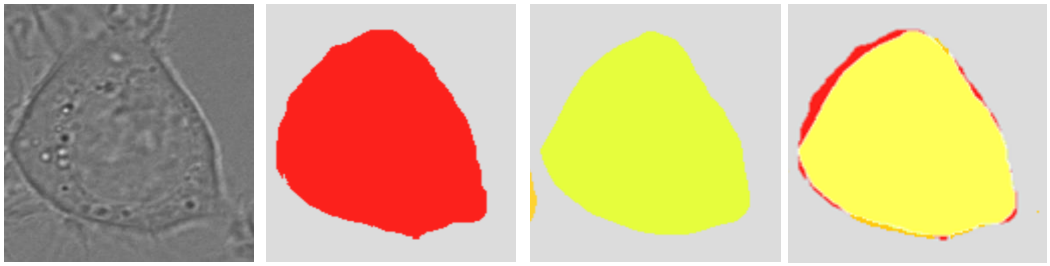
Tespit oranını hesaplamak için, görüntüde yer alan her farklı hücrenin bulunması beklenmektedir. Ancak, kenarlarda yer alan ve bir kısmı görüntü içinde yer almayan hücrelerin tespit edilmesi beklenmemektedir. Tespit skoru hesaplanırken altın etiketli veri setinden takip grubundaki görüntüler kullanılır. Bu veriler etiketlenirken, hücreler küçük noktalar halinde işaretlenmiştir. Bir hücrenin tespit edilmesi için hücre için işaretlenen bölgenin en az %50'sinin bölütlenen bölgede olması ve başka hücre işaretini bulundurmaması gerekmektedir (Matula vd. 2015). Şekil 2.1'de doğru bölütlenmiş ve tespit skoru tam olan örnek gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Orijinal görüntü, tespit için kullanılan etiket ve örnek tam bölütlemiş çıktısı

Bölütleme doğruluğunu hesaplamak için tahmin edilen sonuç ile altın bölütleme etiket grubundaki karşılığının Jaccard benzerlik indeksi bulunur (2.1). Bu indeks, iki farklı bölgenin kesişimlerinin birleşimlerine oranıdır. Doğru zemin ile tahmin sonucunun karşılaştırılmasının bir örneği Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Bu örnekte en sağdaki sonuç ile doğru zemin karşılaştırmasında kırmızı olarak kalan bölgeler eksik bölütlenmeyi, hücrenin alt kısmındaki turuncu ile gösterilen bölgeler fazladan bölütlemeye katılmış pikselleri ifade eder. Bu iki bölgenin büyüklüğü bölütlenme oranın düşmesine neden olur. Bu örnekte Jaccard benzerlik indeksine göre bölütleme başarısı 0 ile 1 arasından 0,91'dir.

$$J(A,B) = \frac{A \cap B}{A \cup B} \qquad (2.1)$$



Şekil 2.2 (Soldan sağa) Orijinal görüntü, doğru zemin, tahmin sonucu, sonuç ile doğru zemin karşılaştırması

Takip oranı için ise görüntü dizini boyunca hücrelerin tahmin edilen hayat ağacı ile etiketli hayat ağacının karşılaştırılması yapılır. Her iki ağacın düğüm noktaları karşılaştırılır. Aynı olan düğümler için ceza olmaz. Başarıyı düşüren durumlar ve bunların hesaplama sırasındaki ağırlıkları Çizelge 2.1'de gösterilmektedir. Bu ağılıklar her yanlış durumda skoru düşüren çarpanlardır. Çarpan ne kadar yüksekse, her yanlışta skor o kadar çok düşer.

Çizelge 2.1 Hücre takibinde başarı oranını düşüren durumlar ve ağırlıkları

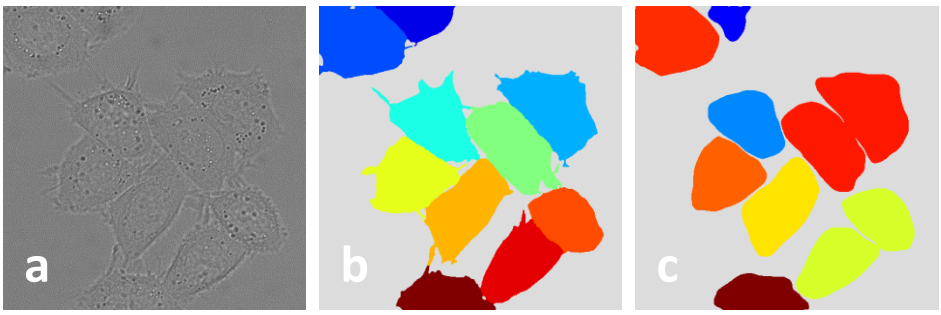
Başarıyı düşüren durumlar	**Ağırlığı**
Eksik tespit edilen hücreler	10
Fazla tespit edilen hücreler	1
Ayrılamayan hücreler	5

Algoritmaların teknik karşılaştırmalarında bu değerler ile hesaplanan skorlar kullanılmıştır. Biyolojik olarak kullanılabilirliği ise parametre sayıların azlığı ve kullanıcı müdahalesi gerekliliği ile ölçülebilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Hücrelerin bölütlenmesi ve takip edilmesi ile ilgili tez kapsamında yürütülen çalışmalar bu bölümde incelenecektir. Çalışmamız kapsamında, derin öğrenme yöntemleri ile görüntü işleme algoritmaları birlikte kullanılmıştır. Veri seti uzmanlar tarafından etiketmiş olmasına rağmen eksiklikleri mevcuttur. Bu nedenle önce veri setinin üzerinden geçilmiştir ve eksik etiketler manuel olarak tamamlanmıştır (Şekil 3.4). Sonra, literatürde var olan çalışmalar ve onların eksiklikleri göz önüne alınarak çok sayıda deney yapılmıştır. Bu çalışmalar ve deneyler sonucunda geliştirilen yöntem ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

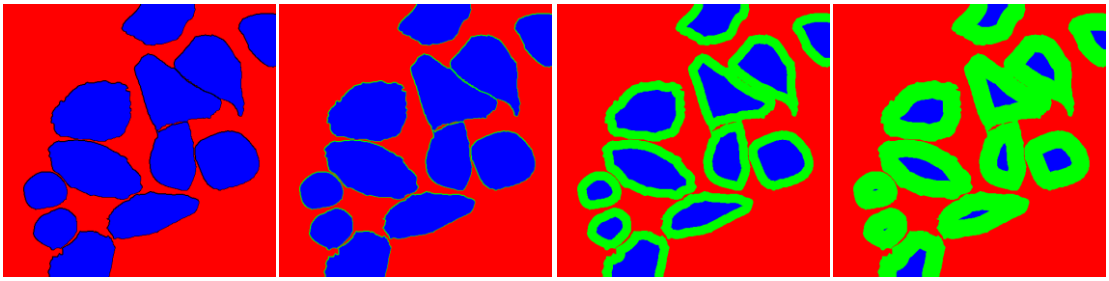
Literatürdeki diğer çalışmalardan yola çıkılarak konvolüsyonel sinir ağları ve özellikle U-Net mimarisine yoğunlaşılmıştır. Bu kapsamda, U-Net mimarisinin eksiklikleri de göz önüne alınarak farklı varyasyon ve kombinasyonları araştırılmıştır. Önce kullanılan modelin sınıf sayısı iki olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu sınıflar hücre ve zemindir. Hücre ve zemin sınıflarının ayrılmasında oldukça iyi olan modelimiz, farklı hücrelerin ayrılmasında zorlanmıştır. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi birbirine çok yakın hücreler ayrılamamıştır.



Şekil 3.1 İki sınıflı model denemesi (a) Orijinal görüntü (b) Gerçek zemin (c) Model sonucu

Bu yöndeki deneylerin istenilen sonuçları vermemesi üzerine etiketlere yeni bir sınıf eklenmiştir. Bu sınıfın ön-modelde hücre sınırlarını temsil etmesi beklenmektedir. Bu sınıfı oluşturmak için hücre olarak etiketlenen her bir bölge sabit piksel sayısında daraltılmıştır. Daraltılan bölgeler hücre sınırları olarak işaretlenmiştir. Daraltılırken

kullanılan sabit sayının uygun değerini bulmak için farklı deneyler yapılmıştır (Şekil 3.2). Bu sabit değerin belli seviyeye kadar artırılması başarıyı artırmıştır. Ancak, yüksek değerlerde küçük hücrelerde hücre olarak etiketlenen piksellerin sayısını azalttığı için başarıyı düşürmüştür (
Çizelge 3.1). Şekil 3.2'de gösterildiği gibi yüksek piksel genişliğinde hücre olarak ayrılan bölge çok küçülmüştür.



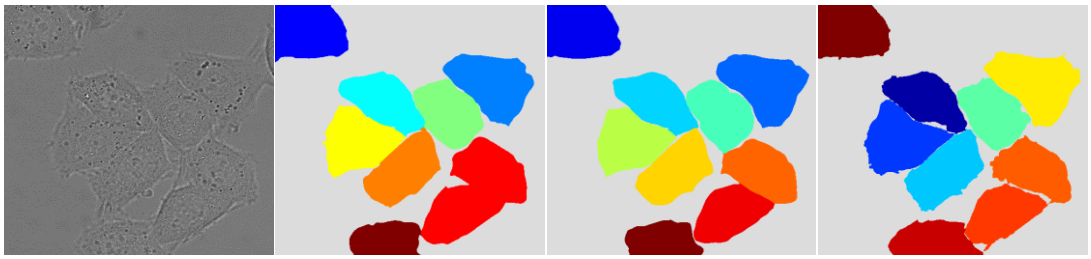
Şekil 3.2 Farklı hücre sınırları. Kırmızı zemin, mavi hücre, yeşil hücre sınırı (Soldan sağa) Hücre sınırı yok ve sırasıyla 2,32,64 piksel genişliğinde hücre sınırı olarak düzenlenmiş hali

Çizelge 3.1 DIC-C2DH-HeLa veri setinde farklı hücre sınırı kalınlığında tespit skorları

Seçilen hücre sınırı piksel genişliği	**Tespit Skoru**
Hücre sınırı yok	0.811
2 piksel	0.880
32 piksel	0.917
64 piksel	0.892

Tek bir sinir ağı ile yapılan deneylerde bitişik hücrelerin ayrılması oldukça zor olmuştur (Şekil 3.3). Bu ağa bitişik hücrelerin olduğu bölgede kaç farklı hücre olduğu bilgisinin verilmesinin bu hücreleri ayırmada etkili olacağı düşünülmüştür. Bu yüzden yeni bir konvolüsyonel sinir ağı görüntüdeki farklı hücreleri bulması amacıyla eğitilmiştir. Bu ağın hücrenin tüm sınırlarını bulmak amacı olmayacaktır. Sadece hücreleri bulması yeterli olacaktır. Buradan gelecek bilgiyle bitişik hücrelerin olduğu bölgede hücre sınırları daha rahat ayrılabilecektir.

Konvolüsyonel sinir ağından çıkan sonuca watershed bölütleme algoritması uygulanarak tam bölütleme elde edilmiştir.



Şekil 3.3 Tek U-Net ile İki bağlantılı U-Net karşılaştırması (Soldan sağa) Orijinal görüntü, tek U-Net ağı çıktısı, iki ağlı U-Net Çıktısı, gümüş etiket görüntüsü

Yapılan bu çalışmalar neticesinde başarılı bölütlemeler yapan yöntem ortaya çıkarılmıştır. Bölütleme işleminden sonra görüntü dizinindeki hücrelerin takibi için bir algoritma geliştirilmiştir. Bölütleme ve takip için yapılan adımlar aşağıdaki sırayla yapılmıştır.

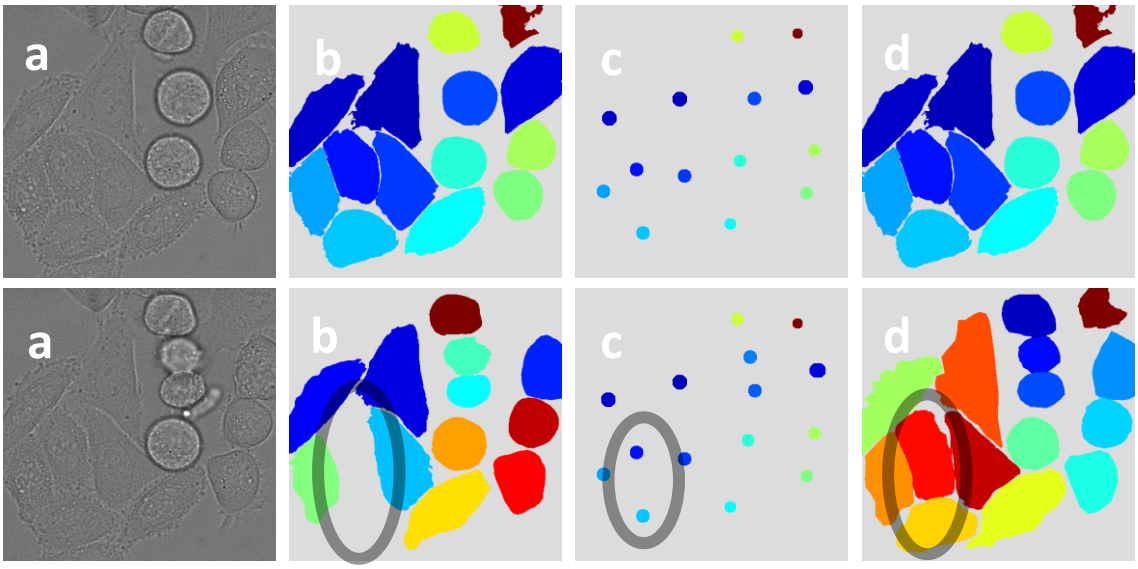
- Veri setindeki eksikliklerin tamamlanması ve çalışmaya uygun hale getirilmesi için üç sınıflı yapıya dönüştürülmesi
- Görüntüye kontrast iyileştirme algoritmasının uygulanması
- Hücre tespit ağının eğitilmesi
- Hücre yakalama ağının eğitilmesi
- Watershed algoritmasının uygulanması
- Her hücrenin ayrı ayrı etiketlenmesi
- Etiketlenen hücrelerin görüntü dizini boyunca takibinin yapılması

Alt bölümlerde problemin çözümü için yapılan bu adımlar ve önerilen yöntem detaylı olarak anlatılacaktır.

3.1 Veri Seti Düzeltme

Veri setleri uzman kişiler tarafından etiketlenmeye çalışılsa da, tam etiketlenme sağlanamamıştır. Örneğin, bazı örneklerde, ardışık görüntülerde aynı hücre bir görüntüde etiketlenirken diğerinde etiketlenmemiştir. Bu durum ile ilgili iki örnek Şekil 3.4'te gösterilmektedir. Bu durum birbirine benzer iki görüntüde farklı etiketler olduğu için ağın eğitiminde belirsizliğe yol açabilmektedir. Veri setinin orijinal eksik etiketlenmiş hali ve düzeltmiş hali ile eğitilen deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde düzeltilmiş haliyle eğitilen

ağın daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden çalışılan veri seti üzerindeki tüm görüntüler elden geçirilerek eksik olan hücre etiketleri tamamlanmıştır. Eksik veri seti tamamlanırken hücre şekillerini önemsemeden sadece konumunu belirten altın grubundan takip için sağlanan set kullanılmıştır. Bu veri seti görüntü üzerindeki tüm hücreleri işaretlediği için hangi bölgede hücrenin eksik olduğu bilenebilmektedir.



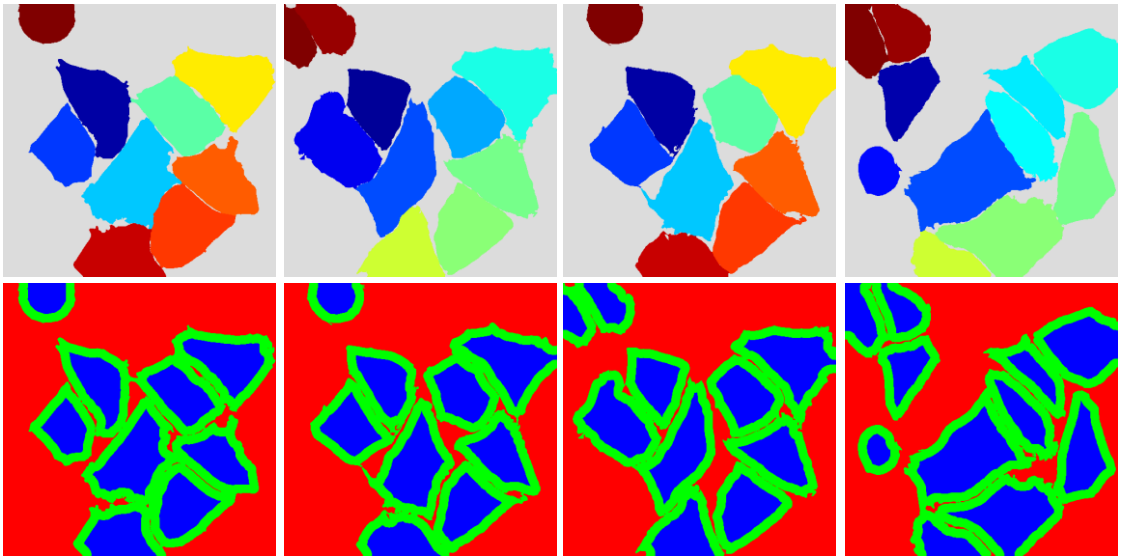
Şekil 3.4 Ardışık iki görüntüdeki etiketleme eksikliği (a) Orijinal görüntü (b) Gümüş bölütleme seti (c) Altın takip seti (d) Düzeltilmiş veri seti

Şekil 3.4.c'nin alt kısımda yer alan görüntüde belirtilen hücre işaretlerine karşılık Şekil 3.4.b'de aynı bölgede hücre etiketlenmemiştir. Bu ve bunun gibi durumdaki eksik hücre etiketleri manuel olarak tamamlanmıştır.

Etiketlemesi tamamlanan görüntülerde her hücre farklı etikete sahiptir. Ama üç sınıflı yapıya uygun hale getirebilmek için tüm hücrelerin ve hücre sınırlarının aynı etikete sahip olması gerekir. Bu yüzden veri seti üzerindeki eksik hücreler tamamlandıktan sonra, tüm örnekler üç sınıflı hale getirilmiştir. Her sınıfı kodlamak için üç görüntü kanalı kullanılmıştır. Bir piksel hangi sınıf ait ise o kanal 1 değeri, diğer kanallara 0 değeri verilmiştir. Bir piksel ait olduğu sınıfa göre aşağıdaki gibi kodlanmıştır.

- Zemin sınıfına ait ise [1,0,0],
- Hücre sınıfına ait ise [0,1,0],
- Hücre sınırı sınıfına ait ise [0,0,1].

Zemin sınıfı orijinal görüntüdeki zemin ile aynıdır. Hücre ve sınırların olduğu sınıfları bulmak için her bir hücre kenarlarından, deneysel olarak belirlenen uygun piksel sayısı kullanılarak daraltılmıştır. Üç sınıflı hale getirilmiş bazı örnekler Şekil 3.5'te gösterilmektedir.



Şekil 3.5 Etiketlerin üç sınıflı hale getirilmesi (kırmızı) zemin (mavi) hücre (yeşil) hücre sınırı

3.2 Ön İşlemler

Etiketler çalışma için uygun hale getirilirken görüntüler de bir takım ön işlemlerden geçirilerek başarının artırılması sağlanmıştır. Öncelikle daha tutarlı sonuçlar elde etmek ve sinir ağlarında kullanmak için görüntü piksel değerleri 0 ile 1 arasına normalize edilmiştir. Daha sonra zorluk olarak karşılaşılan hücre ile zemin arasındaki kontrast farkını artırmak için görüntülere histogram eşitlemesi işlemi uygulanmıştır. Bu işlemi ile ağın daha kolay öğrenmesi hedeflenmiştir.

Ayrıca veri seti istenilen büyüklükte değildir. Bunun için veri artırma teknikleri uygulanmıştır. Bu da başarıyı oldukça artırmıştır. Kullanılan veri artırma teknikleri çevirme, döndürme, kırpma, yakınlaştırma ve uzaklaştırmadır (Çizelge 3.2). Rastgele değerler ile oluşturulan değerler sayesinde toplam veri seti büyüklüğü 8 katına çıkarılmıştır. Tüm bu işlemler yapılırken orijinal görüntü boyutu olan 512 x 512 piksel

çözünürlüğü korunmuştur. Boyut korumasını yaparken eksik bölgeleri tamamlamak için yansıtma işlemi uygulamıştır.

Çizelge 3.2 Kullanılan veri artırma teknikleri

Veri artırma tekniği	Detay
Döndürme	0 ile 10 derece arasında rasgele değerle
Yakınlaştırma – Uzaklaştırma	-%10 ile %10 arasında rastgele yüzde ile
Çevirme	Yatay ve dikey eksende rastgele olasılıkla
Kırpma	-5 ile 5 derece arasında rasgele açıyla

3.3 Hücrelerin Bölütlemesi İşlemleri

Veri setindeki eksik etiketleri tamamlama ve veri sayısını artırma ön işlemlerinden sonra hücre bölütlenmesi işlemlerine geçilmiştir. Önce zorluk olarak karşılaşılan hücre ile zemin kontrast farkını artırma işlemi uygulanmıştır. Sonra konvolüsyonel sinir ağları ile hücre ve sınırlarını belirlemek için ön tahmin yapılmıştır. Yapılan bu tahmine watershed algoritması uygulanarak bölütleme tamamlanmıştır. Bu bölümde bölütleme için yapılan işlemler ve önerilen yöntem detaylı olarak anlatılmaktadır.

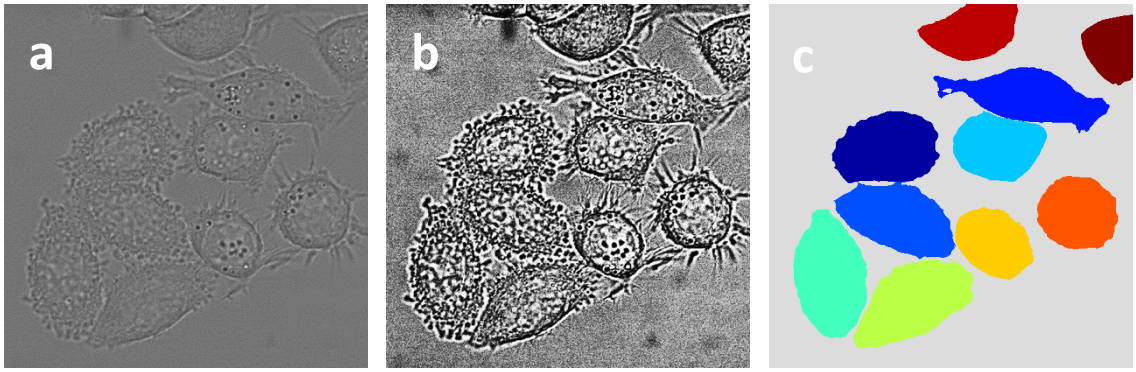
3.3.1 Histogram eşitleme

Veri setinde hücre ve zemin arasındaki kontrast farkı oldukça azdır. Bu durum hücrelerin ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu kontrast farkını artırmak için bir ön işlem olarak histogram eşitlemesi yapılmıştır. Histogram eşitleme görüntünün histogramını kullanarak kontrast ayarını yapmaya çalışan algoritmadır. Aşağıdaki adımlarla işlem yapılır.

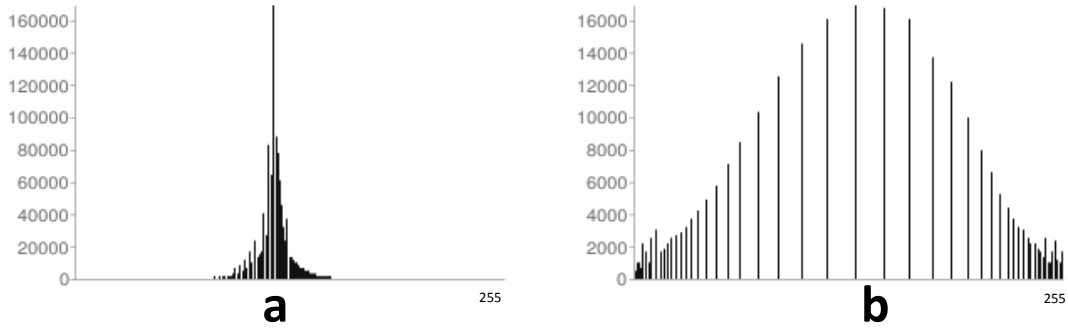
- Görüntünün histogramı hesaplanır.
- Sıfırdan başlayarak her piksel değeri için kümülatif toplamlar bulunur.
- Bulunan değerler toplam piksel sayısına bölünerek normalize edilir.
- Elde edilen normalize değerler maksimum piksel sayısı ile çarpılır.
- Sonuçta her piksel değerinin karşılığı bulunmuş olunur.

Böylelikle histogram üzerinde dar bir alana sıkışan görüntü açılarak hücre ile zemin ayrımı kolaylaşmıştır. Histogram eşitleme yapıldıktan sonraki örnek görüntü Şekil 3.6’

da gösterilmektedir. Bu örnekteki orijinal görüntünün ve histogram eşitlemesi yapıldıktan sonraki halinin histogramları Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.6 Histogram eşitlemesi. (a) Orijinal görüntü (b) histogram eşitlemesi sonucu (c) etiketli görüntü



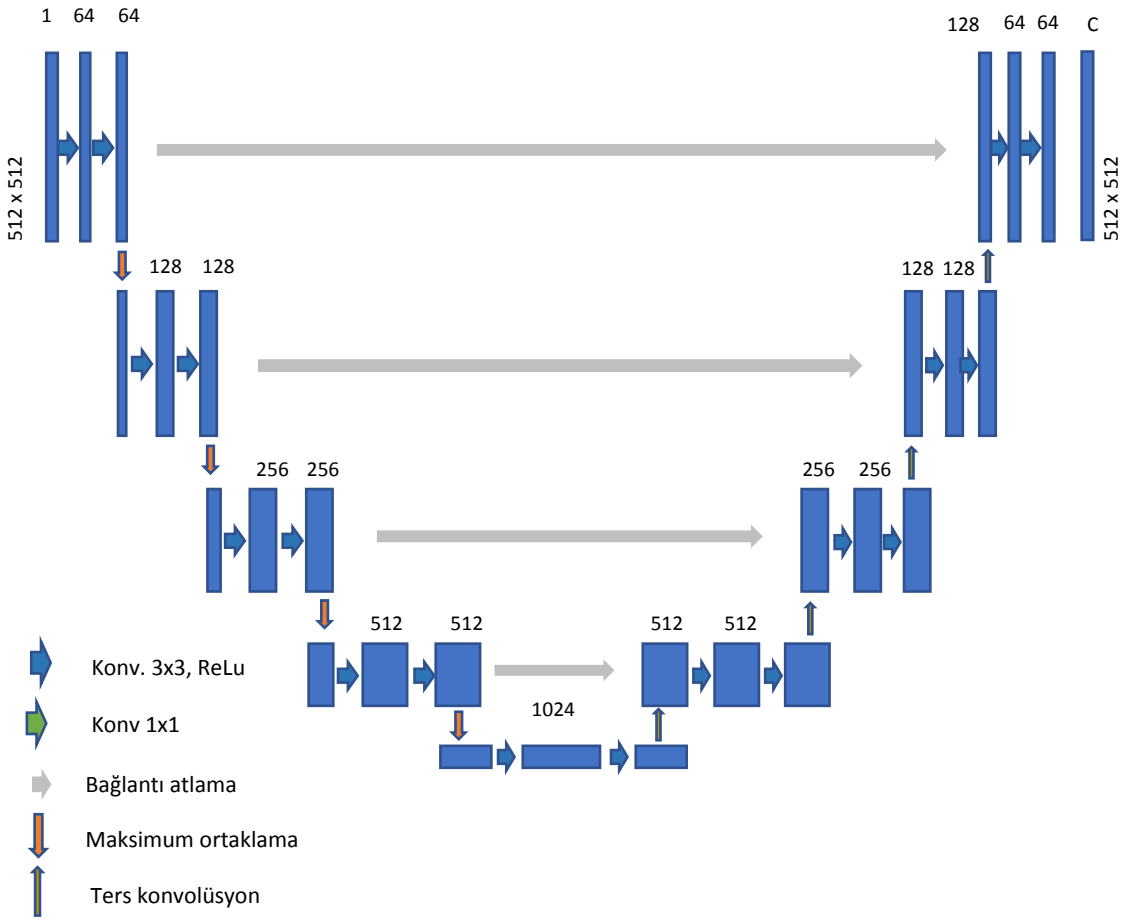
Şekil 3.7 (a) Şekil 3.6(a)'da ki görüntünün histogramı (b) Histogram eşitlemeden sonra elde edilen histogram

3.3.2 U-Net mimarisi

U-Net medikal görüntülerin bölütlenmesi amacıyla oluşturulmuş konvolüsyonel sinir ağı mimarisidir. Medikal görüntülerde bölütleme işlemlerinde oldukça fazla kullanılır. Kodlayıcı ve çözücü olacak şekilde iki kısımdan ve dört seviyeden oluşur. Şeklinden dolayı bu isim verilmiştir. Kodlayıcı kısmı 512x512 piksel çözünürlüğünde görüntü ile başlayıp, görüntüyü sırasıyla 256x256, 128x128, 64x64 ve 32x32 çözünürlüklerine düşürmektedir. Bu çözünürlük düşürme işlemi maksimum ortaklama (max pooling) ile yapılır. Çözücü kısımda ise boyut artırma ve kodlayıcıdan gelen bağlantıyı atlatma işlemleri vardır. Boyut artırma işlemi için genişletme veya ters konvolüsyon işlemi uygulanır. Bağlantı atlatma aynı seviyedeki kodlayıcı ve çözücü arasında veri

birleşimidir. Kodlayıcıdan gelen veri çözücüye eklenir. Ters konvolüsyon işlemi ile, görüntü çözünürlüğü kodlayıcıdakinin ters sırasıyla 32x32'den tekrar 512x512'ye getirilir. Böylelikle girdi ve çıktı çözünürlükleri aynı boyutta tutulmuş olur. İstenen sınıf sayısına göre çıkış katmanı ayarlanır. Her konvolüsyonel katmanda 3x3'lük konvolüsyon işleminden sonra aktivasyon olarak ReLU fonksiyonu (3.1) kullanılmaktadır. U-Net Mimarisinin genel yapısı Şekil 3.8'de gösterilmektedir.

$$y = \max(0, x) \tag{3.1}$$



Şekil 3.8 U-Net Mimarisi

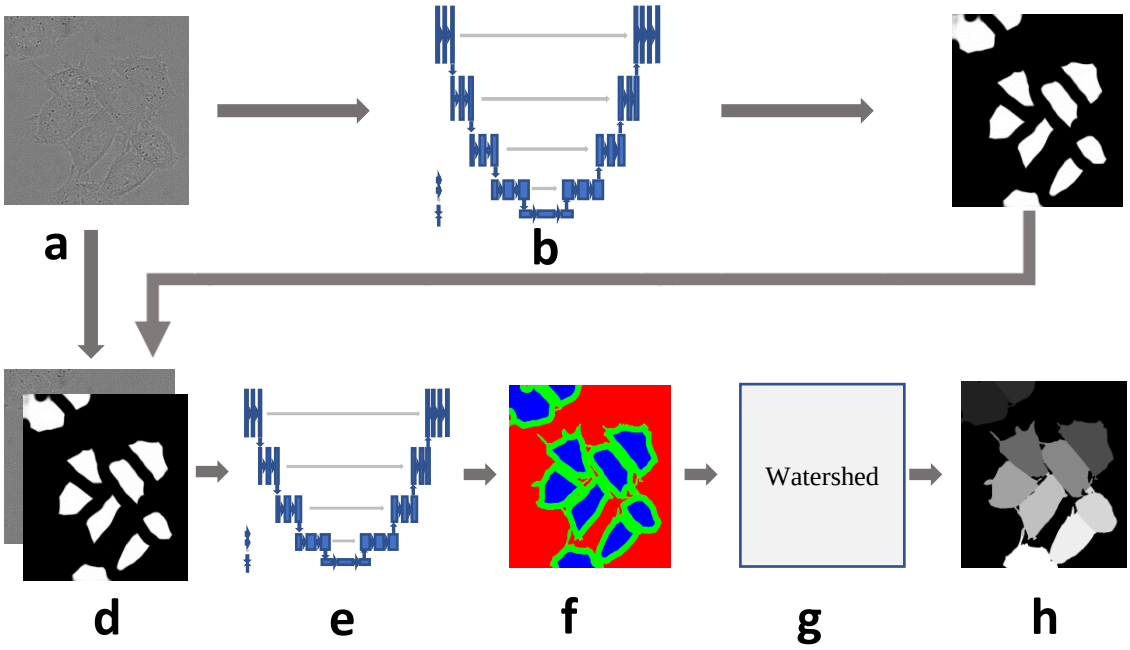
3.3.3 Önerilen yöntemin yapısı

Yapılan deneysel çalışmalar neticesinde biri ön bilgi oluşturan diğeri tam bölütleme yapan iki farklı ağ oluşturulmasına karar verilmiştir. Bu ilk ağ hücreleri tespit etmek için, ikinci ağ bölütlemek için kullanılmıştır. Literatürde yer alan çoğu yöntem gibi iki ağ için de U-Net mimarisi tercih edilmiştir. Bu ağ yapısı 18 konvolüsyonel katmandan ve 4 seviyeden oluşmaktadır. İlgili makaleden farklı olarak boyut artırma işleminde ters konvolüsyon katmanı kullanılmıştır. Başlangıç nöron sayısı 64 olarak kullanılmıştır. Veri artırma işlemi yapıldığı için düşük sayıdaki verinin sorun olması önlenmiştir. Önerilen ağ yapısı Şekil 3.9'te görülebilir. Her bir ağ çıktısından sonra sonuçları ikili sisteme getirmek için eşikleme işlemi uygulanmıştır. Bu işlem ile aynı zamanda zayıf bağlantılı alanlar ayrılmıştır. Son olarak watershed algoritması uygulanarak etiketleme işlemi yapılmıştır (Parvati vd. 2008).

Girdi ve çıktı katman sayıları her iki ağ için farklıdır. Ancak çıktı aktivasyon fonksiyonu olarak her iki ağda da Softmax (3.2) fonksiyonunu kullanmaktadır. Softmax fonksiyonu 0 ile 1 arasında değer üreten çoklu sınıflandırmada kullanılan bir fonksiyondur. Bu fonksiyon çıktısı ile bir pikselin hangi sınıfa ait olma olasılığı hesaplanır. Ayrıca odak kayıp fonksiyonu da iki ağ için ortaktır. 0.001 öğretme katsayısı ile Adam optimizasyon fonksiyonu (Kingma ve Ba 2014) kullanılmıştır.

$$\sigma\,(z)_i = \frac{e^{z_i}}{\sum_{j=1}^{K} e^{z_j}} \tag{3.2}$$

Ağın eğitimi sırasında erken durma (early stopping) fonksiyonu kullanarak ağı modelin ezberlemesini engelleyip en uygun durumda eğitimin durması gerçekleştirilmiştir. Bu fonksiyon ile ardışık 10 devirde kayıp fonksiyonunu sonucunda bir fark olmuyorsa eğitim durdurulmaktadır. Ayrıca eğitimler sırasında öğrenme katsayısı eğer ardışık 10 devirde kayıp fonksiyonu sonucunda gelişme olmaz ise 0.1 oranda azaltılmıştır.



Şekil 3.9 Önerilen Yöntemin Yapısı (a) Orijinal görüntü (b) U-Net mimarisindeki hücre tespit ağı (c) Eşikleme (d) İkinci ağ için oluşturulan girdi verisi (e) U-Net mimarisindeki hücre bölütleme ağı (f) Çok sınıflı ikinci ağ çıktısı (g) Faklı hücreleri etiketlmek için Watershed algoritması (h) Önerilen yöntem çıktısı

Bu çalışmada geliştirilen yöntemin aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- Orijinal görüntüye histogram eşitlemesi uygulanır.
- Önceki aşamada elde edilen sonuç 0 ile 1 arasına normalize edilir.
- Normalize edilen görüntü U-Net mimarisindeki ilk modele girdi olarak verilir.
- İlk modelin çıktısına eşikleme işlemi uygulanır.
- Orijinal görüntü ve eşikleme uygulanan görüntü iki katmanlı veriye çevrilir.
- Önceki adımdaki veri yine U-Net mimarisindeki ikinci modele girdi olarak verilir.
- İkinci ağın çıktısımda 0 ile 1 arasında elde edilen sonuçlar eşikleme uygulanarak 0 ve 1' e çekilir. Tüm pikseller 0 ve 1 değerlerinden birini alır.
- Eşikleme sonucunda hücre sınıfı işaretçi, zemin sınıfını negatifi girdi olacak şekilde watershed algoritması uygulanır.
- Watershed algoritmasında her bir hücre farklı bir değerle etiketlenerek sonuç oluşturulur.

Önerilen yöntemin sözde kodu aşağıdaki gibidir.

Procedure segmentation(inputImage):

model1 = Unet(inputSize = (512,512,1), outputSize = (512,512,2))

model2 = Unet(inputSize = (512,512,2), outputSize = (512,512,3))

histogramEqualize(inputImage)

normalize0_1(inputImage)

model1Out = model1.predict(inputImage)

threshold(model1Out,THR1)

model2Inp = prepareForModel2(inputImage, model1Out)

model2Out = model2.predict(model2Inp)

threshold(model2Out,THR2)

results = watershed(model2Out)

3.3.4 Kayıp fonksiyonu

Etiket sınıf sayısının üçe çıkarılması ve iki ağ kullanan yapının haricinde kayıp fonksiyonu üzerine de çalışılmıştır. Bu türden problemler için literatürde yer alan farklı kayıp fonksiyonları ile deneyler yapılarak veri dengesizliğini çözecek uygun fonksiyon bulunmaya çalışılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda en iyi sonuç odak kayıp fonksiyonu (focal loss) ile elde edilmiştir (Çizelge 3.3). Odak kayıp fonksiyonu bu problemdeki gibi düzensiz veri setlerinde kullanılan fonksiyonlardan biridir (Lin vd. 2018). Bu fonksiyon için sınıf ağırlıkları deneysel çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Fonksiyon denklemi (3.3)'te gösterildiği gibidir.

$$L = \sum_{c=1}^{m} -a * (1 - p,c)^{gamma} * y,c * \log(p,c) \quad (3.3)$$

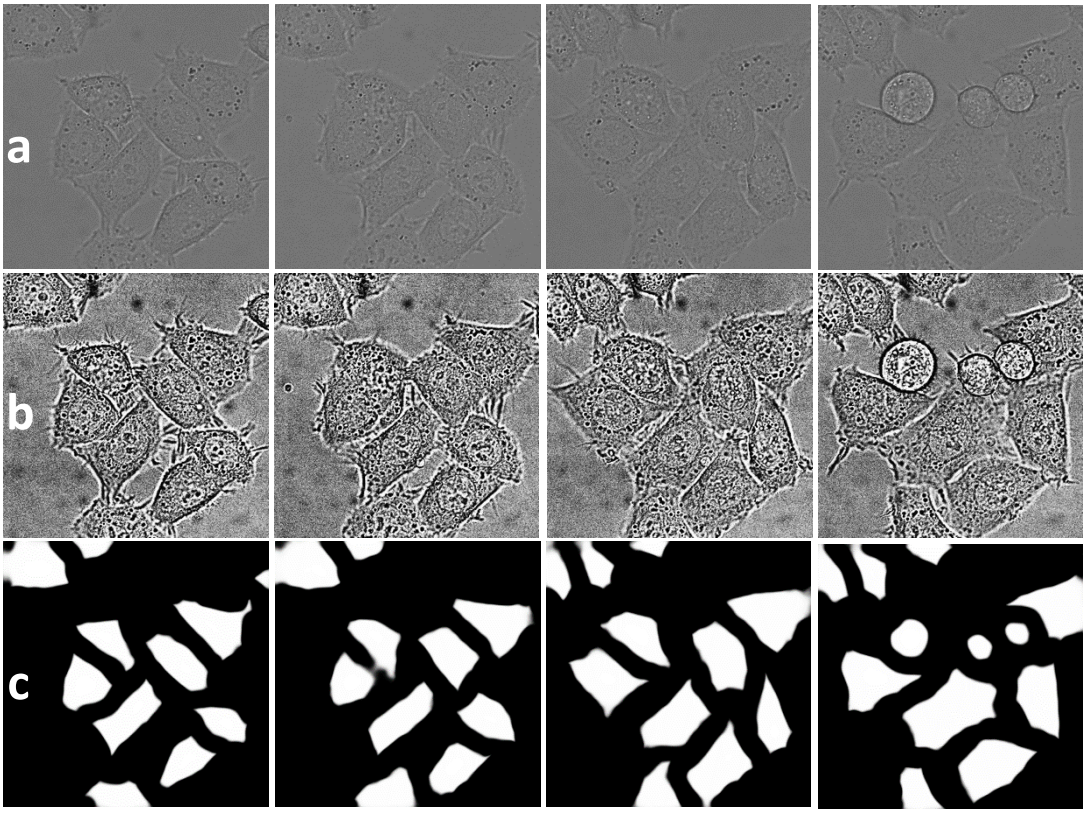
m = sınıf sayısı, p = tahmin, y= doğru etiket, a = sınıf ağırlıkları, gamma = sabit değer

Çizelge 3.3 DIC-C2DH-HeLa veri setinde farklı kayıp fonksiyonlarında başarı skorları

Kayıp Fonksiyonu	**Hücre Tespit Skoru**
Kategorik Çapraz Entropi	0.914
Ortalama Kare Hata	0.916
Odak Kayıp	0.918

3.3.5 Hücre tespit ağı

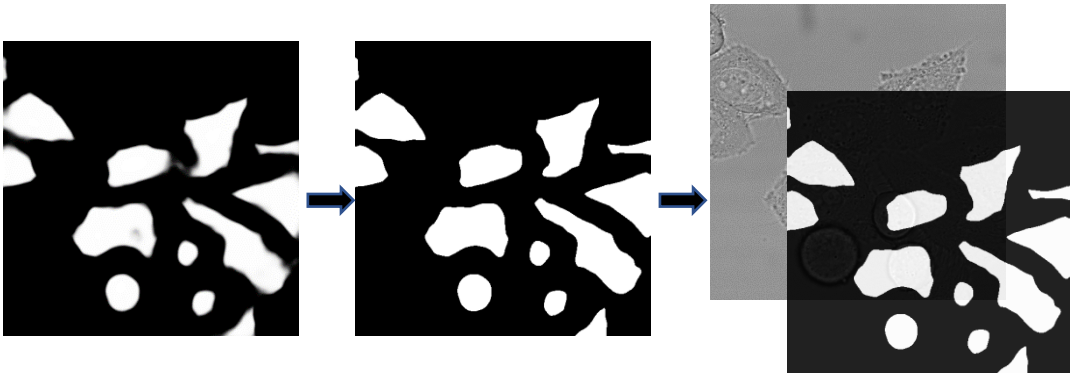
Bu ağ ile her bir farklı hücrenin işaretlemesi ve sonraki ağ için öncü bilgi üretmesi amaçlanmıştır. Özellikle bitişik hücrelerin ayrılmasında öncü bilginin yardımcı olması beklenmektedir. Bu bağlamda kullanılan U-Net mimarisi de bir konvolüsyonel sinir ağından oluşturulmuştur. Girdi olarak ön işlem uygulanmış orijinal görüntü verilmektedir. Çıktı katman sayısı ikidir. Bu ağı eğitmek için etiket sınıflarından hücre ve zemini kullanmak yeterli olmaktadır. Sınır olarak işaretlenen bölgeye gerek yoktur; bir bölgede hücre olduğu bilgisi öncü bilgi olarak yeterli olacaktır. İki sınıflı odak kayıp fonksiyonu kullanılmıştır. Kayıp fonksiyonunda hücre sınıfının ağırlığı zemin sınıfına göre yüksek tutulmuştur. Hücre tespit ağı ile DIC- C2DH -HeLa veri setinden elde edilen örnek sonuçlar Şekil 3.10'da gösterilmektedir.



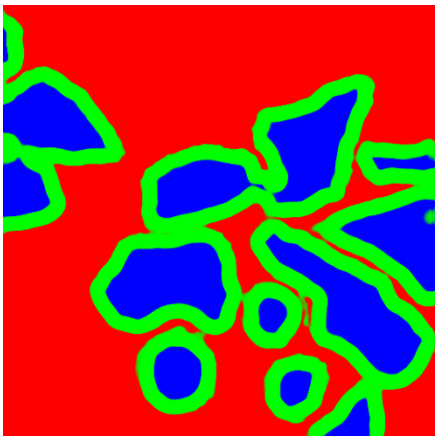
Şekil 3.10 Hücre tespit ağı sonuçları (a) Orijinal görüntü (b) Ön işlemden geçirilmiş ağ girdi görüntüsü (c) Çıktı görüntüsü

3.3.6 Hücre bölütleme ağı

Hücre tespit ağından aldığı öncü bilgi ile tam bölütleme yaparak zemin, hücre ve hücre sınırlarını bulmayı hedefleyen ağdır. Bu ağdan gelen görüntü 0 ile 1 arasındadır. Bu yüzden öncü bilgiyi kullanmadan önce eşikleme işlemi uygulanır. Böylece görüntü hem 0 ve 1 değerlerine geçirilmiş olur hem de zayıf bağlı hücreler ayrılmış olur. Bu işlemden sonra elde edilen görüntü ile orijinal görüntü iki katmanlı hale getirilir ve bölütleme ağına girdi olarak verilir. İlk eğitilen ağda olduğu gibi U-Net mimarisi kullanılmıştır. Ağırlıkları etiketlerin piksel oranına göre hesaplanmış odak kayıp fonksiyonu kullanılmıştır. Önceki modelden farklı olarak etiketteki üç sınıfı da kullanır. Şekil 3.11'de hücre tespit ağı çıktısından bölütleme ağına girdi oluşturulmasına ait örnek gösterilmektedir. Şekil 3.12'de ise bu örneğe ait üç sınıflı bölütleme ağı çıktısı gösterilmektedir.



Şekil 3.11 Hücre bölütleme ağı girdi görüntüsü oluşturma



Şekil 3.12 Hücre bölütleme ağı örnek çıktısı

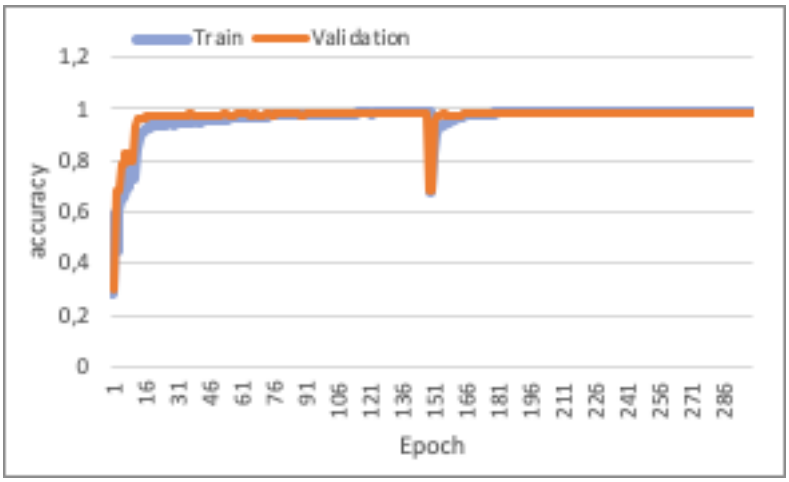
3.3.7 Modellerin eğitimi

Geliştirme için Python programlama dili kullanılmıştır. Görüntü işleme algoritmaları için numpy, opencv, scikit-image ve scipy kütüphaneleri kullanılmıştır. Numpy görüntü için veri yapısını sağlamak, opencv histogram eşitleme ve normalizasyon, scikit-image watershed algoritması ve scipy hücre içindeki boşlukları tamamlamak için kullanılmıştır. Derin öğrenme için Tensorflow arka ucu ile çalışan keras kütüphanesi kullanılmıştır. Ağ eğitmek için Google Colab hizmeti tercih edilmiştir. Colab ile bulut üzerinde GPU erişimi mümkün olmaktadır. Sağlanan GPU NVIDIA Tesla K80 modelidir. Bu GPU hizmeti eğitim süresini oldukça kısaltmaktadır.

Ağların eğitiminde erken durma fonksiyonu kullanıldığı için uygun devir sayısı daha kolay bulunmuştur. Hücre tespit ağı 300 devir (epoch) ve her devirde 40 döngüde eğitilmiştir. Bu eğitimler sırasındaki doğruluk-devir grafiği Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Hücre yakalama ağı ise 160 devirde ve her devir 20 döngüde eğitilmiştir.

Çizelge 3.4 Eğitilen ağların girdi ve çıktıları

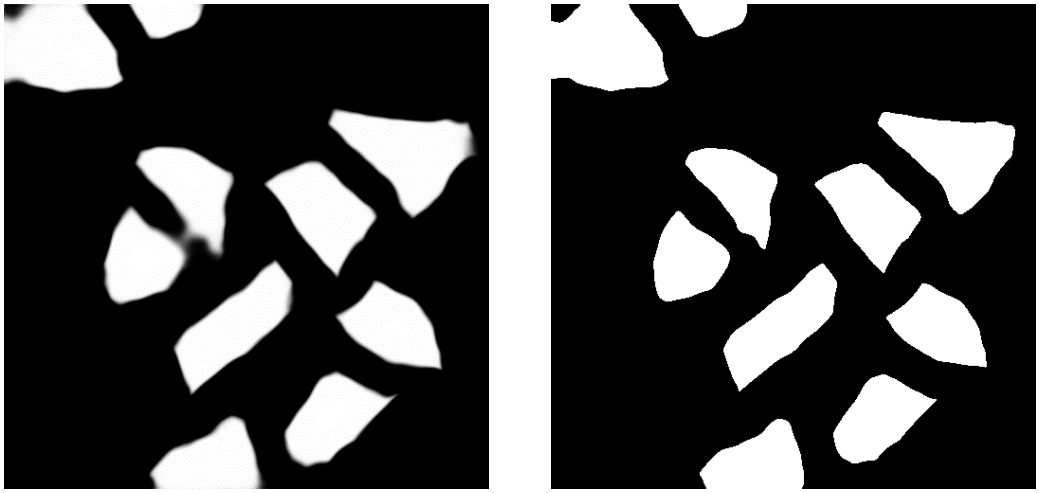
Ağ	**Girdi**	**Çıktı**
Hücre Tespit Ağı (HTA)	1 katman - Orijinal görüntü	2 Sınıf – Hücre , zemin
Hücre Bölütleme Ağı (HBA)	2 katman - Orijinal görüntü, HTA çıktısı	3 Sınıf – Hücre,zemin,sınırlar



Şekil 3.13 Hücre tespit ağı eğitim doğruluk grafiği

3.3.8 Eşikleme işlemi

Eşikleme işlemi, 0 ile 1 arasında sonuç çıkaran iki modelin çıktısına da uygulanarak ikili sisteme geçirmek için kullanılmıştır. İkili eşikleme algoritması, seçilen bir değer üzerindeki pikselleri bire eşitlerken diğer pikselleri sıfıra eşitler. Bu işlem ile zayıf bağlı bölgeleri ayırarak bitişik hücrelerin ayrılmasına yardımcı olur (Şekil 3.6). Ancak yüksek bir değer seçilince bir hücrenin yanlışlıkla parçalı olmasına sebep olabilmektedir. Her iki ağdan sonra uygulanacak eşik değerleri THR1ve THR2 olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin değeri ancak yapılan testler sonucunda belli olabilir. Bu değerler DIC-C2DH-HeLa veri setinde 0-255 aralığında ağ çıktısı için sırasıyla 50 ve 100 olarak bulunmuştur. Bu değerler belirlenirken yanlış bölütleme olmayacak en yüksek değer seçilmeye çalışılmıştır.

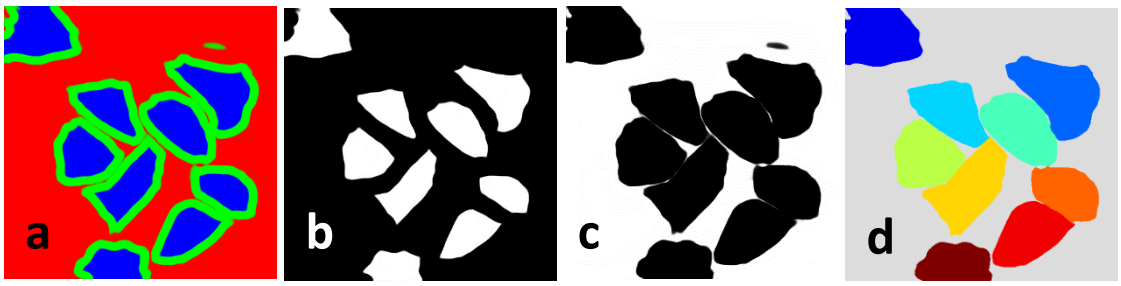


Şekil 3.14 Birinci model çıktısı ve eşikleme uygulanmış hali

3.3.9 Watershed işlemi ve etiketleme

Görüntü üzerindeki farklı nesneleri ayırmak için kullanılan bir algoritmadır. İşaret olarak verilen noktalardan başlayarak topolojik harita üzerinden bölütleme yapmaya çalışır. Her bir bağımsız bölüm bulduğunda burayı farklı olarak etiketler. Bu yöntemin çalışılan veri setinde doğrudan kullanılması etkili değildir çünkü bitişik hücreleri ayırmak pek mümkün olmayacaktır. Ancak ikinci ağın sonucu bu algoritmanın verimli çalışması için idealdir. Her bir hücre etrafında bir hücre sınırı olarak işaretlenen bölge olacağı için bölütlemek

daha kolay olacaktır. Bu yüzden son sonucu elde etmek için bir görüntü işleme algoritması olan watershed yöntemi kullanılmıştır. Bu algoritma sonucunda artık son etiketleme işlemi yapılabilmektedir.



Şekil 3.15 Watershed algoritması girdi ve çıktıları (a) İkinci model sonucu (b) waterhed işaret girdisi (c) watershed girdi görüntüsü (d) watershed çıktısı

3.4 Hücrelerin Takibi İşlemleri

Her bir hücrenin tüm görüntü dizinindeki hayat döngüsü takip edilecektir. Hücre ölümünün gerçekleşmesiyle veya hücrenin mikroskobun görüş alanından çıkmasıyla görüntü dizininde kaybolabilir. Ayrıca hücreler bölünerek yeni hücreler oluşturabilir. Bu çalışma kapsamında bunları tanımlayacak algoritma da yönteme eklenmiştir. Böylelikle hücrelerin görüntü seti üzerinde takibi yapılabilmiştir. Bu algoritma bazı varsayımlar kullanılarak geliştirilmiştir. Ardışık görüntülerde hücrelerin hareketlerinin sınırlı olduğu varsayılmıştır. Hücreler çok hareketli olabilse de görüntülerin kaydedilme aralığı bu hareketleri yakamaya uygun olmalıdır. Aksi takdirde çok fazla aralıklarla alınan görüntülerden takip yapmak hücreler hareket ederken şekil de değiştirdiklerinden mümkün olmayacaktır.

Hücrelerin takibi için uygulanan algoritma aşağıdaki adımlardan oluşmaktadır.

1. Hücreler etiketleme yapılırken aynı noktadan başlamalıdır. Bu nokta sol üst köşe olacak şekilde seçilmiştir. Bu işlem algoritmanın daha hızlı çalışması için gereklidir.
2. İkinci görüntüden itibaren her bir hücrenin önceki görüntüdeki hücreler ile konum benzerliğine bakılır. %25'den fazla benzerliği sahip olanlar arasından en fazla benzerliğine sahip olanı ile eşlenir.

3. 2. Adımda eşlenen hücrelerden ortak eşlenen hücre var ise bu hücreler önceki benzer hücreden bölünerek oluşmuşlardır.
4. 2. Adımda eşlenen hücre başka bir hücre tarafından eşlenmediyse aynı hücredir.
5. 2. Adımda hiçbir eşleme yapmayan hücre görüntü dizinine yeni girmiştir.

Bu adımlardan sonra görüntü dizinindeki tüm hücrelerin hayat ağacı çıkarılmış olur. Bu ağaçtan bölünen, kaybolan ve sabit kalan hücreler belirlenir.

Önerilen yöntemde en az %25 benzerlik aranması şartı mikroskop görüş alanına yeni giren hücreleri tespit etmek için tanımlanmıştır. Aksi takdirde yeni hücre az da olsa benzediği hücreden bölünmüş olarak anlaşılacaktır.



Şekil 3.16 Ardışık iki bölütlenmiş görüntü ve bu görüntüler arası değişim

Yukarıdaki şekilde ardışık iki bölütlenmiş görüntü ve bunları arasında değişim gösterilmektedir. En sağdaki görüntüde her hücrenin çevresinde yer alan ve kendisinin açık renginde olan bölgeler o hücrenin hareket ettiği alanı ifade eder. Şekilde de görüldüğü gibi bölünmeyen veya kaybolmayan hücreler konumlarını büyüklüklerine oranla çok değiştirmemişlerdir. Bölünen hücrelerin konumları ise daha fazla oranda değişmiştir. Ama yine de bölündüğü hücreden çok uzaklaşmamıştır. Bu da algoritmanın çalışması için yeterlidir.

4. DENEYSEL BULGULAR

Bu çalışma kapsamındaki deneyler DIC- C2DH -HeLa veri seti üzerinde yapılmıştır. Bu veri seti 2'si eğitim 2'si yarışma olmak üzere 4 ayrı görüntü dizininden oluşmaktadır (Çizelge 4.1). Yalnızca eğitim setindeki görüntü dizinleri etikete sahiptir. Çalışmada deneyler için bu set kullanılmıştır. Daha sonra ortaya çıkan yöntemi değerlendirmek ve var olan diğer yöntemler ile karşılaştırmak için yarışma seti kullanılmıştır. Çalışma için kullanılacak veri seti hem eğitim hem doğrulama hem de test için kullanılacağı için üçe bölünmüştür. Kullanılacak iki görüntü dizininden birincisi eğitim ve doğrulama, ikincisi ise test için kullanılmıştır. Her bir dizinde 84 görüntü bulunmaktadır.

Çizelge 4.1 DIC- C2DH -HeLa veri seti görüntü dağılımı

	Eğitim Seti		**Yarışma Seti**	
	Set 1	**Set 2**	**Set 3**	**Set 4**
Görüntü Sayısı	84	84	115	115
Etiketli Görüntü Sayısı	84	84	0	0
Kullanım Amacı	Eğitim , Doğrulama	Test	Yöntem Değerlendirmesi	Yöntem Değerlendirmesi

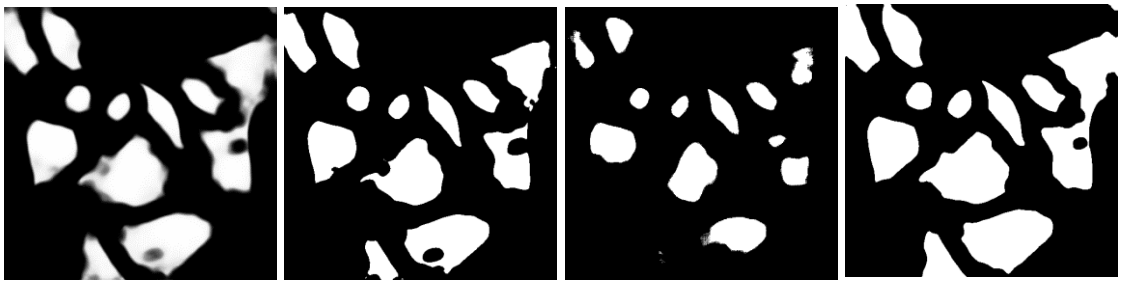
4.1 Hücre Bölütleme Deneyleri

İlk deneylerde U-Net mimarisindeki tek bir ağ ile sonuca ulaşılmaya çalışılsa da beklenen sonuç elde edilememiştir. Bu yüzden birbiriyle bağlantılı farklı iki ağ ile deneyler yapılmıştır (Bölüm 3). Bu deneyler sonucunda tek ağ kullanan yönteme göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Bir bölgedeki bitişik hücreleri tek seferde bulmak yerine o bölgede farklı hücrelerin olduğunu bilip daha sonra tam bölütleme yapmak başarıyı artırdığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2 DIC-C2DH-HeLa Eğitim Set 2 üzerinde farklı yöntemlerin sonuçları

Çalışılan Yöntem	**Hücre Tespit Skoru**	**Hücre Bölütleme Skoru**
İki U-Net ile Önerilen Yöntem	0.92	0.81
Tek U-Net	0.91	0.78

Yapılana deneyler ile uygun eşikleme değerlerinin bulunmasını da sağlanmıştır. Her bir ağın sonucunda uygulanan ve 0 ile 1 arasındaki sonucu ikili sisteme çevirmeye yarayan eşikleme aynı zamanda bölütleme performansını da artırmaya yardımcı olabilmektedir. Yalnız şeçilecek eşikleme değerinin düzgün belirlenmesi gerekir. Küçük değerlerinin bölütmeleme üzerinde etkisi olmayacağı gibi yüksek değerlerde hücre kayıplarına yol açar (Şekil 4.1). Yapılan deneyler neticesinde uygun eşikleme değeri bulunmuştur.



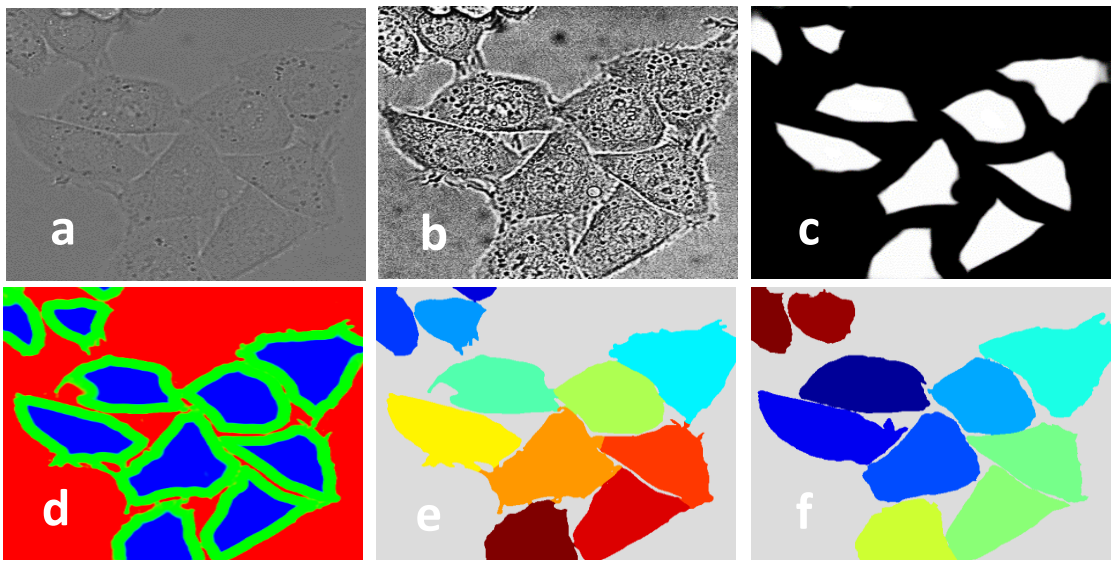
Şekil 4.1 Farklı eşik değerlerinin etkisi (Soldan sağa) Birinci ağ çıktısı , uygun eşik değeri, yüksek eşik değeri, düşük eşik değeri

DIC-C2DH-HeLa eğitim setlerinde yapılan testler sonucunda Çizelge 4.3'teki sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçları elde ederken kullandığımız modelde, kayıp fonksiyonu olarak odak kayıp fonksiyonu, ağırlık olarak etiket sınıflarının piksel oranlarının seçilmesi model perfromansını artırmıştır. Bu değişkenler ile daha önce belirlenen eşikleme değerleri sabit tutularak Set 1 ve Set 2'deki tüm görüntüler ile model yeniden eğitilmiştir. Bu eğitimin amacı daha önce test için ayrılan Set 2 görüntülerinin de eğitime katılarak veri sayısının artırılmasıdır.

Çizelge 4.3 Farklı koşullarda yapılan deneyler ve skorları

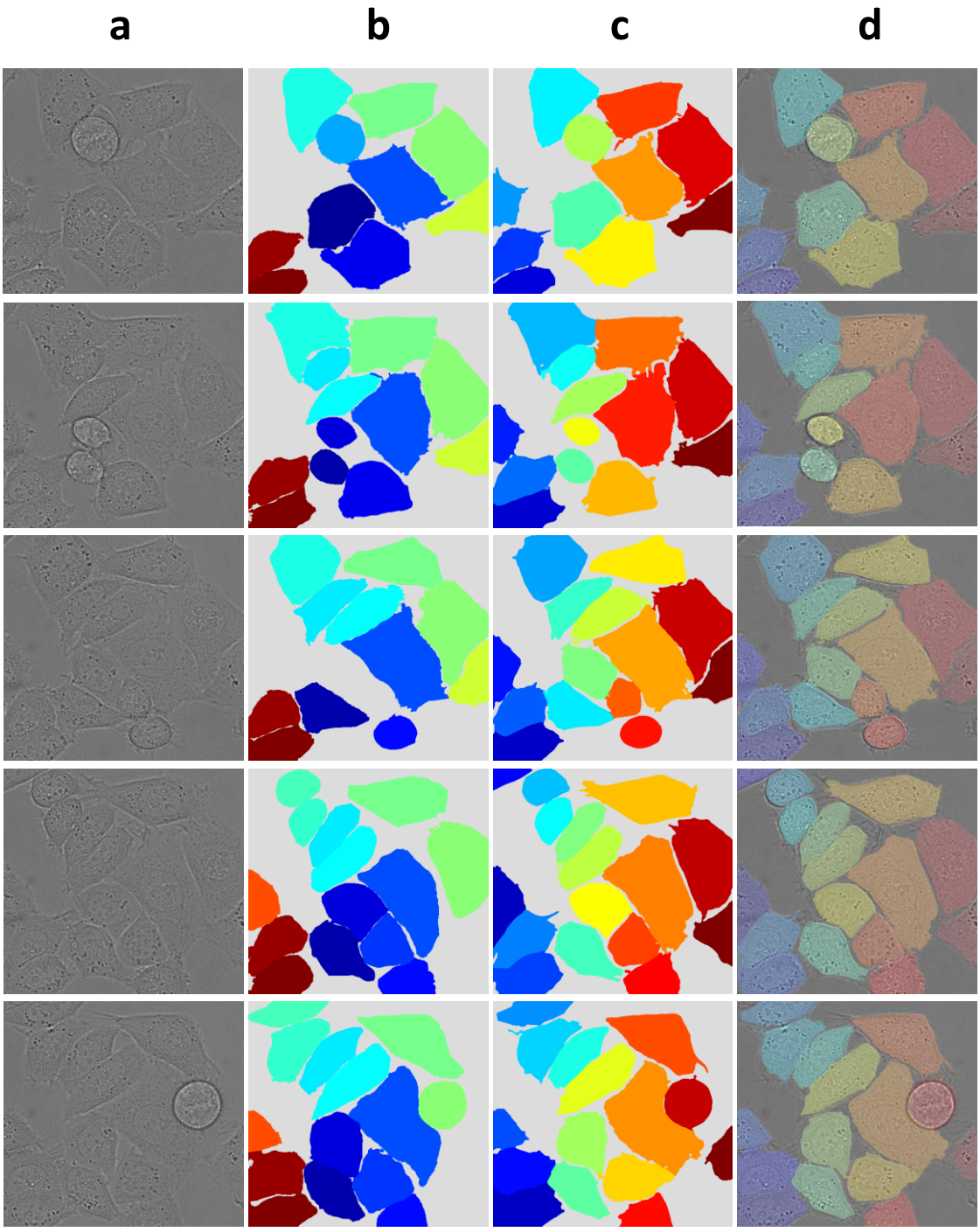
Veri seti	**Kayıp fonksiyonu**	**Model sayısı**	**Bölütleme skoru**	**Tespit Skoru**
Düzeltilmiş	Odak Kayıp Ağırlıklar 0,5-2-2	2	0,81	0,92
Düzeltilmiş	Ortalama Kare Hata	2	0,80	0,92
Düzeltilmiş	Kategorik Çapraz entropi	2	0,81	0,91
Düzeltilmiş	Odak Kayıp Ağırlıklar 0,5-2-1	2	0,80	0,91
Düzeltilmiş	Odak Kayıp Ağırlıklar 0,5-1-1	2	0,80	0,91
Düzeltilmiş	Odak Kayıp Ağırlıklar 0,5-1-0,5	2	0,79	0,91
Düzeltilmiş	Odak Kayıp Ağırlıklar 0,5-0.5-0.5	1	0,78	0,91
Düzeltilmiş	Kategorik Çapraz entropi	1	0,79	0,90
Düzeltilmiş	Ortalama Kare Hata	1	0,78	0,90
Orijinal	Ortalama Kare Hata	1	0,76	0,87

Önerilen yönteminin adımlarının bir örnek üzerinde gösterimi Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2 Önerilen yöntemin aşamalarının örnek üzerinde gösterimi (a) Orijinal görüntü (b) histogram eşitlemesi (c) Birinci model çıktısı (d) ikinci model çıktısı (e) Önerilen yöntemin sonucu (f) Gerçek zemin

DIC-C2DH-HeLa veri setinde elde edilmiş bazı sonuçlar Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3 Örnek sonuçlar (a) Orijinal görüntü (b) Gerçek zemin (c) Önerilen yöntem çıktısı (d) Önerilen yöntem çıktısının orijinal görüntü üzerinde gösterimi

Oluşturulan yeni modeller ile Set 3 ve Set 4 üzerinde deneyler yapılarak önerilen yöntemin diğer yöntemler ile karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 4.4). Bu karşılaştırma CTC tarafından yapılmıştır.

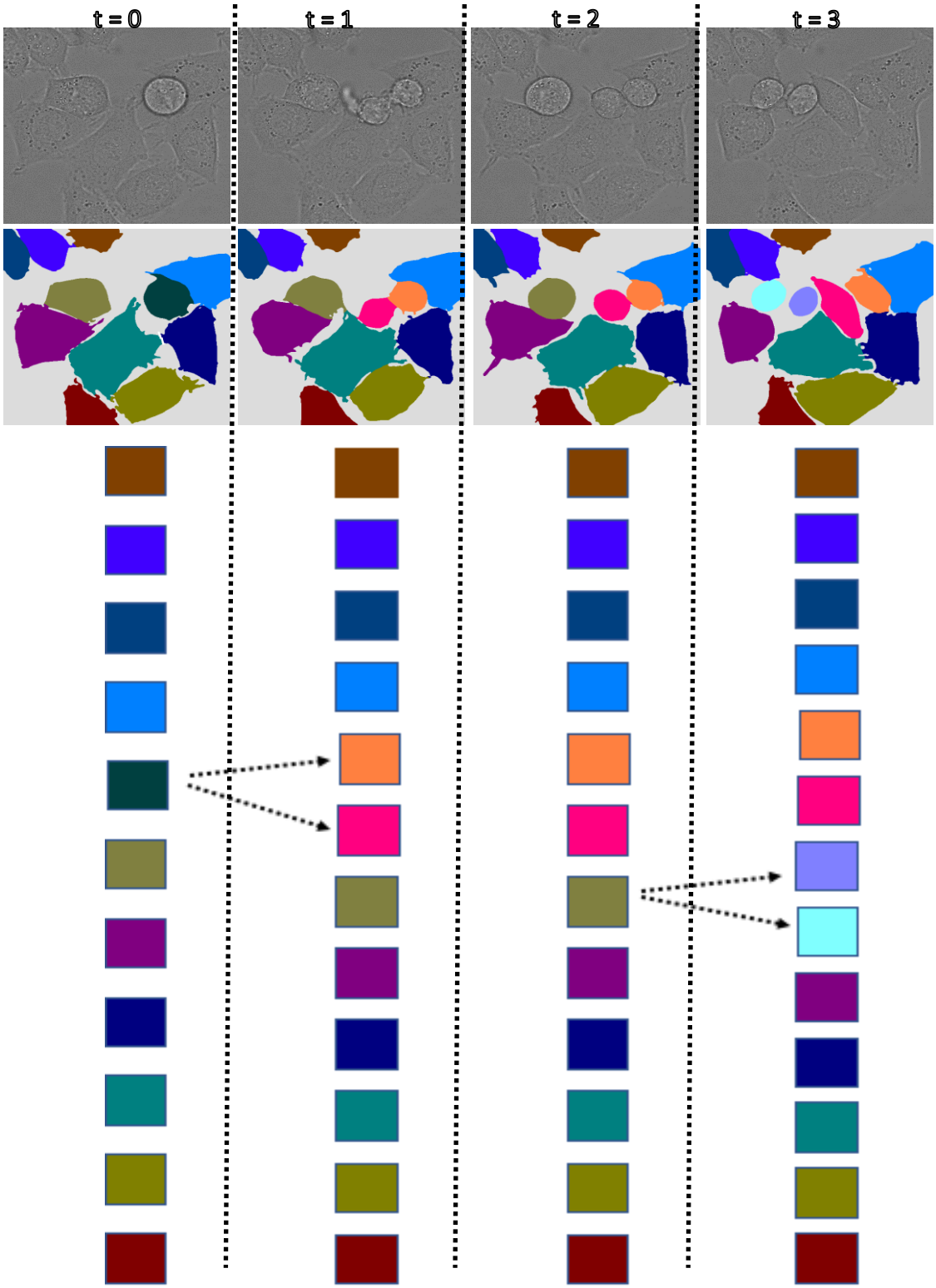
Çizelge 4.4 DIC-C2DH-HeLa yarışma setinde elde edilen sonuçlar. * ilgili sonucun 15 Aralık 2020 tarihinde CTC websitesinde alındığını belirtir. CALT-US : Fidel A. G. Pena, Federal University of Pernambuco, Brazil;MU-Lux-CZ : Filip Lux, Masaryk University, Czech Republic;UVA-NL : Andreas Panteli,University of Amsterdam, The Netherlands;TUG-AT : Christian Payer, Graz University of Technology,Austria;BGU-IL : Assaf Arbelle, Ben-Gurion University of the Negev, Israel;CVUT-CZ : Tomáš Sixta,Czech Technical University in Prague, Czech Republic

Metot	**Hücre Bölütleme skoru**	**Hücre Tespit Skoru**
CALT-US (Cunha vd. 2020)	**0.870**	**0.979**
MU-LUX-CZ (Lux vd. 2019)	0.863	0.961
UVA-NL *	0.852	0.958
Önerilen Yöntem	**0.850**	**0.958**
TUG-AT *	0.834	0.956
BGU-IL (Arbelle vd. 2019)	0.829	0.948
CVUT-CZ *	0.792	0.906

4.2 Hücre Takip Denemeleri

Hücrelerin bölütlemesi yapıldıktan sonra hücre takibi algoritması ile de deneyler yapılmıştır. Hücre bölütlemesinin doğruluğu hücre takibini doğrudan etkileyecektir. Çünkü eksik ya da fazla tespit edilen hücreler takip işini bozacaktır.

Hücre takip deneyleri de Set 1 ve Set 2 grubu veri setinde yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda örnek sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Bu deney sonucunda çıkan takip skorları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4 Bölütlenmiş ardışık görüntülerde hücre takibi

Hücre takibinde karşılaşılan en önemli zorluk hücre bölünmesidir. Şekil 4.4'te t=3 zamanında yeni bölünen hücrelere bakıldığında hücrelerden birisi bölündüğü hücrenin eski konumuna yakınken, diğeri daha uzaktadır. Bu da hücre yoğunluğu yüksek olduğunda hangi hücreden bölündüğünün karıştırılmasına sebep olabilecektir.

Çizelge 4.5 Veri setlerindeki takip başarı oranları

Veri seti	**Takip Başarısı**
Set 1	0.904
Set 2	0.897

Hücre takibi algoritmasında yeni hücreler için minimum benzerlik oranı yapılan deneyler sonucunda belirlenmiştir. Bu deneylerin sonucu Çizelge 4.6'de gösterilmektedir. Oran yüksek tutulunca bölünen hücreler yeni hücre gibi anlaşılmıştır.

Çizelge 4.6 Takip algoritması benzerlik oranı deneyleri

Minimum Benzerlik	**Takip Başarısı**
%15	0.890
%25	0.897
%35	0.802

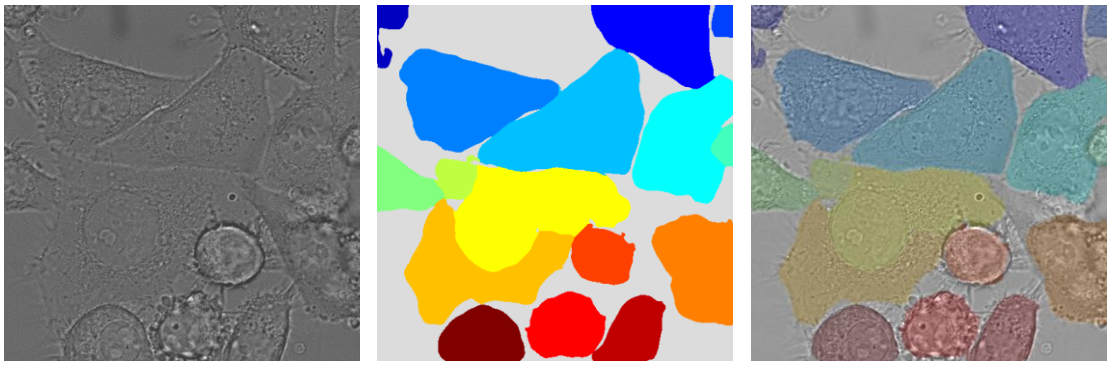
5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tez kapsamında yürütülen çalışmalar neticesinde, birisi öncü bilgi çıkaran diğeri bölütleme yapan iki ağdan oluşan yöntem önerilmiştir. Hücre konumunu işaret olarak tespit eden ilk ağ çıktısını öncü bilgi olarak kullanmak, özellikle bitişik hücrelerin ayrılmasında, ikinci ağın performansını artırmıştır. Odak kayıp fonksiyonu da ayrıca başarının artmasını sağlamıştır Önerilen yöntemi var olan diğer yöntemler ile karşılaştırmak için yarışma veri setinde yapılan deneylerde, hücre tespit başarısı 0.958, bölütleme başarısı 0.85 olarak çıkmıştır. Geliştirilen model, bu sonuçlar ile CTC yarışmasında DIC-C2DH-HeLa veri setinde on sekiz katılımcı arasından çok küçük farklarla ortalamada dördüncü duruma gelmiştir. Ayrıca, Mart 2021 tarihinde altıncı kez düzenlenecek CTC yarışmasında, çalışılan veri setinde belirlenen eşik değerini geçmiştir. Böylelikle birincil kısımda yarışacak yöntemler arasına girmiştir.

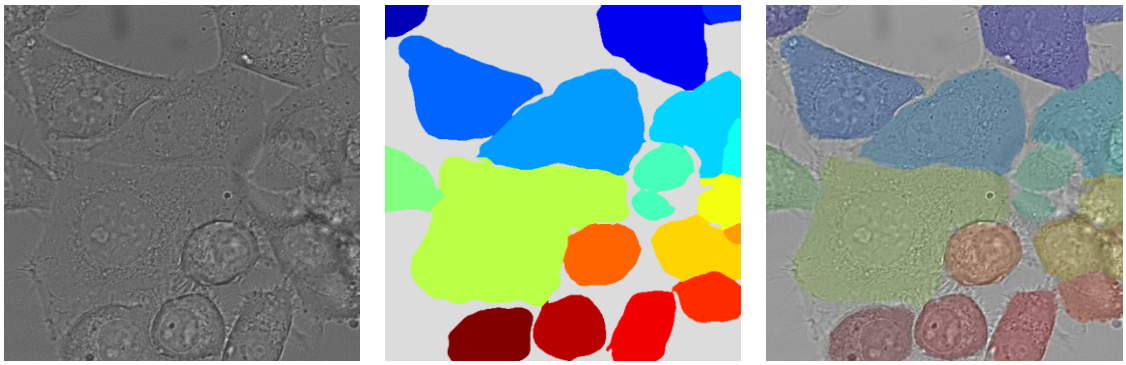
Yöntemin eksiklikleri incelendiğinde, bitişik hücreleri bölütlemede eksiklikleri bulunduğu gözlemlenmektir. Ayrıca bazı hücrelerin fazladan bölütlendiği durumlar oluşabilmektedir. Bu duruma bir örnek Şekil 5.1'de gösterilmektedir. Buna hücre içi heterojenliğinin sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu türdeki hatalarda hücrenin diğerlerine göre daha büyük boyutta olduğu gözükmektedir. Hücre çekirdeği yaklaşık bir hücre büyüklüğündedir. Ama bu durum her zaman sorun olmamaktadır. Bu örnekteki görüntünün zaman olarak bir önce çekilmiş örneğinde ise başarılı bir bölütleme üretilmiştir (Şekil 5.2). Bu yüzden uzmanlar tarafından sağlanan etiketli veri arttıkça başarının da artacağı düşünülmektedir.

Hücre takibi için önerilen yöntemin başarısı doğrudan bölütleme başarısına bağlıdır. Bölütleme başarısı yüksek olduğu örneklerde hücre takibi iyi bir şekilde yapılabilmiştir.

Yukarıda belirtilen eksikliklere rağmen, modelimizin performansı, alandaki öncü çalışmaların performansına çok yakındır. Ayrıca değişken sayısı oldukça az olup bu alanda çalışanlar için kullanmaya uygundur. İlerde diğer tüm veri setlerinde aynı yöntemle denemeler yapıp sonuçlar elde etmek hedeflenmektedir. Böylelikle yöntemin tüm yönlerden artıları ve eksileri görülmüş olacaktır.



Şekil 5.1 Fazla Bölütlenme Sorunu (Soldan sağa) Orijinal görüntü, bölütlenmiş görüntü, Orijinal üzerine eklenmiş bölütlenmiş görüntü



Şekil 5.2 Önerilen yöntemin başarılı örneği

KAYNAKLAR

Arbelle, A. ve Raviv, T. R. 2019. Microscopy Cell Segmentation Via Convolutional LSTM Networks. 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019).

Besbes, M. 2004. Cells images color segmentation based on thresholding and watershed segmentation. IEEE International Conference on Industrial Technology, IEEE ICIT 04.

Brebisson, A. ve Montana, G. 2015. Deep neural networks for anatomical brain segmentation. Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition workshops. 20–28.

Cell Tracking Challenge. 2020. Web Sitesi: http://celltrackingchallenge.net, Erişim Tarihi: 18.12.2020.

Chen, H., Qi, X., Yu, L., Dou, Q., Qin, J. and Heng, P., 2017. DCAN: Deep contour-aware networks for object instance segmentation from histology images. Medical Image Analysis, 36.135-146.

Chen, L., Strauch, M., & Merhof, D. 2019. Instance Segmentation of Biomedical Images with an Object-Aware Embedding Learned with Local Constraints. Lecture Notes in Computer Science Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2019, 451-459.

Dawoud, Y., Hornauer, J., Carneiro, G., Belagiannis. V. 2020. Few Shot Microscopy Image Cell Segmentation. European Conference on Machine Learning and Principles and Practice of Knowledge Discovery in Databases

Eschweiler, D., Spina, T. V., Choudhury, R. C., Meyerowitz, E., Cunha, A., ve Stegmaier, J. 2019. CNN-Based Preprocessing to Optimize Watershed-Based Cell Segmentation in 3D Confocal Microscopy Images. 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging.

Google Colab. 2020. Web Sitesi: colab.research.google.com, Erişim Tarihi: 18.12.2020.

He, K., Gkioxari, G., Dollar, P., ve Girshick, R. 2017. Mask R-CNN. 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV).

Hernandez, D. E., Chen, S. W., Hunter, E. E., Steager, E. B., & Kumar, V. 2018. Cell Tracking with Deep Learning and the Viterbi Algorithm [Abstract]. 2018 International Conference on Manipulation, Automation and Robotics at Small Scales (MARSS).

Kaur M, Goyal P. 2015. A review on region based segmentation. International Journal of Science and Research (IJSR) 4. 3194-3197

Kervadec, H., Bouchtiba, J., Desrosiers, C., Granger, E., Dolz, J., ve Ayed, I. B. 2019. Boundary loss for highly unbalanced segmentation. Proceedings of The 2nd International Conference on Medical Imaging with Deep Learning. 102. 285–296.

Kingma D, Ba J. 2014. Adam: A method for stochastic optimization. arXiv.arXiv:1412.6980.

Lin, T., Maire, M., Belongie, S., Hays, J., Perona, P., Ramanan, D. Zitnick, C. L. 2014. Microsoft COCO: Common Objects in Context. Computer Vision – ECCV 2014 Lecture Notes in Computer Science, 740-755.

Lin, T., Goyal, P., Girshick, R., He, K. and Dollar, P., 2018. Focal Loss for Dense Object Detection. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence. 42(2).318-327.

Litjens, G., Kooi, T., Bejnordi, B., Setio, A., Ciompi, F., Ghafoorian, M., Laak, J., Ginneken, B., ve Sanchez, C. 2017. A survey on deep learning in medical image analysis.

Lux F. ve Matula P. 2019. DIC Image Segmentation of Dense Cell Populations by Combining Deep Learning and Watershed. 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging. 236-239

Long, J., Shelhamer, E., & Darrell, T. 2015. Fully convolutional networks for semantic segmentation. 2015 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition.

Maška, M. 2014. A benchmark for comparison of cell tracking algorithms. Bioinformatics. 30(11). 1609-17.

Matula, P., Maška, M., Sorokin, D., Matula, P., Ortiz-de-Solórzano, C. and Kozubek, M., 2015. Cell Tracking Accuracy Measurement Based on Comparison of Acyclic Oriented Graphs. PLOS ONE, 10(12), p.e0144959.

Minaee, S., Boykov, Y., Porikli, F., Plaza, A., Kehtarnavaz, N. ve Terzopoulos. D. 2020. Image segmentation using deep learning: A survey. arXiv preprint arXiv:2001.05566, 2020.

Noh, H., Hong, S., ve Han, B. 2015. Learning Deconvolution Network for Semantic Segmentation. 2015 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV).

Parvati, K., Prakasa Rao, B., ve Mariya Das, M. 2008. Image Segmentation Using Gray-Scale Morphology and Marker-Controlled Watershed Transformation. Discrete Dynamics In Nature And Society. 1-8.

Pena, F. A., Fernandez, P. D., Ren, T. I., Yui, M., Rothenberg, E. ve Cunha, A. 2018. Multiclass Weighted Loss for Instance Segmentation of Cluttered Cells. 2018 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP).

Pena, F. A., Fernandez, P. D., Tarr, P. T., Ren, T. I., Meyerowitz, E. M. ve Cunha, A. 2020. J Regularization Improves Imbalanced Multiclass Segmentation. 2020 IEEE 17th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI).

Ronneberger, O., Fischer, P. ve Brox, T. 2015. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. Lecture Notes in Computer Science Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention. 234–241

Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C. ve Myers, G. (2018). Cell Detection with Star-Convex Polygons. Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018 Lecture Notes in Computer Science, 265-273.

Senthilkumaran, N. ve Rajesh, R. 2009. Edge detection techniques for image segmentation–a survey of soft computing approaches. International journal of recent trends in engineering. 1(2): 250-254.

Senthilkumaran, N. ve Vaithegi, S. (2016). Image Segmentation By Using Thresholding Techniques For Medical Images. Computer Science Engineering: An International Journal, 6(1), 1-13.

Seo, H., Huang, C., Bassenne, M., Xiao, R. ve Xing, L. 2020. Modified U-Net (mU-Net) With Incorporation of Object-Dependent High Level Features for Improved Liver and Liver-Tumor Segmentation in CT Images. IEEE Transactions on Medical Imaging, 39(5), 1316-1325.

Simonyan K. ve Zisserman, A. 2014. "Very deep convolutional networks for large-scale image recognition," arXiv preprint arXiv:1409.1556, 2014.

Singh K. ve Singh. A. (2010). "A study of Image Segmentation Algorithms for Different Types of Images". IJCSI International Journal of Computer Science Issues. Volume 7 (issue 5). ISSN (Online): 1694- 0784.

Song, Y., ve Yan, H. (2017). Image Segmentation Techniques Overview. 2017 Asia Modelling Symposium (AMS). doi:10.1109/ams.2017.24

Trepat, X., Chen, Z., & Jacobson, K. 2012. Cell Migration. Comprehensive Physiology.

Ulman, V., Maška,M., Magnusson, K., Ronneberger, O., Haubold, C., Harder, N., Matula, P., Svoboda, D., Radojevic, M., Smal, I., Rohr, K., Jaldén, J., Blau, H., Dzyubachyk, O., Lelieveldt, B., Xiao, P., Li, Y., Cho, S., Dufour, A., Olivo-Marin, J., Reyes-Aldasoro, C., Solis-Lemus, A., Bensch, R., Brox, T., Stegmaier, J., Mikut, R., Wolf, S., A Hamprecht, F., Esteves, T., Quelhas, P., Demirel, Ö., Malmström,L., Jug, F., Tomancak, P., Meijering

E, Muñoz-Barrutia, A., Kozubek, M., ve Solorzano, C. 2017. An objective comparison of cell-tracking algorithms. Nature Methods. 14(12). 1141–1152.

Wu, G., Merchant, F.A. ve Castleman, K.R. 2008. Microscope Image Processing, Academic Press.

Vicente-Manzanares, M., ve Horwitz, A. R. 2011. Cell migration: an overview. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 769, 1–24

Visin, F., Romero, A., Cho, K., Matteucci, M., Ciccone, M., Kastner, K. ve Courville, A. 2016. ReSeg: A Recurrent Neural Network-Based Model for Semantic Segmentation. 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops (CVPRW).

Viterbi, A. 2009. Viterbi algorithm. Scholarpedia, 4(1), 6246.

Youden W. 1950. Index for Rating Diagnostic Tests. Cancer. 3(1). 32–35.

Zaitoun, N. M., ve Aqel, M. J. (2015). Survey on Image Segmentation Techniques.Procedia Computer Science, 65, 797-806.

Zhou, Z., Siddiquee, M. M., Tajbakhsh, N. ve Liang, J. 2020. UNet : Redesigning Skip Connections to Exploit Multiscale Features in Image Segmentation. IEEE Transactions on Medical Imaging, 39(6), 1856-186

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Emin Bakır
Doğum Tarihi : 1993
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kırşehir Fen Lisesi (2011)
Lisans : Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği (2016)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilgisayar Mühendisliği (Şubat 2018 – Şubat 2021)

Çalıştığı Şirketler

Mikro-Tasarım A.Ş – Yazılım Geliştirme Mühendisi (Aralık 2016 – Devam ediyor)