T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

LENSSİZ MİKROSKOPİ SİSTEMİNİN TASARLANMASI VE TIBBİ ÖRNEKLER ÜZERİNDE TEST EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Ali PALA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahid YILDIZ

Mayıs 2019

T.C.
SAKARYA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

LENSSİZ MİKROSKOPİ SİSTEMİNİN TASARLANMASI VE TIBBİ ÖRNEKLER ÜZERİNDE TEST EDİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Ali PALA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 30/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahid YILDIZ	**Prof. Dr. Raşit KÖKER** Üye	**Doç. Dr. Mehmet Recep BOZKURT** Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

[redacted]

Muhammed Ali PALA

30/05/2019

TEŞEKKÜR

Tez danışmanlığımı üstlenerek kişisel gelişimime ve mesleki hayatıma çok önemli katkılarda bulunan, beni her konuda sabırla dinleyen, motivasyon sağlayan, akademik bilgi ve birikimini benimle paylaşarak bana yol gösteren sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Zahid YILDIZ'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Elektrik Elektronik Mühendisliği Bölümü hocalarıma,

Tez içerisinde kullanılan örneklerin temin edilmesinde gösterdiği yardımlardan ötürü Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Fatih KÜÇÜKDURMAZ'a,

Çalışmalarım esnasında bilgi ve birikimlerini paydaş kılan değerli Arş. Gör. Ömer Faruk BOYRAZ ve Öğr. Gör. Ali Furkan KAMANLI'ya,

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Halil İbrahim YÜKSEK, Arş. Gör. Ali KUYUMCU, Arş. Gör. Murat Erhan ÇİMEN ve Arş. Gör. Muhammet Burhan NAVDAR'a,

Hayatımın her safhasında bana verdikleri emek, sevgi ve destekleri ile varlıklarında her zaman iftihar ettiğim, haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim annem Fazilet PALA ve babam Mustafa PALA'ya,

Saygı ve sevgilerini her fırsatta hissettiğim kardeşlerim Abdulbaki PALA, Samet Sıddık PALA ve kıymetlim Ravza PALA'ya,

Varlıkları ile var olduğum manevi büyüklerime ve dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ v
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
TABLOLAR LİSTESİ ix
ÖZET x
SUMMARY xi

BÖLÜM 1.
GİRİŞ 1
1.1. Amaç ve Hedefler 1
1.2. Kaynak Araştırması 3

BÖLÜM 2.
GENEL BİLGİLER 7
2.1. Optik Mikroskoplar 7
2.1.1. Temel parametreler 10
2.1.1.1. Uzaysal çözünürlük 10
2.1.1.2. Görüntüleme sensörü 12
2.1.1.3. Görüş alanı 13
2.1.1.4. Odaklanma derinliği 13
2.2. Modern Lenssiz Mikroskoplar 14
2.2.1. Genel bilgiler 14
2.2.2. Kontak-mod görüntüleme 16
2.2.2.1. Temel parametreler 16
2.2.2.2. Görüntüleme sensörü 19

2.2.3. Dijital lenssiz holografi 21
2.2.4. Lenssiz floresan görüntüleme 22
2.3. Görüntü Bölütleme 22
2.3.1. Görüntü bölütleme yöntemleri 23
2.3.1.1. Kenar-tabanlı bölütleme 24
2.3.1.2. Eşikleme-tabanlı bölütleme 25
2.3.1.3. Bölge-tabanlı bölütleme 26
2.3.1.4. Kümeleme-tabanlı bölütleme 26
2.3.1.5. Diğer bölütleme yöntemleri 27

BÖLÜM 3.
MATERYAL VE YÖNTEM 28
3.1. Görüntüleme Sisteminin Tasarlanması 28
3.1.1. CMOS sensör 28
3.1.2. LED kaynaklar 30
3.2. Görüntüleme Sisteminin Üretilmesi 34
3.3. Görüntüleme Stratejileri ve Sistemin Kalibrasyonu 35
3.3.1. Kullanılan kalibrasyon lameli 35
3.3.2. Gerçek zamanlı görüntüler ve analizleri 36
3.3.3. Gerçek zamanlı görüntülerin düzeltilmesi 40
3.3.4. Değişken ışımalar elde edilen görüntülerin birleştirilmesi 43
3.4. Kullanılan görüntü bölütleme yöntemi 46
3.4.1. K-means algoritması 47
3.4.2. K-means++ algoritması 50

BÖLÜM 4.
ARAŞTIRMA BULGULARI 51
4.1. Veri Seti 51
4.2. Görüntüleme Sonuçları 51
4.3. Bölütleme Sonuçları 60

BÖLÜM 5.
SONUÇ VE GELECEK ÇALIŞMALAR 63
5.1. Tartışma ve Sonuçlar 63
5.2. Öneriler ve Gelecek Çalışmalar 64
KAYNAKLAR 65
ÖZGEÇMİŞ 72

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

c_i	: Alt küme merkezi
c_i	: En yakın küme merkezi
K_i	: Alt küme sayısı
m_{bkgrnd}	: Arka plan yoğunluğu
m_{img}	: Nesne yoğunluğu
m_j	: Küme merkezi
n_j	: Piksel sayısı
z_1	: Pinhole ile nesne arası mesafe
z_2	: Sensör ile nesne arası mesafe
$\emptyset$	: Boş Küme
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
λ	: Dalga boyu
π	: Pi
σ	: Arka plan varyansı
C	: Kontrast
K	: Görüntü kümesi
n	: Kırılma indisi
θ	: Açısal açıklık
CCD	: Şarj eşleştirmeli yarı iletken
cm	: Santimetre
CMOS	: Tamamlayıcı metal oksit yarı iletken
dB	: Desibel
DIV	: Ölçüm aralığı
DOF	: Odaklanma derinliği

DR	: Dinamik aralık
FF	: Doldurma faktörü
FOV	: Görüş alanı
H	: Yatay
NA	: Nümerik açıklık
RGB	: Kırmızı-yeşil-mavi
ROI	: İlgili hedef bölge
SNR	: Sinyal gürültü oranı
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm^2	: Milimetre kare
mMol	: Milimol
nm	: Nanometre
V	: Dikey
T	: Eşik değeri
W	: Watt

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Tez organizasyon şeması. 3
Şekil 2.1. Hooke tarafından alınmış küf kolonisine ait görüntü. 8
Şekil 2.2. Bilinen ilk mikroskobun genel şeması. 9
Şekil 2.3. Optik mikroskopların görüntüleme prensibi 10
Şekil 2.4. Mikroskop objektif lenslerinde nümerik açı. 11
Şekil 2.5. Lenssiz mikroskopi sistemlerinin görüntüleme prensibi. 16
Şekil 2.6. $z2$ mesafesinin kontrast değerine etkisi. 19
Şekil 2.7. Piksel büyüklüğü ile çözünürlük arasındaki ilişki. 20
Şekil 3.1. Sony IMX219PQ sensör spektral tepki grafiği. 30
Şekil 3.2. Beyaz LED spektrumu. 31
Şekil 3.3. Kımızı LED spektrumu. 32
Şekil 3.4. Yeşil LED spektrumu. 33
Şekil 3.5. Mavi LED spektrumu. 33
Şekil 3.6. Geliştirilen lenssiz görüntüleme sistemi. 35
Şekil 3.7. Kullanılan kalibrasyon lameli. 36
Şekil 3.8. Çizgisel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü. 37
Şekil 3.9. ROI 1 ve çizgisel yoğunluk grafiği. 37
Şekil 3.10. Dairesel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü. 39
Şekil 3.11. ROI 2 ve çizgisel yoğunluk grafiği. 39
Şekil 3.12. a) Beyaz LED arka plan görüntüsü. b) Homojen alan düzeltmesi uygulanmış görüntü. 40
Şekil 3.13. a) Çizgisel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü. b) Homojen alan düzeltmesi uygulanmış görüntü. c) Kübik interpolasyon uygulanmış görüntü. 42
Şekil 3.14. Seçilen ROI 3 ve piksel yoğunluk grafiği. 42
Şekil 3.15. Farklı ışıma ile elde edilen görüntülere uygulanan işlem basamakları. 44

Şekil 3.16. Renk yoğunluklarının birleştirilmesi ve interpolasyon uygulanması sonucu elde edilen RGB görüntü. 45
Şekil 3.17. Seçilen ROI 4 ve piksel yoğunluk grafiği. 45
Şekil 3.18. K-means algoritmasının akış şeması. 49
Şekil 4.1. Doku örneği 1'den elde edilmiş görüntü. 52
Şekil 4.2. ROI 1 görüntüsü 52
Şekil 4.3. ROI 2 görüntüsü 53
Şekil 4.4. ROI 3 ve büyüklükler 53
Şekil 4.5. Çekirdek yapıları ve çizgisel piksel yoğunluk grafiği. 54
Şekil 4.6. Doku örneği 2'den elde edilmiş görüntü. 55
Şekil 4.7. Doku örneği 3'ten elde edilmiş görüntü. 56
Şekil 4.8. Doku örneği 4'den elde edilmiş görüntü. 57
Şekil 4.9. Doku örneği 5'ten elde edilmiş görüntü. 58
Şekil 4.10. Doku örneği 1'e homojen alan düzeltmesi ve interpolasyon uygulanması sonucu elde edilen görüntü. 59
Şekil 4.11. Doku örneği 1'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu. . 61
Şekil 4.12. Doku örneği 2'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu. . 61
Şekil 4.13. Doku örneği 5'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu. . 62

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Sony IMX219PQ sensörün özellikleri 29
Tablo 3.2. Kullanılan LED kaynaklar ve sensör spektral tepkisi 34
Tablo 3.3. Gerçek zamanlı görüntünün ait çizgisel yoğunluk verileri 38
Tablo 3.4. Düzeltilmiş gerçek zamanlı görüntüye ait çizgisel yoğunluk verileri 43
Tablo 3.5. Görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiş yoğunluk verileri 46

LENSSİZ MİKROSKOPİ SİSTEMİNİN TASARLANMASI VE TIBBİ ÖRNEKLER ÜZERİNDE TEST EDİLMESİ

ÖZET

Tıbbi örneklerin görüntülenmesi, klinikte teşhis ve tedavi süreçlerinin yürütülmesinde büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle mikroskopların, medikal alanda geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Günümüzde dahi, optik mikroskopların görüntüleme için uzmanlık gerektiren teknikleri, maliyetleri ve taşınabilir olmamaları gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Yarı iletken teknolojisinin son yıllarda ki gelişmesi, lenssiz mikroskopları mikro boyutta görüntülemede etkili bir yöntem haline getirmiştir. Lenssiz görüntülemenin sunduğu; geniş görüş alanı, yüksek uzaysal çözünürlük, kullanım kolaylığı ve düşük maliyetli olması gibi avantajlar bu yöntemleri medikal alanda önemli hale getirmiştir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında; klinik şartlar için elverişli, düşük maliyetli ve taşınabilir genel amaçlı bir lenssiz mikroskopi sistemi tasarlanmış ve üretilmiştir. Görüntüleme sistemini en iyi duruma getirebilmek için tasarım parametreleri kalibrasyon deneyleri doğrultusunda güncellenmiştir. Bu sayede gömülü bilgisayar yardımı ile tıbbi örneklerin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesine olanak sağlanmıştır. İkinci aşamada; gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntüler bölütlenmiş ve uzmanlara bir karar destek sistemi oluşturulmuştur. Son aşamada; farklı dalga boyuna sahip ışık kaynakları kullanılarak elde edilen görüntüler, tek bir görüntü haline getirilmiş ve böylece tıbbi örneklerden elde edilen görüntülerin kontrast değeri iyileştirilmiştir. Tasarlanan sistem, intraoperatif işlemlerde patolojik dokuların inceleme sürelerini azaltarak, kliniğe önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Lenssiz mikroskopi, kontak mikroskopi, lenssiz görüntüleme, çip-üstü-laboratuvar, görüntü bölütleme, medikal görüntü, dijital patoloji, karar destek sistemleri

DESIGNING LENS-FREE MICROSCOPY SYSTEM AND TESTING ON MEDICAL SAMPLES

SUMMARY

Imaging of medical samples are of great importance in clinical diagnosis and treatment processes. Therefore, microscopes have a wide usage area in medical field. Even today, optical microscopes have various disadvantages such as costs, bulky structure and techniques that require expertise for imaging. The development of semiconductor technology in recent years has made lens-free microscopy an effective method in micro-size imaging. Lens-free imaging has become important in medical field since it has advantages such as wide field of view, high spatial resolution, ease of use and low cost.

In the first step of this study; A general-purpose of lens-free microscopy system was designed and manufactured for low-cost and portable conditions suitable for clinical conditions. In order to optimize the imaging system, the design parameters were updated according to the calibration tests. With the help of the embedded computer, it was possible to display the medical samples in real time. In the second step of this study; images which obtained in real time, were segmented. Therefore, a decision support system was created for the medical experts. Finally, the images obtained using light sources with different wavelengths were combined into a single image. Thus contrast value of the images obtained from the medical samples was improved. The designed system may make a significant contribution to the clinics by decreasing the duration of examination of pathological tissues in intraoperative procedures.

Keywords: Lens-free microscopy, lensless microscopy, shadow imaging, lensless imaging, lab-on-a-chip, image segmentation, medical image, dijital pathology, decision support systems

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Tıbbi örneklerin görüntülenmesi, klinikte teşhis ve tedavi prosedürlerinin uygulamasında ve yürütülmesinde büyük bir öneme sahiptir. Bu amaçla mikro seviyede görüntülemeye olanak sağlayan sistemlerin icadı medikal alanda devrimleri de beraberinde getirmiştir (Göröcs, 2012). Günümüzde birçok gelişmiş mikroskop çeşidi olmasına rağmen optik bileşenlerin karmaşıklığı, düşük uzaysal çözünürlük, küçük görüş alanı, odaklanma derinliği gibi konular optik tabanlı mikroskopların temel problemleridir.

Son yıllarda yarı iletken teknolojisine bağlı olarak gelişen mikro-nano seviyedeki sensörler, medikal alanda çip-üstü-laboratuvar olarak bilinen sistemleri ortaya çıkmasında önemli rol oynamıştır. Bu sistemler, tıbbi örneklerin görüntülenme ve değerlendirme süreçlerine farklı bakış açıları kazandırmıştır.

Karar-destek sistemleri, tıbbi görüntülerin değerlendirme süreçlerinde uzman hatasını en az seviyeye indirmeyi amaçlayan sistemlerdir. Görüntü bölütleme yöntemleri ise düşük-seviyeli işlem adımlarında meydana gelmesinden ötürü bu amaç doğrultusunda literatürde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Ng, 2006).

1.1. Amaç ve Hedefler

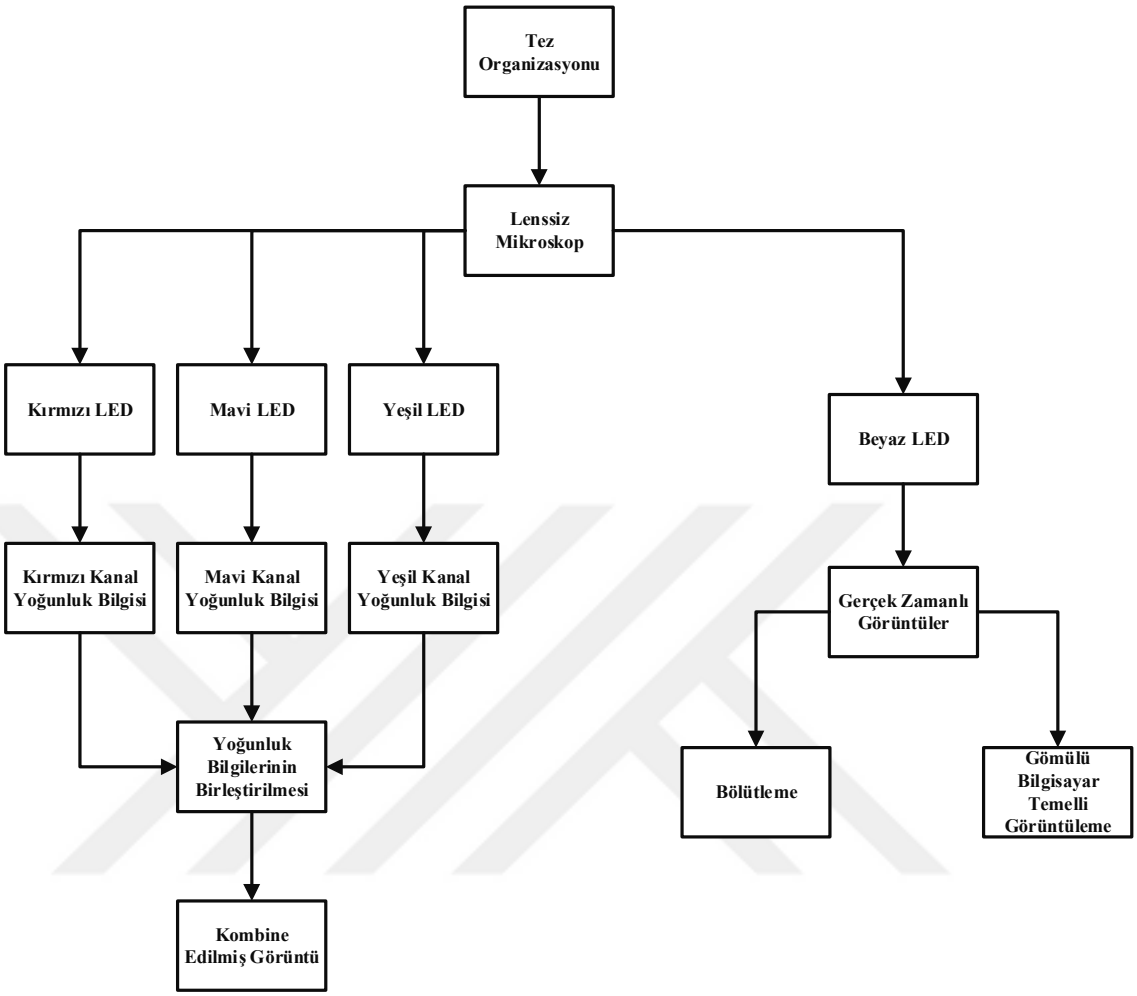
Bu tez çalışması üç ana bölümden meydana gelmektedir. İlk amaç olarak; mikro boyutta görüntülemeye olanak sağlayabilecek maliyet, entegrasyon, görüş alanı gibi parametreleri optimize edilmiş özgün bir lenssiz mikroskop tasarlamak ve kalibrasyon deneyleri neticesinde üretmektir. İkincil olarak; gerçek zamanlı olarak görüntü elde edilmesini sağlamak ve farklı dalga boylarından alınmış görüntüleri kombine ederek farklı görüntüleme stratejileri oluşturmaktır ve stratejilerin başarısını muhtelif doku örnekleri ile ortaya koymaktır. Son olarak; gerçek zamanlı olarak elde edilmiş muhtelif doku

görüntülerini hızlı ve efektif şekilde çalışabilen görüntü bölütleme algoritmasıyla sınıflandırmaktır. Bölütleme işleminde temel prensip, patolojik incelemelerde önemli bir işlem olan boyama yöntemlerinden kaynaklı renk yoğunluk bilgilerini ayrı kümelerde toplayan bir karar-destek sistemi oluşturmaktır

Bu amaçlar doğrultusunda aşağıdaki spesifik hedefler belirlenmiştir:

1. Literatürde yer alan çalışmalar ışığında tıbbi örneklerin görüntülenmesine olanak sağlayan, hızlı ve parametreleri optimize edilmiş lenssiz mikroskobun tasarlanması ve kalibrasyon deneyleri ile güncellenip üretilmesi.
2. Üretilen lenssiz mikroskopi sistemiyle, tıbbi örneklerden maksimum bilgiyi elde edebilecek farklı görüntüleme stratejileri kullanmak ve başarılarını göstermek.
3. Tıbbi örneklerden maksimum bilgiyi elde etme hedefi ile farklı dalga boyuna sahip ışımalar altında elde edilen görüntüleri tek bir renkli görüntü içerisinde birleştirmek.
4. Uzmanların kolaylıkla kullanabileceği, hızlı, efektif ve amaca uygun çıktılar üreten bir karar-destek sistemi oluşturmaktır.

Şekil 1.1.'de tez çalışmasının organizasyon şeması verilmiştir.



Şekil 1.1. Tez organizasyon şeması.

1.2. Kaynak Araştırması

Tezin bu bölümünde lenssiz mikroskoplar ile yapılan çalışmalar ve patolojik örneklerin bölütlemesi ile ilgili çalışmalar hakkında literatür taramasına yer verilmiştir. Çalışmalar içerisinde kullanılan parametreler ve materyaller göz önünde bulundurularak, çalışma içerisindeki lenssiz görüntüleme sistemi üretilmiştir.

Fang ve ark., 1,67 µm piksel büyüklüğüne sahip CMOS sensör ve beyaz LED yardımı ile beyaz kan hücrelerini sınıflandırmışlardır. Kan örneklerine seyreltme yöntemleri uygulayarak, hücrelerin eş gölge oluşturmalarını engellemişlerdir. Hücre büyüklüklerini ve kenarların açısal özelliklerini kullanarak nötrofil, monosit ve lenfosit hücrelerinin

ayrımını yapmışlardır. Altın standart olan hemogram ile çalışmalarını kıyaslayıp, sınıflandırma hatalarını nötrofil için % 3,45, monosit için % 6,04 ve lenfosit için % 6,7 elde etmişlerdir (Fang, 2017).

Kwak ve ark., faklı türdeki bakteri kültürlerinin yoğunluk miktarını belirlemek amacıyla; 625 nm, 525 nm ve 470 nm tepe değerlerine sahip LED kaynakların 9 farklı kombinasyonunu örnek plakaları üzerine uygulamışlardır. Bakterilere ait kolorimetri değerlerinin değişiklikleri ile sonuca gitmişlerdir. Altın standart olarak kullanılan spektrofotometri cihazı ile sonuçları karşılaştırmışlar ve yeşil ve mavi ışımaların sıralı olarak uygulandığı sayımdan 0.981 korelasyon değerini elde etmişlerdir (Kwak, 2014).

Jeong ve ark., çeşitli diyatome türlerinin ölü ve canlı ayrımının lenssiz kontak mod görüntüleme ile mümkün olduğunu ispatlamışlardır. 2,2 µm piksel büyüklüğüne sahip tek renkli CMOS sensörü kullanmışlardır. Diyatomların türlerin tespiti ve canlı-ölü ayrımı için her bir diyatomenin morfolojinin, sinyal görüntü oranının ve gölge çapının yeterli olduğunu göstermişlerdir (Jeong, 2014).

Roy ve ark., beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin sınıflandırılması ve sayılması için tek renkli CMOS sensörü, 470 nm LED ve 300 µm büyüklüğünde pinhole yadımı ile kurdukları sistemde, 100x mikroskoptan 25 kat daha büyük bir görüş alanını incelemişlerdir. Hücre türlerini ayırabilmek amacıyla her bir hücrenin maksimum piksel değerini, merkez pikselin maksimum değerini ve yoğunluk bilgisinin tepeden tepeye olan değerini ölçerek hücreleri sınıflandırmışlardır. Sınıflandırma başarısını hemogram cihazından elde edilen sonuçlar ile kıyaslamışlardır. Kırmızı kan hücreleri için 0,878, beyaz kan hücreleri için ise 0,927 korelasyon değerine ulaşmışlardır. Ayrıca beyaz kan hücrelerinin türleri olan nötrofil, monosit ve lenfosit için ortalama korelasyon değerini 0,988 olarak bulmuşlardır (Roy, 2014).

Seo ve ark., on üç farklı memeliye ait hücre kültürü üzerine yaptıkları çalışmada her bir hücre kültürüne ait hücrelerin sayılarını ve canlı-ölü ayrımını lenssiz mikroskoplar ile başarılı bir şekilde yapılabileceğini göstermişlerdir Hücre canlılığı çalışmalarında ayırıcı bir kimyasal kullanmamaları çalışmanın önemli bir ayrıntısıdır. LSIT algoritması ile

yaptıkları deney sonuçlarını, altın standartlar ile elde ettikleri sonuçlarla kıyaslayıp %3,27 hata oranı elde etmişlerdir (Seo, 2018).

Li ve ark, hücre toksititesinin tespiti için kullanılan tetrazolyum çözeltilerinin lenssiz mikroskopi sistemlerinde de başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ispatlamışlardır. Hücre kültürlerinde canlı ve ölü hücreleri karakterize edebilmek amacıyla hücrelere ait görüntülerin iki farklı dispersiyon değerlerini hesaplamışlardır. Elde ettikleri sonuçları Bland-Altman yöntemi ile kıyaslayarak, 0,9837 korelasyon değerini elde etmişlerdir (Li, 2018).

Chang ve ark., biyolojik hücrelerin gerçek zamanlı olarak kültüre edilmesinin ve sitotoksisite testlerinin yapılmasının lenssiz mikroskoplarla mümkün olduğunu göstermişlerdir. Dört farklı sensör ile, HepG2 kanser hücresinin fizibilitesini; 5000, 10000, 20000 ve 40000 hücre/mL konsantrasyonda test etmişler. Süreçleri aynı zamanda 40x lense sahip mikroskop ile belirli periyotlarda kontrol etmişlerdir. 48 saat süren deneylerin her 60 dakikasında hücre bölünme oranını ortalama olarak %48,8 olarak kaydetmişlerdir. Sitotoksisite değerlerini ölçmek için; 20000 hücre/mL yoğunluktaki HepG2 hücrelerini, belirli aralıklarda 8, 16, 32 mMol siklofosfamid çözeltisi ile tedavi etmişlerdir. Bu deneyler neticesinde 32 mMol olarak uygulanan siklofosfamid çözeltisinin, hücre bölünmesini engellendiği gösterilmiştir (Chang, 2015).

Zheng vd., literatürde kontak lenssiz mikroskopi metodunu hücre tabanlı kullanan ilk gruplardan birisidir. Petri kapı üzerinde hücrelerin gerek gerçek zamanlı gerekse belirli aralıklarda takibini göstermişlerdir. 6 mm x 4 mm büyüklüğünde CMOS sensor, 660 nm dalga boyunda LED kullanarak kurdukları sistemi inkübatör içerisine yerleştirmişlerdir ve HELA hücrelerinin gelişimini takip etmişleridir. Sistem sayesinde, floresan görüntüleme yapmadan petri kabından bilgi edinilmesini, tüm petri kabının aynı anda görüntülenmesini ve inkübe edilen hücrelerin gerçek zamanlı olarak takip edilebileceğini göstermişlerdir (Zheng, 2013).

Lange ve ark., mikro kanallara entegre ettikleri lenssiz mikroskop ile kanallar içerisinden geçen partikülleri gerçek zamanlı olarak görüntülemeyi başarmışlardır. 4 µL sıvı akış seviyesine sahip mikro kanallardan geçirdikleri iplik kurtçuklarının, ortam ısılarını ve hareket kabiliyetlerine ait frekansları hesaplamışlardır. Tasarladıkları sistemden elde ettikleri sonuçları diğer ölçüm yöntemleri ile kıyaslayıp yüksek oranda korelasyon değeri elde etmişlerdir (Lange, 2005).

Kim ve ark., kan örneklerine ait hemoglobin seviyesini lenssiz kontak görüntüleme yöntemini kullanarak %1,88 hata oranı ile ölçmeyi başarmışlardır. Kan örneklerini, 3 farklı dalga boyunda LED kaynaklar ile aydınlatmış ve düşen ışınların her bir dalga boyu için yoğunluğunu hesaplamışlardır. Elde edilen en iyi korelasyon değerini mavi LED ile aydınlatılan örneklerden elde etmişlerdir (Kim, 2011).

Morel ve ark., doku örneklerini holografik lenssiz mikroskoplar ile görüntülemişlerdir. 3 farklı LED ışıma altında aldıkları hologram verilerine rekonstrüksiyon metotları uygulayarak, dokuların renkli görüntülerini başarılı bir şekilde elde etmişlerdir. Çeşitli matematiksel yöntemlerle mikron altı görüntülemeye olanak sağlamışlardır. Geliştirdikleri holografik rekonstrüksiyon algoritması; hız ve görüş alanı bakımından literatüre katkı sağlamıştır (Morel, 2015)

.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

Biyolojik araştırmalar ve klinik teşhis için mikro boyutta görüntüleme yapabilmek önemli bir süreçtir. Bu amaç için kullanılan optik mikroskopların birçok çeşidi araştırmacılar ve uzmanlar tarafından yıllardır kullanılmaktadır. Fakat icat edildiği 16. yüzyıldan bugüne kadar, dayandığı fizik kuralları kısıtlamalarından dolayı tasarımında değişiklikler görülse bile temel itibari ile kayda değer bir gelişme gösterememiştir. Küçük görüş alanı, düşük uzaysal çözünürlük, hantal yapısı ve yüksek maliyeti gibi sebepler araştırma ve klinik faaliyetlerin ilerlemesi ve hızlanması için hala aşılması gereken problemlerdir.

Günümüzde, yarı iletken ve üretim teknolojilerinin gelişmesi, sağlık alanında çeşitli fırsatları da beraberinde getirmiştir. Bu teknolojiler tıbbi örneklerin görüntüleme süreçlerinde de önemli yeniliklere yol açmıştır. Görüntüleme süreçlerinde; uzmanlara yeni bakış açısı kazandırmış ve ayrıca diğer yöntemlere kıyasla hızlı, güvenilir ve düşük maliyetli olmaları sebepleriyle tercih edilir duruma gelmişlerdir.

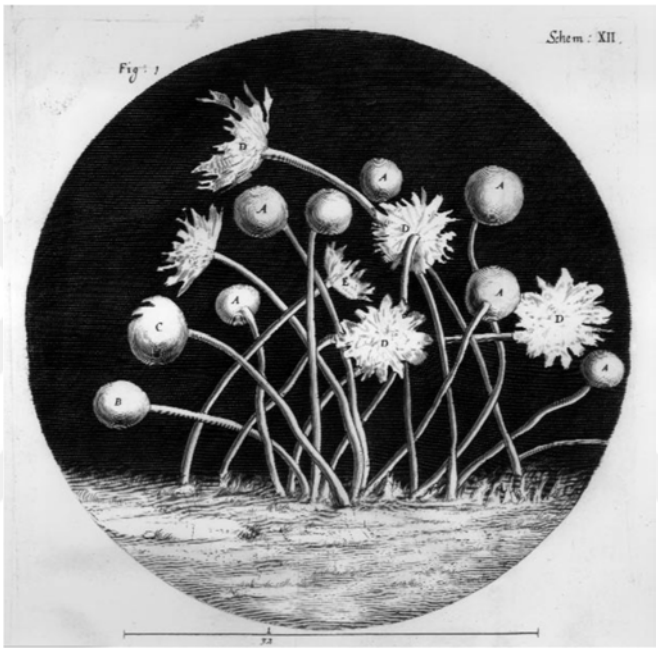
Bu bölümde biyolojik araştırmalar ve klinikte kullanılan optik mikroskopların temel prensiplerinden ve önemli parametrelerinden bahsedilecektir. Devamında ise bu tez çalışmasında amaçlanan lenssiz mikroskopların yapısından ve çeşitlerinden bahsedilecektir.

2.1. Optik Mikroskoplar

Optik mikroskoplar, gözle görülemeyecek kadar küçük olan objeleri optik bileşenler yardımıyla gözle görülebilecek duruma getiren enstrümanlardır. Geniş kullanım alanına sahip mikroskoplar, Robert Hooke' un 1665 yılında İngiltere'de yayınlanan Mikrografi isimli kitapta çeşitli kolonilere ait yapıları gözlemlemesi ile tıbbi alanda kullanılmaya başlamıştır. Yine yakın bir tarihte Hollandalı bilim insanı Antonie Van Leeuwenhoek,

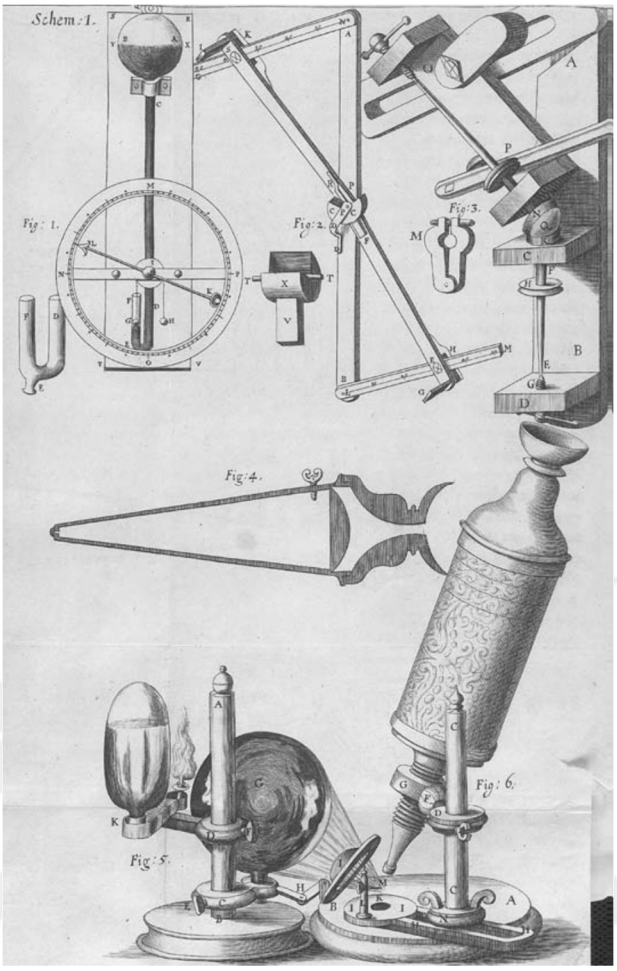
bakteri kültürü, sperm hücreleri ve birçok çeşitli mikro boyutta ki organizmayı lens bileşenlerinden meydana gelen mikroskop ile görüntülemeyi başarmıştır. Mikro seviyede görüntülemeye olanak sağlayan bu yöntemler, tıbbi alanda önemli yenilikleri beraberinde getirmiştir (Gest, 2004).

Şekil 2.1.'de Robert Hooke tarafından alınmış küf kolonisine ait görüntü verilmiştir. Ölçü birimi 1/32 inç boyutundadır.



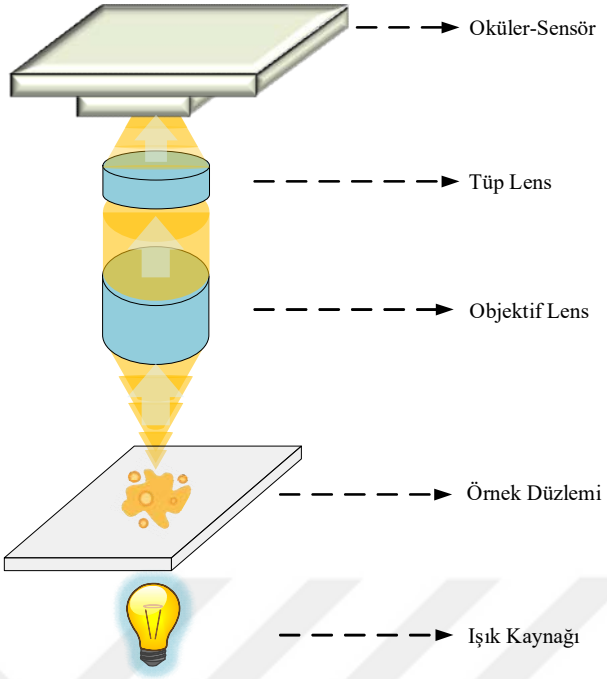
Şekil 2.1. Hooke tarafından alınmış küf kolonisine ait görüntü (Hooke, 1665).

Şekil 2.2.'de Hooke tarafından tasarlanan mikroskobun genel yapısı verilmiştir. Bu yapı; oküler, tabla, ayar bilyeleri ve çeşitli büyüklüklerde yakınlaştırma olanak sağlayan değiştirilebilir objektiflerden meydana gelmektedir. Son yıllarda optik ve üretim teknolojilerindeki gelişim, optik mikroskoplar ile elde edilen görüntülerin çözünürlüğünün artmasına olanak sağlamıştır. Fakat optik mikroskopların temel aldığı görüntüleme ilkesi aynı kalmıştır.



Şekil 2.2. Bilinen ilk mikroskobun genel şeması (Gest, 2009).

Optik mikroskoplar ile görüntü elde edilirken Şekil 2.3.'de gösterilen yöntem esas alınır. Genel olarak optik mikroskoplar; ışık kaynağı, objektif lensler, görüntüleme sensörü veya oküler bileşenlerden meydana gelir. Düzlem üzerine yerleştirilen tıbbi örnekler homojen yayılım yapan ışık kaynağıyla aydınlatılıp, görüntüleri oküler üzerinden taşınır. Işık kaynağından yayılan fotonlar, örnek tarafından belirli oranlarda absorbe edilmesi, kırılması ve saçılması olaylarının ardından oküler kısmına ulaşır. 3 düzlemde hareket edebilen tabla yapısı; örnek üzerinde görüntülenmek istenilen alanın ve odaklanma derinliğinin ayarlanmasına olanak sağlar. Oküler kısmına odaklanmış objektif lensler, örnek düzleminden toplanan fotonları görsel bir yapıya getirir. Optik mikroskoplarda en önemli yapı; ışınların toplanıldığı ve büyütme işleminin gerçekleştirildiği objektif lens kısmıdır. Bu yapıların özellikleri, çalışmanın devam eden kısımlarında bahsedilecek nümerik açıklık (NA) ifadesi ile belirlenir.



Şekil 2.3. Optik mikroskopların görüntüleme prensibi.

2.1.1. Temel parametreler

Optik mikroskoplar ile istenilen görüntüyü elde etmek birçok değerin birbirleri ile uyum içerisinde olmasını gerektirir. Uzaysal çözünürlük, görüş alanı, odaklanma derinliği ve görüntüleme sensörü bu uyumun en temel parametreleridir. Bölüm içerisinde bu parametreler ve birbirleri ile olan ilişkileri ele alınacaktır.

2.1.1.1. Uzaysal çözünürlük

Mikroskoplarda uzaysal çözünürlük, görüntülenmek istenilen örneklerdeki detayları birbirinden ayırabilme kabiliyetidir. Mikroskoplarda bu kabiliyet, ışığın objektif lenslerde kırınım oranı ile belirlenir. Bu oran; örnek düzlemindeki eş merkezli kırınım halkalarının, görüntü içerisinde merkezi bir noktada toplanmasıyla belirlenir. Bu nokta şeklinde olan kırınım ışınlarına Airy lekesi ismi verilir.

Mikroskopi sistemlerinde uzaysal çözünürlük, iki farklı Airy lekesinin ayırt edilebilen en küçük mesafesi ile belirlenir. Bu mesafe objektif lenslerin nümerik açıklık değeriyle

doğrudan ilişkilidir. Nümerik açıklık ile uzaysal çözünürlük arasındaki ilişkiyi tanımlayan Abbe çözünürlük ölçütü Denklem (2.1)'de gösterilmiştir (Silfies, 2016).

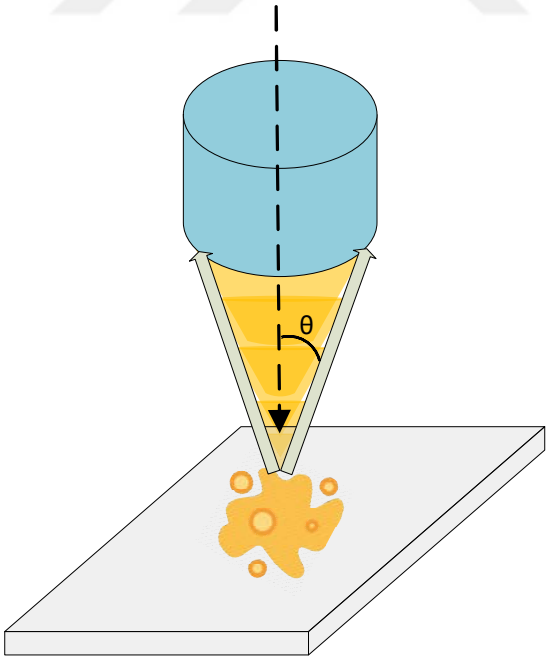
$$Abbe\ \text{Çözünürlüğü} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \tag{2.1}$$

Denklem (2.1)'de, λ nanometre cinsinden dalga boyunu, NA ise numerik açıklığı ifade etmektedir. Denklem (2.2)'de ise nümerik açıklık formüle edilmiştir.

$$NA = n \cdot sin\theta \tag{2.2}$$

Nümerik açıklık formülünde n ifadesi örnek yüzeyi ile objektif lens arasındaki kırılması indisi, θ açısı ise objektif lensin açısal açıklığının yarısıdır.

Şekil 2.4.'te optik mikroskopların lenslerine ait nümerik açı hesaplama parametreleri gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Mikroskop objektif lenslerinde nümerik açı.

Rayleigh, 1896 yılında bahsedilen çözünürlük ilkesini ve eşitliklerini daha nicel bir yöntem ile tanımlamıştır (Ram, 2006). Rayleigh ilkesine göre; eğer bir Airy lekesinin merkezi diğer bir Airy lekesinin ilk minimum noktası ile çakışır ise bu iki Airy lekesi mikroskop tarafından çözülmüş olarak kabul edilir. Bu çözünürlük ilkesi Denklem (2.3)'te verildiği gibi hesaplanır.

$$Rayleigh\ \text{Çözünürlüğü} = \frac{0{,}61 \cdot \lambda}{NA} \tag{2.3}$$

Rayleigh çözünürlük denkleminde bulunan değişkenler Fraunhofer dairesel kırınım modelinden, 0,61 sabit çarpanı ise Fraunhofer kırınım modelinin Bessel fonksiyonunun ilk sıfırından gelmektedir.

Eşitlikler göz önünde bulundurulduğunda, optik mikroskoplarda objektif lensler alçak geçirgen fitreler gibi davranmaktadır. Filtre kesim frekansları ise numerik açıklık değerleri ile belirlenmektedir. Objektiflerin bu davranışı uzaysal çözünürlüğü sınırlandırmaktadır. Kesim frekansının üstünde kalan alanların görüntülenmesine olanak sağlamamaktadır. Örnek ile ifade edilecek olursa 550 nm dalga boyuna sahip ışıma altında 0,4 NA değerine sahip 20x objektif lensin çözünürlük limiti 850 nm, 240 nm dalga boyuna sahip ışıma altında 1,4 nümerik açıklığı sahip 100x objektifin çözünürlük limiti ise 240 nm olacaktır.

2.1.1.2. Görüntüleme sensörü

Mikroskopların sağladığı çözünürlük kapasitelerini görüntüleme sensörleri ile bilgi kaybı olmadan dijital olarak toplayabilmek için görüntüleme sensörlerinin yeteri kadar uzaysal çözünürlüğü sağlaması gerekmektedir. Nyquist örnekleme teoremine göre; amaçlanan Airy lekelerinin görüntülenmesinde, sensöre ait piksel büyüklüğünün en az iki tane Airy lekesine tekabül etmesi gerekmektedir. Sadece bu şart sağlandığında mikroskoplardan elde edilen görüntünün çözünürlüğü, sensörde bilgi kaybı olmadan dijital ortama aktarılabilir (Sluder, 2007).

Eğer sensörün piksel büyüklüğü büyük olursa, mikroskopun topladığı görüntüler ile dijital ortama aktarılan görüntüler arasında örtüşme problemi ortaya çıkacaktır. Diğer taraftan piksel boyutunun küçük olması bu örtüşme problemini ortadan kaldırsa da dijital görüntüdeki sinyal gürültü oranını olumsuz olarak etkileyecektir (Sluder, 2007). Örneklem yapılacak olursa, 850 nm çözünürlük limitine sahip 20x objektif lensten elde edilecek Airy lekelerinin boyutu 17 µm olabilir. Bu Airy lekeleri dijital olarak edilmek istenirse, görüntüleme sensöre ait piksel boyutu 8,5 µm boyutundan küçük olmalıdır.

2.1.1.3. Görüş alanı

Mikroskopi sistemlerinde görüş alanı (FOV), objektif lenslerin örnek düzleminden topladığı görüntülerin milimetre cinsinden alanıdır. Görüş alanı, objektiflerde bulunan merceklerin diyafram açıklıkları ile belirlenir. Diyafram açıklıklarının nümerik açıklığa etkisi göz önünde bulundurulduğunda, mikroskopların uzaysal çözünürlüğü ile görüş alanları arasında ters orantı mevcuttur. Objektif lensler içerisinde bulunan merceklerin açısal değişiklikleri, örnek düzleminden alınan görüntünün alanının küçülmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple mikroskoplarda uzaysal çözünürlük ile görüş alanı arasında ters bir orantı mevcuttur (Huszka, 2018).

2.1.1.4. Odaklanma derinliği (DOF)

Mikroskopi sistemlerinde bir diğer önemli parametre ise odaklanma derinliğidir (DOF). Odaklanma derinliği, objektif lenslerin örnek düzleminin dikey düzlemde çözme gücüdür. Odaklanma derinliği terimini önceki bölümlerde ifade edilen parametreler ile ifade etmek gerekirse, 0,5 NA değerine sahip 20x objektif lense sahip mikroskoplarda görüş alanı 1,1 mm, alan derinliği ise 3 µm seviyesindedir. Günümüzde patolojik analizler için kullanılan mikroskoplardan örnek vermek gerekirse; görüntülenmek istenilen patolojik örneklerinin boyutu yaklaşık olarak 1,5 cm x 1,5 cm civarındadır ve 0,5 µm çözünürlükte uygun odaklanma derinliğinde ölçüm yapılması istenmektedir (Swamy, 2019). Fakat bu boyutta ki bir örneğin tek seferde görüntülenmesi mümkün değildir.

Yukarıda bahsedilen parametreler göz önünde bulundurulduğunda; optik mikroskopi sistemleri objektif lensler çevresinde kurgulanan işlemlerden meydana gelmektedir. Bu nedenle objektif lensler sürekli olarak yüksek NA ve yüksek çözünürlük değerlerine ulaşmak için yapısal olarak kompleks hale gelen değişim ve gelişim içerisindedir (Bennett, 1943). Fakat optik fiziğinde yeni yöntemler ortaya çıkmadığı müddetçe optik mikroskopların gelişimi yapısal olarak aynı kalmaya devam edecektir.

Optik mikroskopların tüm bu dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda, mikro boyutta görüntüleme yapabilmek için farklı sistemlere ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılabilir. Bundan sonraki bölümlerde, bu problemleri çözmek amacı ile ortaya çıkan, günümüzde geniş kullanım alanına sahip olan lenssiz mikroskoplardan bahsedilecektir.

2.2. Modern Lenssiz Mikroskoplar

Bir önceki bölümde optik mikroskopların tasarımları ve görüntü oluşumunda önemli rol oynayan parametreler ile ilgili bilgiler verildi. Genel bir bakış açısı çerçevesinde avantajları ve dezavantajları değerlendirildi. Bu bölümde son yıllarda büyük gelişme kaydeden, düşük maliyetli ve entegre olabilen çip-üstü-laboratuvar sistemlerinin bir alt konusu olan lenssiz mikroskoplardan bahsedilecektir. Devam eden bölümlerde lenssiz görüntüleme çeşitleri ve çalışmanın genel konusunu oluşturan kontak-mod lenssiz mikroskoplardan detaylı olarak bahsedilecektir.

2.2.1. Genel bilgiler

Son yıllarda yarı iletken teknolojisine bağlı olarak gelişen mikro-nano seviyedeki sensörler, sağlık alanında çip-üstü-laboratuvar olarak bilinen sistemleri ortaya çıkarmıştır. Görüntüleme alanında devrim niteliği taşıyan bu sistemlerin mikro seviyede görüntülemeyi basit materyaller kullanarak sağladığı birçok çalışmada başarılı bir şekilde gösterilmiştir (Mudanyali, 2009). Lenssiz mikroskopi sistemlerinin, optik mikroskopi sistemlerine kıyasla görüntü elde etme yöntemi oldukça basittir.

Lenssiz çip-üstü-laboratuvar sistemleri ile görüntüleme temel olarak; uygun ışık şartları altında, örneklerin oluşturduğu gölgeleri görüntüleme sensörü yardımıyla toplanılmasıyla gerçekleşir. Bu amaç için görüntüleme sensörü olarak şarj eşleştirmeli yarı iletkenler (CCD) veya tamamlayıcı metal oksit yarı iletkenler (CMOS) kullanılabilir (Greenbaum, 2012). Fakat yapılarının uygunlukları gereği CMOS sensörler bu yöntem için daha uygundur. Görüntüleme sensörleri, optik mikroskoplarda nümerik açıklık değerinin sebep olduğu negatif yönleri ortadan kaldırmaktadır.

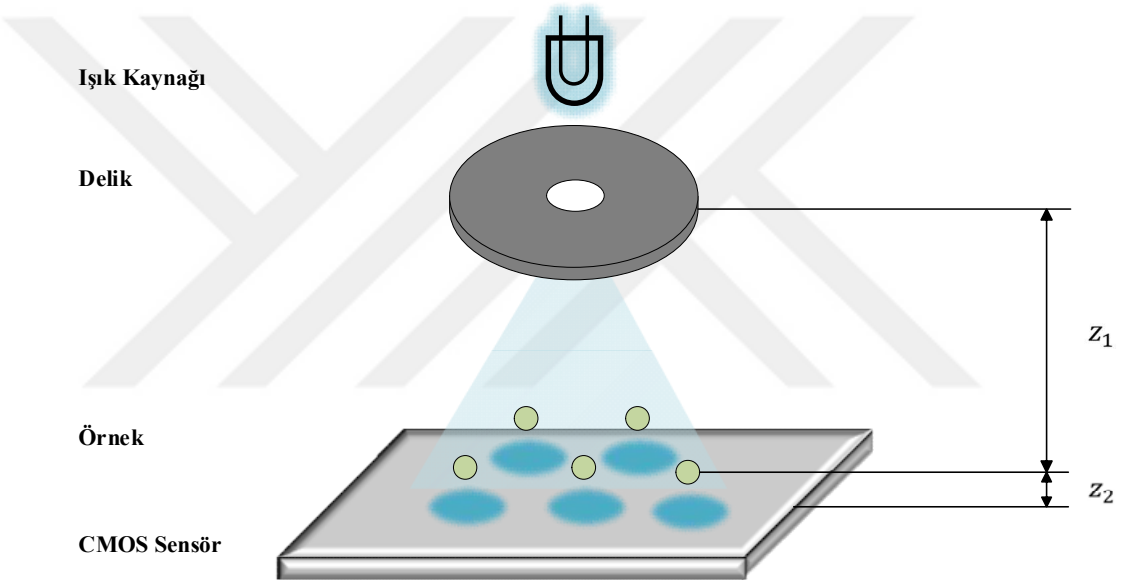
Lenssiz mikro seviyede görüntüleme sistemleri kullanılarak çeşitli yöntemler ile görüntü elde edilebilir. Bu yöntemler; kontak-mod görüntüleme, holografik görüntüleme, floresan görüntüleme ve tomografik olarak alt gruplara ayrılabilir (Wu, 2018). İlk grup olan kontak-mod görüntüleme yönteminde, örnek düzlemi ile sensör düzlemi arasındaki mesafe minimum olması gerekmektedir. Bu sistemlerde örnek düzlemi ile sensör düzleminin arasındaki mesafenin 1 μm seviyesinde olması istenir. Bu mesafe, örnek düzleminden geçen ışınların efektif ve daha az gürültüye maruz kalacak şekilde sensör düzleminin aktif bölgesi üzerinden bilgilerin toplanılması için gereklidir. Görüntüleme sensörü üzerinden toplanılan yoğunluk bilgileri, örnek düzleminin 2 boyutlu görüntüsüdür.

Lenssiz mikroskopi sistemleri için diğer önemli parametre ise kullanılan sensörlerin piksel büyüklüğüdür. Sensöre ait piksel boyutu ne kadar küçük olursa görüntülenecek örnekten o kadar çok bilgi elde edilir. Lenssiz mikroskoplarda görüş alanı görüntüleme sensörünün aktif piksel bölgesi ile aynı boyuttadır. Kontak-mod görüntüleme yönteminde, piksel kaynaklı gürültüleri azaltmak için sıvı örnekleri mikro kanallardan geçirmek gibi yöntemler kullanılabilir (Cui, 2008).

İkinci yöntem olan dijital holografik görüntüleme yönteminde, sensör ile elde edilen yoğunluk bilgilerinde bulunan kısmı dalgalanmalar hesaplanıp, devamında dalga yapıların kaldırılması işlemleri yapılır. Kontak-mod görüntüleme metodunun aksine dijital holografi yönteminde, örnek düzlemi arasındaki mesafe ile sensör düzlemi arasındaki mesafe değiştirilebilir ve matematiksel olarak görüntü mesafeye göre yeniden yapılandırılabilir.

2.2.2. Kontak-mod görüntüleme

Kontak-mod mikroskopi sistemleri, tıbbi örneklerin mikro boyutta görüntülenmesi için minyatüre edilmiş, yüksek işlem gücü gerektirmeyen sistemlerdir. Genel olarak CMOS görüntüleme sensörü ve koherent olmayan ışık kaynağı kullanılır. Görüntü; pinhole içerisinden geçirilmiş ışınların, örnek düzleminden geçerek görüntüleme sensörü üzerine düşmesiyle oluşur. Bu yöntem, örnek düzleminin sensör düzlemine yakınlığından dolayı kontak-mod mikroskopi ismi ile anılmaktadır. Sistemin genel yapısı Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Lenssiz mikroskopi sistemlerinin görüntüleme prensibi.

2.2.2.1. Temel parametreler

Kontak-mod lenssiz mikroskopi sistemleri, uzaysal çözünürlük bakımından optik mikroskopların çözünürlük seviyesine ulaşamasa da, optik mikroskopların sahip olduğu çeşitli dezavantajların üstesinden gelmek için oldukça kullanışlı ve avantajlı bir yöntemdir (Göröcs, 2012). Kontak-mod mikroskopide, örnek düzlemi ile sensör düzlemi arasındaki mesafe çok düşük olmasından dolayı odaklanma derinliği ve görüş alanı gibi parametreler sabittir.

Kontak-mod görüntüleme sistemlerinde, örnek üzerine düşürülen ışınların eğik açılar ile geldiği durumlarda %50, dik açı ile düşen ışınları ise %100 oranında toplanabilir (Görücs, 2013). Işınların dik açı ile geldiği durumda örnek düzlemini kapsayan 2π genişliğindeki alan kapsanır. Bu nedenle lenssiz mikroskopide görüş alanı, kullanılan sensörün aktif piksel bölgesinin alanına eşittir.

Görüntüleme sistemlerinde önemli diğer bir parametre ise sinyal gürültü oranıdır. Kontak-mod görüntüleme sistemlerinde bu oran kullanılan sensör çeşidiyle 35 dB oranına kadar iyileştirilebilir (Salama, 2004). Bu iyileştirme, görüntüleme yapılırken aydınlık olan nesnelerden gelen zayıf sinyallerin daha iyi toplanabileceğini göstermekle beraber, düşük ışık altındaki karanlık nesnelerin görüntülenmesine olanak sağlamaktadır.

Kontak-mod lenssiz mikroskopi yönteminde, ışık kaynağının koherent olmayan bir kaynaktan sağlanması en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu amaç için ışık yayan diyotlar (LED) kullanılır. Kullanılan LED kaynağın örnek düzlemini homojen bir şekilde aydınlatması önemli bir husustur. Eğer kullanılan LED kaynak örnek düzlemi üzerinde homojen olmayan bir dağılım sergilerse, CMOS sensörü ile toplanılan yoğunluklarda bilgilerinde bozukluklar meydana gelecektir ve gölge oluşumu doğru bir şekilde gerçekleşmeyecektir.

Dikkat edilmesi gereken diğer önemli parametre ise Şekil 2.5.'te gösterilen z_1 ve z_2 mesafeleridir. Kontak-mod mikroskopide örnek düzleminin sensör düzlemine olabildiğince yakın olması arzulanmaktadır. İdeal olarak bu mesafe 1µm seviyesindedir. Ayrıca ışık kaynağının örnek düzleminin tamamına homojen olarak düşmesi gerekmektedir. Bu amaç için $z_2 \ll z_1$ mesafesinin sağlanması gerekmektedir. Görüş alanı kullanılan sensörün özelliklerine göre değişkenlik gösterip bu değer genel olarak 10-30 cm^2 büyüklüğündedir. Pinhole çapının seçimi için, z_1 mesafesinin seçimi önemlidir. z_1 Mesafesinin kısalması, daha büyük çap değerine sahip pinhole, z_1 mesafesinin büyümesi ise daha küçük çapa sahip bir pinhole seçilmesini gerektirir

Optik mikroskoplarda Rayleigh çözünürlüğü ile tanımlanan minimum çözünürlük kriterleri, lenssiz mikropların çalışma prensibi dalga boyuna (λ) bağlı olmadığı için

tanımlanamaz. Kontak-mod görüntüleme sistemlerinde çözünürlük, z_2 mesafesine ve kullanılan CMOS sensörün piksel büyüklüğüne doğrudan bağlı olduğu için CMOS sensörün özellikleri ve kurulan deney düzeneğinin mesafe ölçütleri ile doğrudan ilişkilidir.

Kontak mikroskopi için görüntü kalitesi deneysel ve simülasyon sonuçları çerçevesinde Denklem (2.4)' te tanımlanan kontrast değeri ile belirlenir (Ji, 2007).

$$C = \left(\frac{m_{img} - m_{bkgrnd}}{\sigma}\right)^2 \tag{2.4}$$

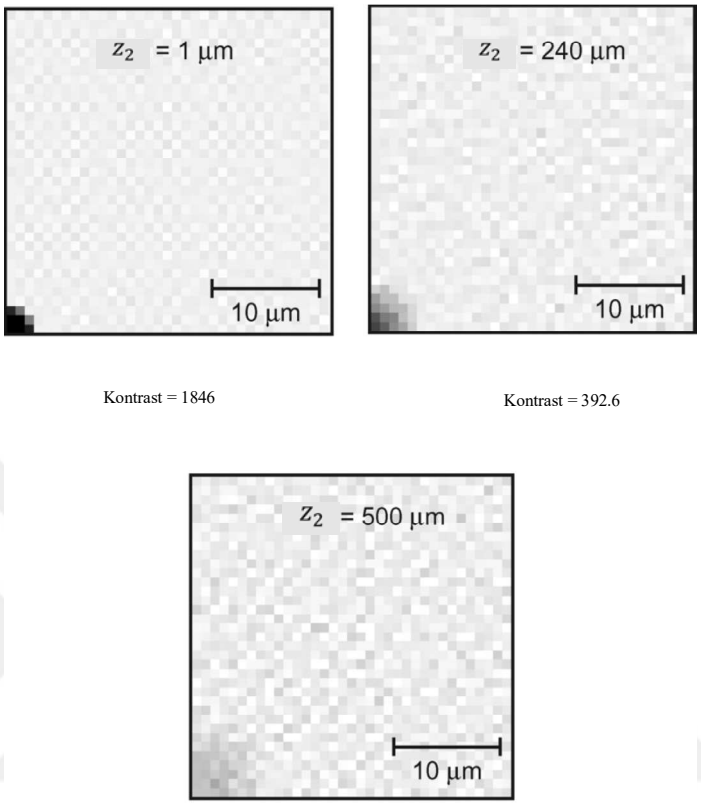
Denklem (2.4)'de, C kontrast değeri, m_{img} nesne görüntüsünün ortalama değeri, m_{bkgrnd} arka plan görüntüsünün ortalama değeri, σ ise arka planın varyans değeridir. Kontrast değerinin lenssiz kontak mikroskopide bu şekilde seçilmesinin nedeni ayırt edilebilir yoğunluklarının sayısını ifade ediyor olmasıdır. Kontrast değerinin birden küçük olması, sensör üzerinden algılanan sinyallerin arka plan gürültüsünden daha düşük olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca lenssiz kontak mikroskoplarda hassasiyet, sensör üzerinden alınabilen minimum sinyal seviyesine eşittir. Bu sinyal seviyesi sıfırlama ve okuma gürültüsüne bağlı olduğu kadar üretim kusurlarından da etkilenir. Kontrast değerinin maksimum değeri, CMOS sensörlerinin süreçlerinde hesaplanan dinamik aralık (DR) değerinin karesine eşittir (Ji, 2007). Şekil 2.6.'da farklı mesafelerde elde edilmiş kontrast değeri için kullanılan simülasyon sonuçları verilmiştir.

Lenssiz kontak mikroskopi de kontrast (C) değeri Şekil 2.5.'te gösterilen görüntülenecek nesne ile sensör arasında ki mesafeye bağlıdır ve Denklem (2.5)'te bu bağıntı ifade edilmiştir.

$$f(z_2) = \frac{\alpha}{1+\left(\frac{z_2}{d}\right)^n} \tag{2.5}$$

Şekil 2.6.'da z_1 mesafesi sabit tutulmak kaydıyla z_2 mesafesinin değişiminin kontrast değerine etkisi gösterilmiştir. Görüntüden anlaşılacağı üzere ışık kaynağı mesafesi sabit

tutulmak şartıyla örnek düzleminin sensör düzlemine yaklaştırılması kontrast miktarını arttırmaktadır.



Şekil 2.6. z_2 mesafesinin kontrast değerine etkisi (Ji, 2007).

2.2.2.2. Görüntüleme sensörü

CMOS görüntüleme sensörü, örnek düzleminden geçen ışın fotonlarını yakalamasından dolayı lenssiz mikroskop sistemlerinin temel bileşenidir. Lenssiz görüntüleme yöntemlerinin parametreleri ve gelişmesi CMOS sensörlerin üretim teknolojileri ile doğrudan ilişkilidir.

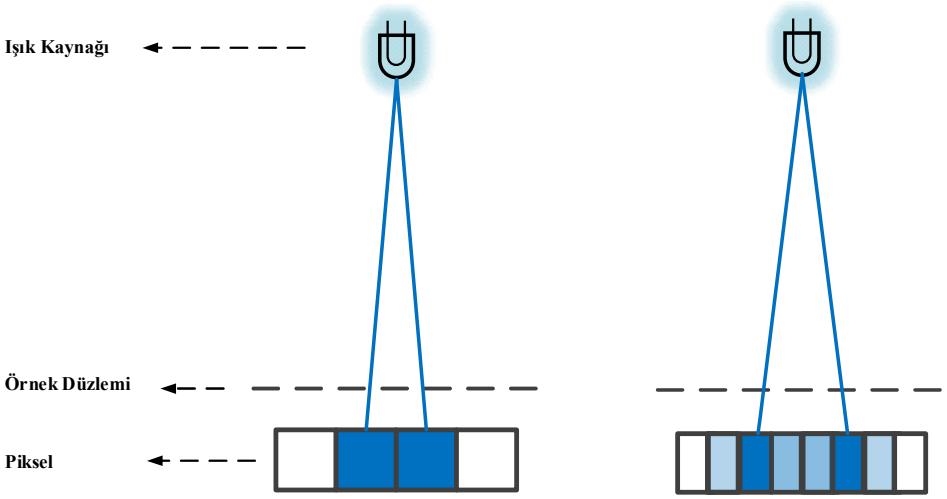
Fotonları, foto-elektronlara çeviren katı hal görüntüme elemanları ilk olarak 1960 yılında geliştirilmiştir. CMOS sensörlerinin üretim teknolojilerinin gelişmesinden önce CCD sensörler yüksek hassasiyetleri ve düşük gürültüleri dolayısı ile tercih edilmekteydi

(Ohta, 2008). CMOS görüntüleme sensörleri; yükseltme, hafıza okuma ve şarj dönüşümü işlemlerini yapmak amacı ile her pikselin içerisinde bulunan çoklu transistör yapılarından oluşmaktadır. CMOS sensörleri görüntüyü, düşük güç ve yüksek okuma kabiliyeti ile işleyebilmektedir (El Gamal, 2005).

Lenssiz kontak mikroskopların çözünürlüğü CMOS sensörlerinin piksel boyutları ile ilişkilidir. CMOS sensörlerin piksel boyutları, sensörlerin boyutlarının küçülmesine bağlı olarak önemli derecede küçülmüştür. Lenssiz kontak mikroskopide uzaysal çözünürlüğü arttırmanın ve daha fazla veri elde etmenin yolu daha küçük piksel boyutuna sahip sensörler kullanmaktır (Ji, 2007).

CMOS görüntüleme sensörlerinin piksel boyutlarının küçülmesi bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Düşük dinamik aralık (DR), sinyal-gürültü-oranı (SNR) ve düşük doldurma faktörü bu parametrelerin başlıca olanlarıdır (Chen, 2000). Doldurma faktöründeki azalma, sensör tabakası üzerine eklenebilecek mikro lensler ile engellenebilir. Sensöre gelen fotonların her fotodiyota odaklanması sağlanabilir ve daha yüksek doldurma faktörü elde edilebilir (Fontaine, 2013).

Şekil 2.7.'de farklı boyutta piksel büyüklüğüne sahip CMOS sensörlerinin, lenssiz mikroskopi sistemlerinin çözünürlüğüne etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Piksel büyüklüğü ile çözünürlük arasındaki ilişki.

Şekil 2.7.'de gösterildiği üzere, büyük piksel boyutuna sahip CMOS sensöründen elde edilen bilgi, düşük piksel boyutuna sahip CMOS sensöründen daha azdır. Bu sebepten dolayı düşük piksel boyutuna sahip CMOS sensörler lenssiz kontak görüntüleme yöntemi için daha yüksek uzaysal çözünürlük sağlamaktadır.

2.2.3. Dijital lenssiz holografi

Dijital holografi ilk olarak 1948 yılında Gabor tarafından tanımlanmıştır. Gabor, manyetik lenslerin kusurlarından kurtulmak için cisimleri küresel dalgalarla aydınlatmış, bu dalgaları dedektör ile toplamıştır (Gabor, 1948). Gabor sensör düzlemi üzerinde sinyalleri elde etmek için referans dalgalar ile örnek düzleminden yansıyan girişim dalgalarını yeniden inşa etmiştir.

Yüksek çözünürlük değerine sahip görüntüleme sensörlerinin gelişmesi, hologram kaydetme ve görüntüyü yeniden oluşturma yöntemlerinin gelişmesine olanak sağlamıştır. Mikron altı seviyede görüntülemeye olanak sağlayan holografik yöntemler, lenssiz mikroskopi sistemlerinin klinik amaçla kullanılmasına ve yaygınlaşmasına zemin oluşturmuştur (Bishara, 2010; Delacroix, 2017; Morel, 2015; Göröcs, 2012; Greenbaum, 2012; Kim, 2012; Seo, 2009).

Dijital lenssiz holografi yönteminde, örnek düzlemi üzerinde küresel dalgalar oluşturmak amacı ile koherent veya koherent olmayan ışın kaynaklarının pinhole içerisinden geçirilmesi gerekmektedir. Yükseltilmiş kırınım ışınları, örnekten daha uzak noktada olan görüntüleme sensörü üzerine yansıtılır. Görüntüyü yeniden oluşturma işlemi örnek düzleminin hem faz hem de yoğunluk bilgisini içerir.

Dijital holografi yöntemleri, lamel üzerine hazırlanan tıbbi örneklerin görüntülenmesinde optik mikroskoplara doğrudan alternatif olabilecek niteliklere sahiptir (Allier, 2018; Xu, 2011; Yin, 2019). Fakat göz ardı edilemeyecek dezavantajlara da sahiptir (Fang, 2018; Rodenburg, 2007).

2.2.4. Lenssiz floresan görüntüleme

Floresan görüntüleme, biyokimyasal olaylara karşı olan yüksek hassasiyeti, moleküler seviyedeki hücreleri karakterize etmedeki başarısından ötürü klinikte geniş bir kullanım alanına sahiptir (Steingart, 2006). Karakterizasyon adımlarını daha yüksek doğrulukta gerçekleştirmek için, geniş görüş alanına sahip sistemlerin kullanılması istenilen bir durumdur. Geleneksel floresan görüntüleme yöntemleri dar bir görüş alanına sahip olduğu için bu alanda istenilen performansa ulaşılamamaktadır. Fakat lenssiz floresan görüntüleme sistemleri ile var olan problemlerin üstesinden gelinebileceği ve hücre karakterizasyon aşamalarının daha başarılı bir şekilde yapılabileceği literatürde bulunan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Adams, 2017; Coskun, 2011; Sencan, 2014).

2.3. Görüntü Bölütleme

Görüntü bölütleme, görüntü içerisinde aynı veya benzer özelliklere sahip öğelerin anlamlı bir şekilde alt kümelere ayrılması işlemidir. Alt kümeler, bir görüntünün çeşitli kriterler çerçevesinde değerlendirilmesi ile anlamlandırılan yapılardır (Singh, 2010). Görüntü bölütlemede sonucunda elde edilen kümeler; kendi içinde homojen, diğer gruplar ile aralarında heterojen dağılım gösterir. Ayrıca elde edilen sonuçların doğru yorumlanması, görüntü bölütleme işlemlerinin en önemli süreçlerinden birisidir. Bu yönüyle görüntü segmentasyonu, görüntü işleme sistemlerinin tasarımında zor bir süreçtir (Sathya, 2011).

Son yıllarda hasta sayısında ve görüntü çeşitlerindeki artış, tıbbi verilerin işlenmesinde ve analizinde görüntü bölütleme yöntemlerini gerekli bir hale getirmiştir. Bölütleme yöntemlerin kullanılması, tıbbi uzmanlara görüntüleri yorumlama ve sonuç üretme aşamalarında farklı bakış açıları da kazandırmaktadır (Pham, 2000). Patolojik incelemeler için ise bahsedilen süreçler önemini gün geçtikçe arttırmaktadır.

Patoloji araştırmalarında hastalara ait doku örneklerinin; hazırlanması, incelenmesi ve sonuçlarının çıkarılması günümüzde kullanılan klasik yöntemler göz önüne alındığında hem uzun sürmekte hem de inceleyen uzmanın tecrübesine bağlı olarak sübjektif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Yılmazbayhan, 2017). Bahsedilen problemlerin üstesinden

gelebilmek amacı ile bu bölümde tez içerisinde kullanılan görüntü bölütleme çeşitleri hakkında bilgi verilecek ve tezde kullanılan k-means++ algoritması detaylı olarak işlenecektir.

2.3.1. Görüntü bölütleme yöntemleri

Tüm görüntü bölütleme yöntemleri temelde aynı matematiksel eşitlikleri sağlaması gerekmektedir. Denklem (2.6)'da görüntü bölütleme işlemlerinin en genel matematiksel ifadesi verilmiştir (Pal, 1993).

$$\bigcup_{i=1}^{n} K_i = K \tag{2.6}$$

Burada K bölütlerine ayrılmak istenilen görüntü, K_i ifadesi ise görüntü bölütleme işlemi sonucu elde edilen alt kümeleri ifade etmektedir. Görüntü içerisindeki her piksel, alt kümelerden birsine dahil olmak zorundadır. Denklem (2.6)'da verilen koşulun sağlanması segmentasyon işleminin tamamlandığını ifade etmektedir

$$K_i \cap K_j = \emptyset \tag{2.7}$$

Denklem (2.7)'de ise $i \neq j$ olmak üzere alt kümelerin kesişim noktasının boş küme olduğunu ifade etmektedir. Her bir alt küme birbirleri arasında heterojen bir yapıya sahiptir.

Görüntü bölütleme algoritmaları için Denklem (2.6) ve Denklem (2.7)'de var olan ifadelerin sağlanması gerekmektedir. Çeşitli bölütleme tekniklerinin ortaya çıkmasının sebebi, üzerinde çalışma yapılan görüntülerin türlerinin farklılıkları ve istenilen sonucun farklılığından kaynaklanmaktadır. Görüntü bölütleme yöntemleri genel olarak kenar-tabanlı bölütleme (Sharma, 2010), eşikleme tabanlı bölütleme (Otsu, 1979), bölge-tabanlı bölütleme (Gould, 2009), kümeleme-tabanlı bölütleme (Farjam, 2007) ve grafik-tabanlı bölütleme (Felzenszwalb, 2004) olmak üzere 5 ana grup altında toplanır.

2.3.1.1. Kenar-tabanlı bölütleme

Görüntü içerisinde bulunan kenar yapıları önemli bilgiler içermektedir. Kenar-tabanlı bölütleme yöntemleri, literatürde kullanılan en eski ve uygulanması en kolay tekniklerdir. Görüntüler piksel boyutunda ele alındığında, kenarlar görüntü içerisinde ani değişim gösteren bölgeleri ifade edilmektedir (Gonzalez, 2002).

Kenar-tabanlı bölütleme teknikleri, matris yapısında bir alan filtresinin görüntünün tamamına uygulanması prensibi ile çalışmaktadır. Filtrelerin yapısına bağlı olarak, görüntü içerisindeki ani değişimler iki seviyeli bir çıktı üretir. Bu seviyeler arasındaki geçiş bölgeleri kenar olarak kabul edilir (Gonzalez, 2002). Literatürde Sobel, Prewitt, Laplacian, Log ve Canny isimli çeşitli alan filtreleri kenar belirleme yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Saini, 2014).

Kenar tabanlı bölütleme yöntemleri iki farklı teknik üzerine inşa edilebilir; bunlardan birincisi kenar bulunmasında gri-histogram tekniğidir. Bu tekniğin amacı, görüntü içerisindeki gri renklerin maksimum ve minimum seviyelerini doğru bir şekilde bulmaktır. Nesne ile arka plana ait konik Gauss eğrilerinin kesişim noktalarını eşik değer olarak kabul edip, kenarları bu yükseltiye göre belirlemektir.

İkinci teknik ise görüntünün türev değerleri ile kenar özelliklerini çıkarmayı sağlayan Gradiyent temelli yöntemdir. Görüntünün matrislerine bölgesel birinci türev uygulandığında, görüntü içerisindeki kenar yapıları en büyük değere sahip çıktıları üretir. Görüntünün ikinci türev alındığında ise kenar bölgelerine ait piksel değerleri sıfır olarak ortaya çıkar (Krishnapuramm, 2000).

Kenar-tabanlı segmentasyon yöntemleri kolay uygulanmaktadır fakat çıktı üretimi bakımından etkinliği az ve karmaşık arka plana sahip görüntülerde başarısı düşüktür.

2.3.1.2. Eşikleme tabanlı bölütleme

Eşikleme tabanlı bölütleme yöntemleri, görüntüye ait nesneler ve bu nesnelerin arka planında kalan piksel değerlerini prensibi ile çalışır ve görüntülere ait histogram dağılımlarından faydalanır. Bu yöntem görüntüyü, arka plan ve ön plan olmak üzere ikili bir görüntü haline getirir. Eğer arka plana ait pikseller ön planda bulunan piksellerden daha az karmaşık bir yapıya sahipse bu yöntemler oldukça efektif bir şekilde çalışır.

Eşikleme tabanlı bölütleme yaklaşımları eşik değerinin seçilme parametresine göre global eşikleme, adaptif eşikleme ve çok-seviyeli eşikleme şeklinde isimlendirilir (Gonzalez, 2002).

$$g(x,y) = \begin{cases} 1, & f(x,y) \geq T \\ 0, & f(x,y) < T \end{cases} \tag{2.8}$$

Denklem (2.8)'de global eşikleme yönteminin durum denklemleri verilmiştir. Denklemde $f(x,y)$ ifadesi bölütlenecek görüntüyü, T ifadesi eşik değerini ifade etmektedir. Eşitlikte gösterilen 1 değeri görüntüdeki nesne yapılarını, 0 değeri ise nesne yapılarının arka planını ifade etmektedir. Buradaki eşik değeri, histogram analizleriyle veya önceden yapılmış çalışmaların sonuçları ile belirlenebilir.

Global eşik değeri seçilmesi, farklı problemleri beraberinde getirmektedir. Bu problemleri ortadan kaldırmak amacı ile adaptif eşikleme yöntemleri kullanılmaktadır. Eşik değerini belirlemede adaptif olarak birçok metot kullanılabilir. Literatürde efektif bir şekilde çalışan Otsu metodu basit yapısı itibari ile sıklıkla tercih edilmektedir (Otsu, 1979). Ayrıca adaptif eşik değeri belirlenirken; genetik algoritmalar, bilgisayar öğrenmesi gibi yöntemlerde kullanılabilir (Bhanu, 1995).

Adaptif eşikleme yöntemleri çoklu nesne bulunan ve karmaşık arka plana sahip görüntülerin bölütlenmesinde yüksek derece başarıya ulaşamamıştır. Bu problemlerin çözümü için çok-seviyeli eşikleme yöntemleri kullanılmaktadır. Çok-seviyeli eşikleme yöntemleri, arka planda iki veya üç nesne barındıran görüntülerin analizlerinde başarılıdır. Fakat görüntüde bulunan nesne sayısının artması eşik değerinin belirlenmesini

daha zor bir hale getirmektedir. Ayrıca arka plan karmaşıklığının artması da eşik değerlerinin belirlenmesinde problem ortaya çıkarmaktadır (Satapathy, 2018).

2.3.1.3. Bölge-tabanlı bölütleme

Bölge-tabanlı bölütleme teknikleri, görüntü içerisindeki bölgeleri doğrudan bulabilmek amacı ile kullanılır. Komşu piksellerin benzer özellikler gösterdiği varsayımına dayanmaktadır. Bütün pikseller, komşuluk kuralları çerçevesinde komşu matrisler ile karşılaştırılır. Belirlenen benzerlik ölçütü komşu pikseller için sağlanırsa karşılaştırılan pikseller aynı küme altında toplanır. Yapıları gereği gürültüye karşı diğer tekniklere nazaran daha az duyarlıdır (Saha, 2018).

Literatürde bölge genişletme, bölge ayırma ve bölge birleştirme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır**.** Bölge genişletme yöntemleri; önceden tanımlanmış genişleme ölçütleri çerçevesinde, görüntü içerisindeki alt bölgeleri daha büyük bölgelerde toplayan işlem adımlarından meydana gelmektedir. Bu amaç için görüntü içerisinde tohum noktaları belirlenir, önceden tanımlanan kurullar doğrultusunda komşu pikseller tohum noktalarının bulunduğu kümeye eklenir (Gonzalez, 2002).

2.3.1.4. Kümeleme-tabanlı bölütleme

Sınıflandırma tabanlı bölütleme teknikleri; görüntü içerisindeki piksel değerlerini bölme ve devamında belirlenen küme sayısınca pikselleri alt kümelere dağıtan bir strateji ile çalışır (Gonzalez, 2002). Kümeleme işlemi, aynı küme içerisindeki piksellerin özellik bakımından maksimum benzerliğe sahip olması, farklı küme içerisinde ki piksellerin minimum benzerliğe sahip olması temeline dayanmaktadır. Bu amaç dahilinde öncelikle görüntüye ait renk bilgisi, şekil faktörü, yoğunluk vb. çeşitli özellikleri kullanılabilir. Kümeleme-tabanlı yöntemler, bu şekilde ele alındığında renkli görüntülerin sınıflandırılmasında efektif bir şekilde çalışmaktadır (Altunbay, 2010). Literatürde çeşitli amaçlarla kullanılan kümeleme-tabanlı segmentasyon tekniği bulunmaktadır. Bu tekniklerin en sık kullanılanları K-Means, Fuzzy ve C-Means yöntemleridir.

2.3.1.5. Diğer bölütleme yöntemleri

Bahsedilen görüntü bölütleme yöntemlerinin dışında kullanılan ve ayrı kategorilerde ele alınabilecek çeşitli hibrit yaklaşımlar mevcuttur. Bu yöntemler başlıca; yapay sinir ağları, bulanık teknikler ve fizik-tabanlı teknikler olarak sıralanabilir.

Yapay sinir ağları ile yapılan görüntü bölütlemesi son yıllarda literatürde oldukça önem kazanmıştır. Bu yöntemler, birbirleri arasında değişik ağırlıklar ile eşleştirilmiş çok sayıda ara bileşenden meydana gelir. Karışık, doğrusal olmayan ve birbirlerine bağımlı veri kümelerini ifade ederler. Bu yöntemde, eğitim kümesi elde edilen sonuçların başarısında oldukça önemlidir. Eğitim süreçleri yavaş sürer fakat sınıflandırma süreci hızlıdır. Görüntülerden elde edilen özniteliklerin sınıflandırılması veya kümelenmesi bu yöntemleri efektif duruma getirmektedir (Egmont, 2002).

Bulanık teknikler, kesin olmayan ve karışık durumların yönetildiği mekanizmalardır. Bu teknikler; görüntü içerisindeki tanımlanan belirsizliklerin ele alınması amacıyla, özelliklerin kullanıldığı ve çıkarım kurallarının yürütüldüğü metotlardır (Yüksel, 2006).

Fizik-tabanlı teknikler ise, görüntü içerisinde çeşitli nedenlerden kaynaklı 2 boyutlu gürültü yapılarını elimine eden, görüntü içerisindeki yapıların sınırlarını fiziksel modellerden faydalanarak bulan metotlardır. Literatürde sıklıkla “iki renkli yansıma modeli” ve “yaklaşık renk yansıtma modeli” kullanılır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölüm içerisinde; lenssiz mikroskopi sisteminin tasarım parametreleri, kullanılan materyaller, materyallerin birbirleriyle olan ilişkileri, yapılan kalibrasyon deneyleri, farklı görüntüleme stratejilerinin görüntüler üzerine etkileri ve elde edilen görüntüleri bölütlemek için kullanılan yöntemlerden bahsedilecektir.

3.1. Görüntüleme Sisteminin Tasarlanması

3.1.1. CMOS sensör

Lenssiz görüntüleme sisteminde, Sony IMX219PQ 1/4,0'' CMOS görüntüleme sensörü kullanılmıştır. Sony IMX219PQ; yatay olarak 3280, dikey olarak 2464 aktif piksele sahiptir. Her piksel karesel 1,12 µm x 1,12 µm büyüklüğündedir. Görüntüleme sensörünün aktif piksel alanı yaklaşık olarak 10 mm^2 büyüklüğündedir Dolayısı ile görüntüleme sistemde görüş alanı yaklaşık olarak 10 mm^2 değerine eşittir. Bu büyüklük 10x objektif lensten 2 kat daha büyük görüş alanı elde edilmesine olanak sağlamaktadır.

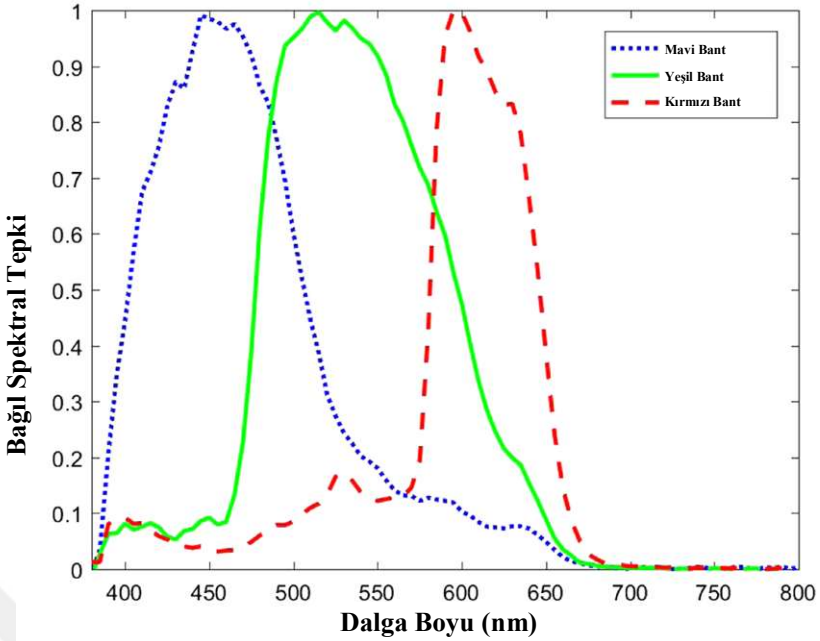
Bu sensörün seçilmesinde en önemli etken sensörün sahip olduğu karesel piksel büyüklüğüdür. Görüntülenecek örnek düzlemlerinden daha fazla foton yakalanabilmesi için gerekli olan bu büyüklük, lenssiz görüntüleme sensörlerinde uzaysal çözünürlüğü doğrudan etkilemektedir. Mevcut görüntüleme sensörleri göz önüne bulundurulduğunda fiyat-performans skalasında üst sıralarda yer alması nedeniyle bu sensör tercih edilmiştir. Tablo 3.1.'de Sony IMX219PQ görüntüleme sensörü ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Tablo 3.1. Sony IMX219PQ sensörün özellikleri

Görüntü Boyutu	Diyagonal 4.6mm (1/4.0)
Toplam Piksel Sayısı	3296(H) × 2512(V)
Aktif Piksel Sayısı	3280(H) × 2464(V)
Çip Büyüklüğü	5.095mm (H) × 4.930mm (V)
Piksel Büyüklüğü	1,12µm (H) × 1,12µm (V)

Lenssiz görüntüleme sistemlerinin uzaysal çözünürlüğü, kullanılan görüntüleme sensörünün piksel büyüklüğüne eşittir. Fakat çalışma içerisinde kullanılan görüntüleme sensörü bayer filtre bulundurmasından dolayı, uzaysal çözünürlük doğrudan piksel büyüklüğü ile belirlenemez. Sony IMX219PQ görüntüleme sensöründe BGGR yapısında Bayer filtre bulunmaktadır.

Sensöre ait örnekleme aralığını belirlemek için bayer fitrenin özelliklerinden faydalanılır. Belirli dalga boylarında daha küçük örnekleme aralığı elde edilir. Sony IMX219PQ görüntüleme sensöründe yeşil piksellerin örnekleme aralığı piksel büyüklüğünün $\sqrt{2}$ katıdır. Kırmızı ve yeşil piksellerin örnekleme aralığı ise piksel büyüklüğünün 2 katıdır. Bu bilgiler neticesinde yeşil piksellerde 1,58 µm, kırmızı ve mavi piksellerde 2,24 µm örnekleme aralığı elde edilmektedir. Görüntüleme sensöründen bayer filtrenin kaldırılması daha küçük örnekleme aralığına sahip olmayı sağlayacaktır. Fakat bu çalışma içerisinde doğrudan renkli görüntülerin elde edilmesi amaçlandığı için bayer filtre kaldırılmamıştır. Bunun yerine sensörden en küçük aralıklarla örnekleme yapabilecek LED kaynakları tercih edilmiştir. Görüntüleme sensör, 600 nm kırmızı ışımada %95,85, 520 nm yeşil ışımada %99,26, 460 nm mavi ışımada %80,51 oranında maksimum yoğunluk tepkisine sahiptir. Şekil 3.1.'de Sony IMX219PQ sensörünün bağıl spektral tepki grafiği verilmiştir.



Şekil 3.1. Sony IMX219PQ sensör spektral tepki grafiği (Pagnutti, 2017).

3.1.2. LED kaynaklar

Lenssiz mikroskopi sisteminde farklı stratejilerde görüntüleri elde etmek için 4 adet 3W güç LED'i kullanılmıştır. Beyaz LED kaynağı gerçek zamanlı görüntüleri elde etmek için kullanılmıştır. Diğer LED kaynakları ise ikinci görüntüleme stratejisi olan farklı yoğunluk kanallarını birleştirmek amacıyla kullanılmıştır.

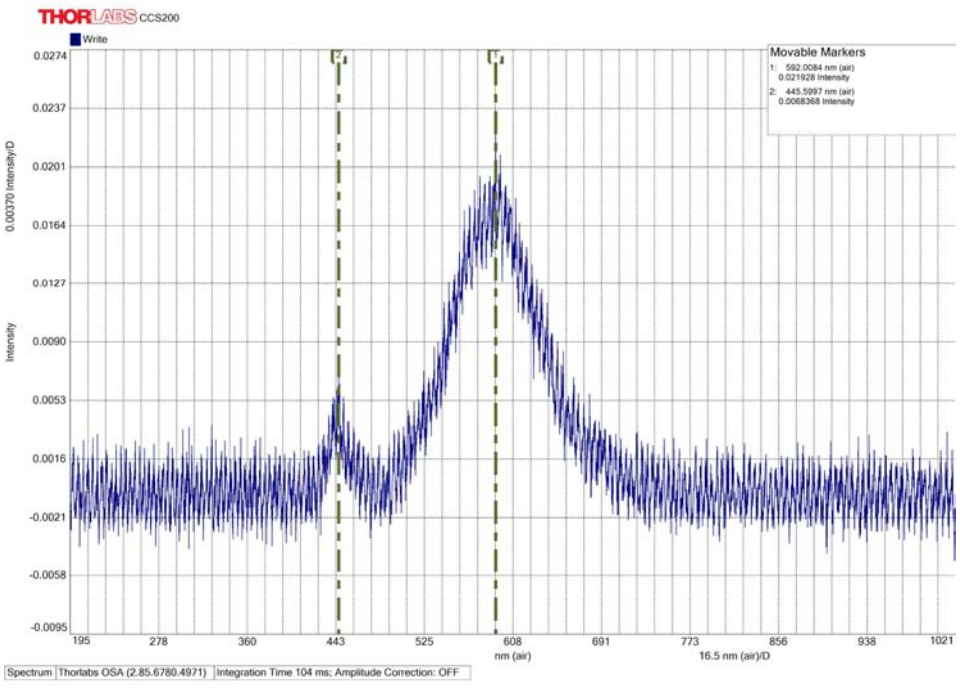
Tez içerisinde kullanılan LED kaynaklar Şekil 3.1.'de verilen CMOS sensörün farklı dalga boylarına olan tepkileri göz önünde tutularak belirlenmiştir. Böylece sensörden elde edilen yoğunluk bilgilerinin maksimum seviyede olması sağlanmıştır Tüm LED kaynaklar 350 mA sabit akım sürücü ile beslenmiştir. LED kaynakların sıcaklığa bağlı dalga boylarının değişmesini engellemek amacı ile kaynaklara ısı dağıtıcı eklenmiştir.

Çalışma içerisinde görüntüleme sensörü ile LED kaynaklar arasındaki mesafe deneysel olarak belirlenmiştir. LED kaynakların, görüntüleme sensörünün aktif piksel bölgesine homojen bir dağılım sağlamak amacı ile 150 µm çapa sahip pinhole kullanılmıştır. Bu çaptaki pinhole, ışık yansımalarını ve diğer gürültüleri en az seviyeye indirmiştir. Pinhole,

CMOS sensörün aktif piksellerinin bulunduğu alanın merkez noktasının 90° üzerine yerleştirilerek yansımaların azaltılması hedeflenmiştir.
İlk olarak kullanılan beyaz LED kaynağın temel amacı, tıbbi örneklerin gerçek zamanlı olarak incelenmesine olanak sağlamasıdır. Tasarlanan arayüz ile görüntülerin doğrudan incelenmesine olanak sağlanmıştır. Arayüz, açık kaynak kodlu Python programlama dilinde yazılmıştır. Gömülü bilgisayar olarak Raspberry Pi 3 Model B+ kullanılmıştır.

LED kaynakların dalga boyu ölçümleri Thorlabs firmasının 200 nm ile 1000 nm arasındaki dalga boylarını ölçebilen CCS200 modelli spektrometresi kullanılmıştır.

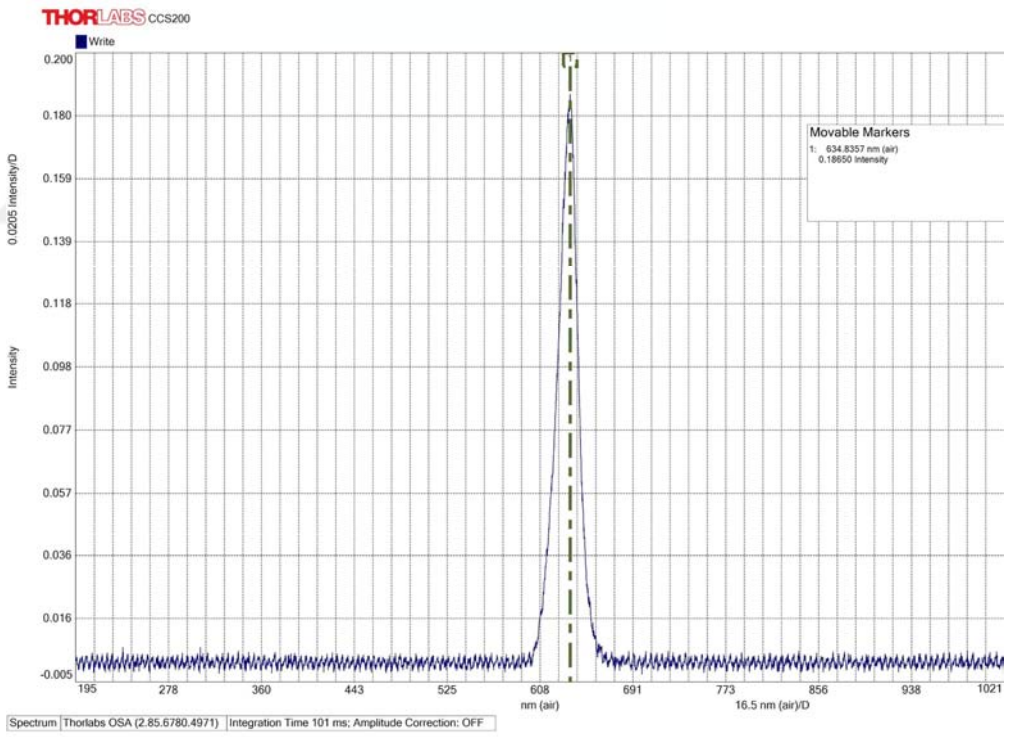
Beyaz LED kaynak tepe dalga boyuna sahiptir. İlk tepe dalga boyu 442 nm olup ±15 nm spektral aralığa sahiptir. Bu tepe dalga boyunda kullanılan CMOS sensörü mavi kanalda maksimum %74,24 oranında spektral tepkiye sahiptir. İkinci tepe dalga boyu 590 nm olup ±100 nm aralığa sahiptir. Beyaz LED kaynağın geniş dalga boyu aralığına sahip olması, sensörün faklı spektral tepkilerde maksimum bilginin elde edilmesini sağlamıştır. Beyaz LED kaynağın dalga boyu aralığı, sensörün spektral hassasiyeti kırmızı ve yeşil kanalda maksimum olduğu noktaları içermektedir. Şekil 3.2.'de kullanılan beyaz LED kaynağın spektrumu verilmiştir.



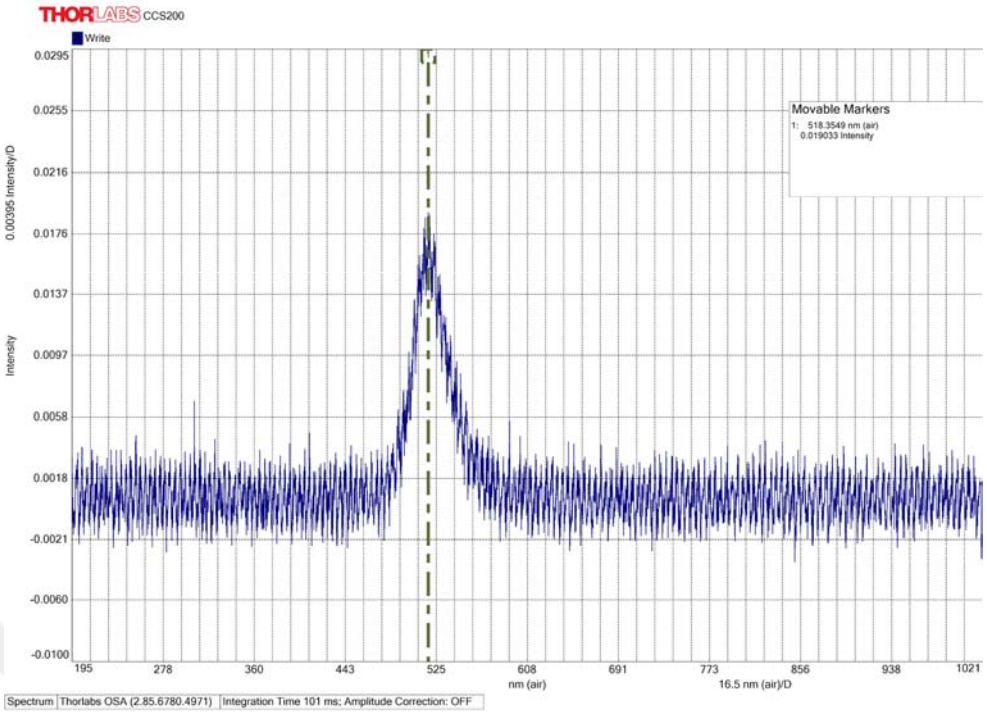
Şekil 3.2. Beyaz LED spektrumu.

Kırmızı LED kaynağı 634 nm tepe dalga boyunda, ± 30 nm spektral genişliğe sahiptir. Sensörün bu dalga boyu aralığında spektral tepkisi kırmızı kanalda %95,86 ile %68,86 oranında değişmektedir. Bu LED ile elde edilen RGB görüntülerden sadece kırmızı kanalın renk yoğunluk bilgisini kullanılarak spektral tepki maksimum noktada tutulması amaçlanmıştır Şekil 3.3.'te kırmızı LED kaynağın dalga boyu ölçümleri gösterilmiştir.

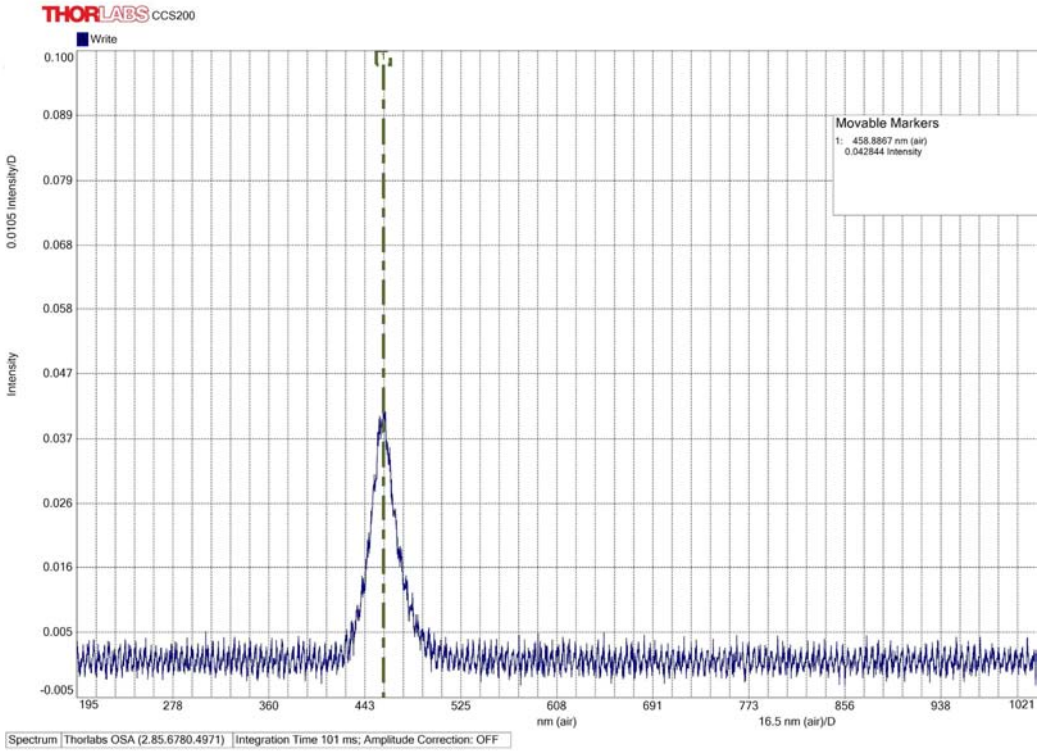
Yeşil LED kaynağı maksimum 518 nm tepe dalga boyunda, ± 60 nm spektral genişliğe sahiptir. Sensörün bu dalga boyu aralığında spektral tepkisi yeşil kanalda %99,57 ile %60,04 oranında değişmektedir. Bu LED ile elde edilen RGB görüntülerden, görüntülerin birleştirilmesi sürecinde sadece yeşil kanalının yoğunluk değerleri kullanılmıştır. Şekil 3.4.'te yeşil LED kaynağın dalga boyu ölçümleri gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kımızı LED spektrumu.



Şekil 3.4. Yeşil LED spektrumu.



Şekil 3.5. Mavi LED spektrumu.

Mavi LED maksimum 459 nm tepe dalga boyunda, ± 30 nm spektral genişliğe sahiptir. Sensörün bu dalga boyu aralığında spektral tepkisi mavi kanalda %80,51 ile %62,49 oranında değişmektedir. Bu LED ile elde edilen RGB görüntülerden sadece mavi kanalın kullanılması, örnek düzleminden elde edilen yoğunluk bilgisi daha fazla bilgi içerdiği anlamına gelmektedir. Şekil 3.5.'te mavi LED kaynağın dalga boyu ölçümleri gösterilmiştir.

Tablo 3.2.'de kullanılan tüm LED kaynaklar ve sensörün gösterdiği maksimum spektral tepki verilmiştir.

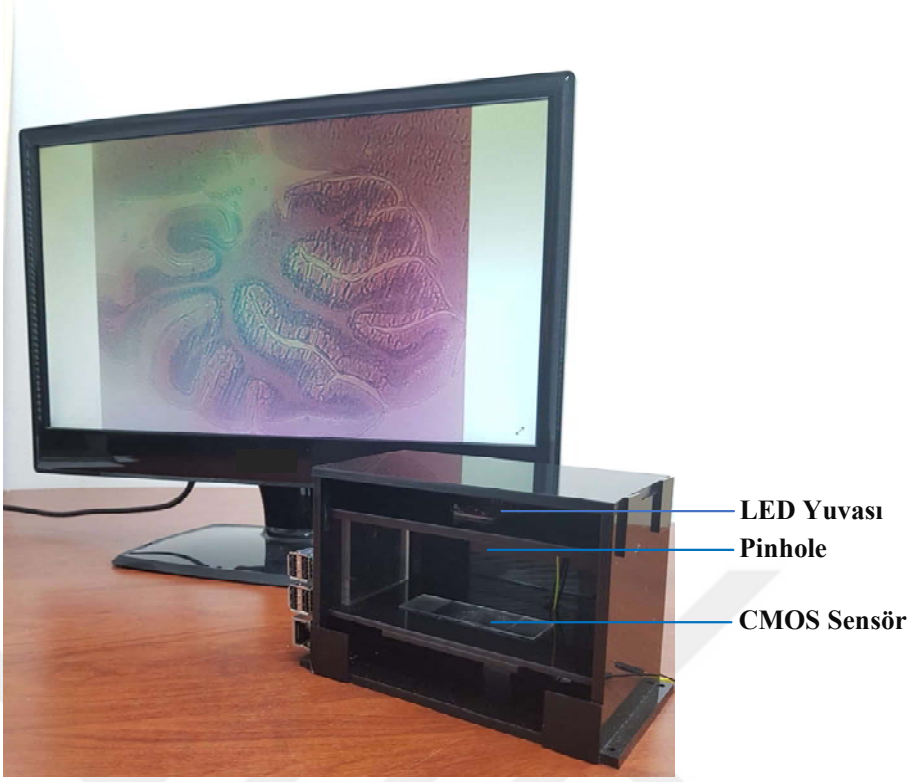
Tablo 3.2. Kullanılan LED kaynaklar ve sensör spektral tepkisi

Kullanılan LED	Dalga Boyu (nm)	Sensör Spektral Tepkisi (%)
Beyaz	442 ±15, 590 ±100	99,57
Mavi	459 ±30	80,51
Yeşil	518 ±60	99,57
Kırmızı	634 ±30	95,86

3.2. Görüntüleme Sisteminin Üretilmesi

Görüntüleme sistemi tasarlanırken önceki bölümlerde anlatılan temel parametrelere dikkat edilmiştir ve mesafe ölçütleri hassasiyetle ayarlanmıştır. Kullanılan tüm materyallerin en optimize şekilde çalışması sağlanmıştır Görüntüleme sisteminin dış bileşeni 5 cm kalınlığında pleksi maddesinden üretilmiştir. Sensör ile örnek düzlemi arasındaki mesafenin minimum olması sağlanmıştır. Bu mesafe 25 µm olarak ölçülmüştür. Görüntüleme sensörü ile pinhole arasındaki mesafe deneysel 5 cm yüksekliğe ayarlanmıştır. Şekil 3.6.'da geliştirilen görüntüleme sistemine ait görüntü verilmiştir.

Görüntüleme sisteminde, CMOS sensörün altındaki bulunan alana LED sürücü devresi ve gömülü bilgisayar entegre edilmiştir LED kaynakları besleyebilmek için LED sürücü devresi entegre edilmiştir. Örnek düzlemi altında açılan karesel oyuğa CMOS sensörün devre kartı yerleştirilmiş. Örnek düzlemin yüzeysel alanı, kullanılan lamellerin tüm bölgelerini incelemeye olanak sağlayacak büyüklükte üretilmiştir. Pinhole üzerindeki yüzeye değişken LED kaynaklar için besleme yuvası tasarlanmıştır



Şekil 3.6. Geliştirilen lenssiz görüntüleme sistemi.

3.3. Görüntüleme Stratejileri ve Sistemin Kalibrasyonu

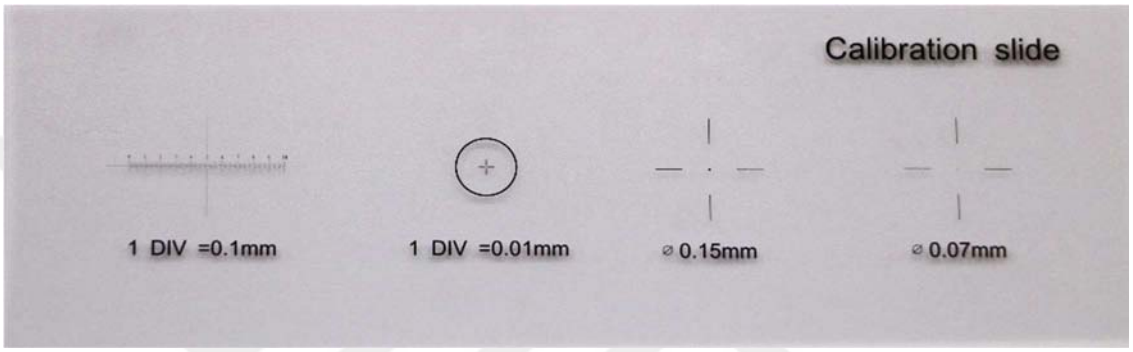
Bu bölümde, üretilen lenssiz görüntüleme sisteminin çizgileri ve noktaları çözme gücünü incelemek ve geri bildirim alarak sistemi optimize etmek amacı ile yapılan deneylere ve alınan görüntülere yer verilmiştir. Farklı dalga boyuna sahip LED kaynaklar altında elde edilen görüntülere ait analizler yapılmıştır. Devamında ise farklı yoğunluk bilgilerinin birleştirilmesi ile elde edilen görüntü verilmiştir. Bu bölümde, deneylerin yapılmasındaki amaç tıbbi örneklerin inceleme ve sınıflandırma süreçlerini en iyi duruma getirmektir Deneyler sonucunda elde edilen veriler ile sistem tasarım parametreleri gözden geçirilmiş ve üretim tekrar yapılmıştır.

3.3.1. Kullanılan kalibrasyon lameli

Görüntüleme sisteminin tasarlanması ve üretilmesi süreçlerinde, elde edilen görüntülerin çözünürlüklerini ve kontrast değerlerini ölçmek amacı ile kalibrasyon lameli kullanılmıştır. Kalibrasyon lamelinde bulunan ölçütlerden elde edilen piksel yoğunluk

verileri, tasarım sürecinde geri bildirim sağlamıştır. Ayrıca elde edilen görüntülerde ölçüt çubuklarının oluşturulmasında faydalanılmıştır.

Kullanılan kalibrasyon lamelinde 2 adet çizgisel, 2 adet dairesel ölçüt bulunmaktadır. Kalibrasyon deneyleri sırasında ölçüm aralığı (DIV) 10 µm olan çizgisel ölçüt ve 70 µm çapındaki dairesel ölçüt kullanılmıştır. Şekil 3.7.'de kullanılan kalibrasyon lamelinin kamera ile çekilmiş görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.7. Kullanılan kalibrasyon lameli.

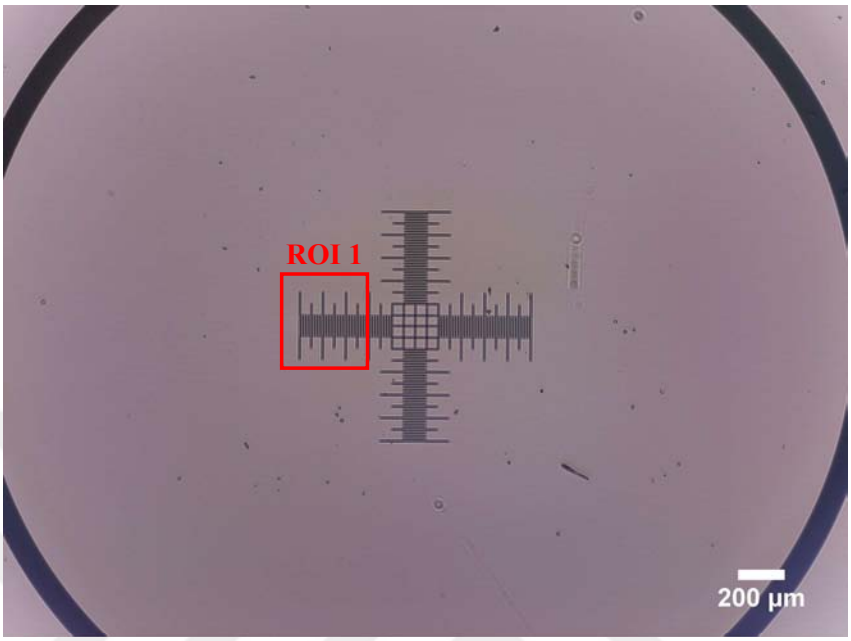
3.3.2. Gerçek zamanlı görüntüler ve analizleri

Görüntüleme sisteminde iki farklı görüntüleme stratejisi kullanılmıştır. Bunlardan ilki, beyaz LED ışıması altında gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntülerdir. İkincisi ise 3 farklı LED ışıması altında elde edilen piksel yoğunluk bilgilerinin tek renkli görüntü içerisinde birleştirilmesidir.

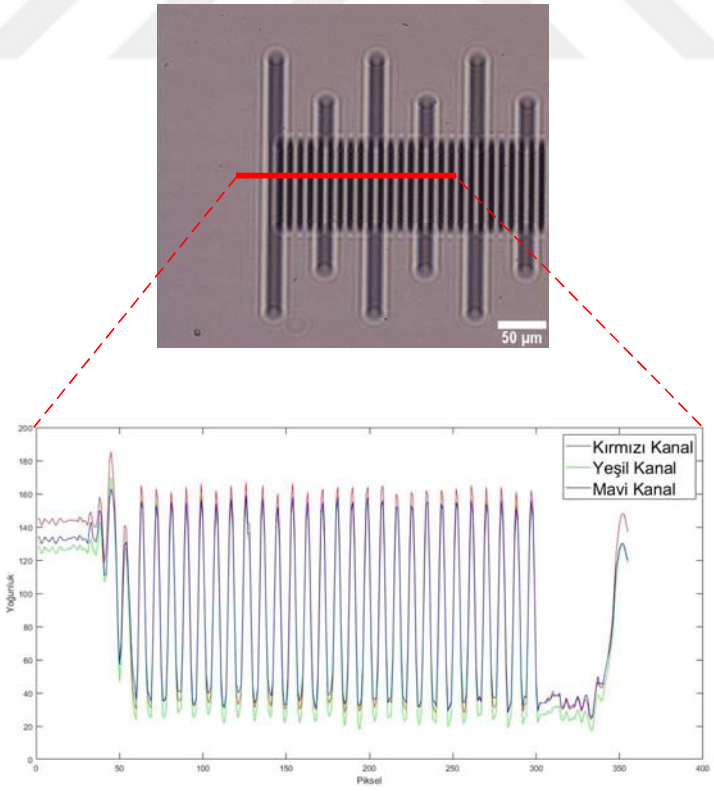
Gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntüler, patoloji uzmanlarının doku örneğini detaylı incelemeye göndermeden önce doku hakkında bilgi sahibi olması ve detaylı incelemeye ihtiyaç duyulup duyulmayacağına karar verme sürecine destek olması amaçlanmıştır.

Gerçek zamanlı görüntüler elde edilirken görüntü işleme metotları kullanılmamıştır. Tıbbi örneklerden elde edilen görüntüler doğrudan gömülü bilgisayar yardımı ile görsellenmiştir.

Şekil 3.8.'de kalibrasyon lamelinin çizgisel ölçeğinden alınan gerçek zamanlı görüntü verilmiştir. Bir ölçüm çizgisi ve aralığı 10 µm olduğu bilinmektedir.



Şekil 3.8. Çizgisel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü.



Şekil 3.9. ROI 1 ve çizgisel yoğunluk grafiği.

Gerçek zamanlı olarak elde görüntülerin incelenmesinde; çizgilerin ve devamında bulunan boşlukların piksel yoğunluk grafikleri çıkarılmıştır. Elde edilen veriler, gerçek zamanlı görüntüleme metodunun çizgisel çözme kabiliyeti hakkında bilgi vermektedir. Şekil 3.9.'da kalibrasyon lamelinin gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntüsünden seçilen ROI 1 ve bu bölgeye ait çizgisel piksel yoğunluk grafiği verilmiştir.

Tablo 3.3.'te, Şekil 3.9.'da elde edilen yoğunluk verilerinin ortalama değerleri verilmiştir. Maksimum yoğunluk verisi çizgisel kalibrasyon lamelinin boşluk kısımlarını yani arka planı ifade etmektedir. Minimum yoğunluk verisi çizgisel ölçütlerin piksel yoğunluk verisini ifade etmektedir. Veriler tabloya işlenirken kalibrasyon lameli üzerinde bulunan tüm çizgilerin ve boşlukların piksel yoğunluk verilerinin ortalaması alınmıştır. Yoğunluk verileri ise minimum ve maksimum piksel yoğunluk bilgilerinin ortalama farklarını ifade etmektedir.

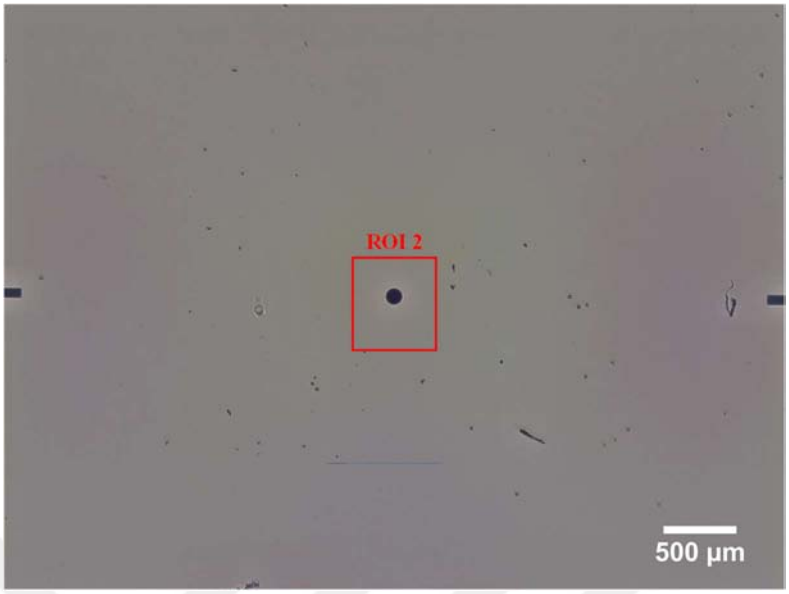
Tablo 3.3. Gerçek zamanlı görüntünün ait çizgisel yoğunluk verileri

Yoğunluk Kanalı	Maksimum Yoğunluk	Minimum Yoğunluk	Fark
Kırmızı	161	34	127
Mavi	154	35	119
Yeşil	158	22	136

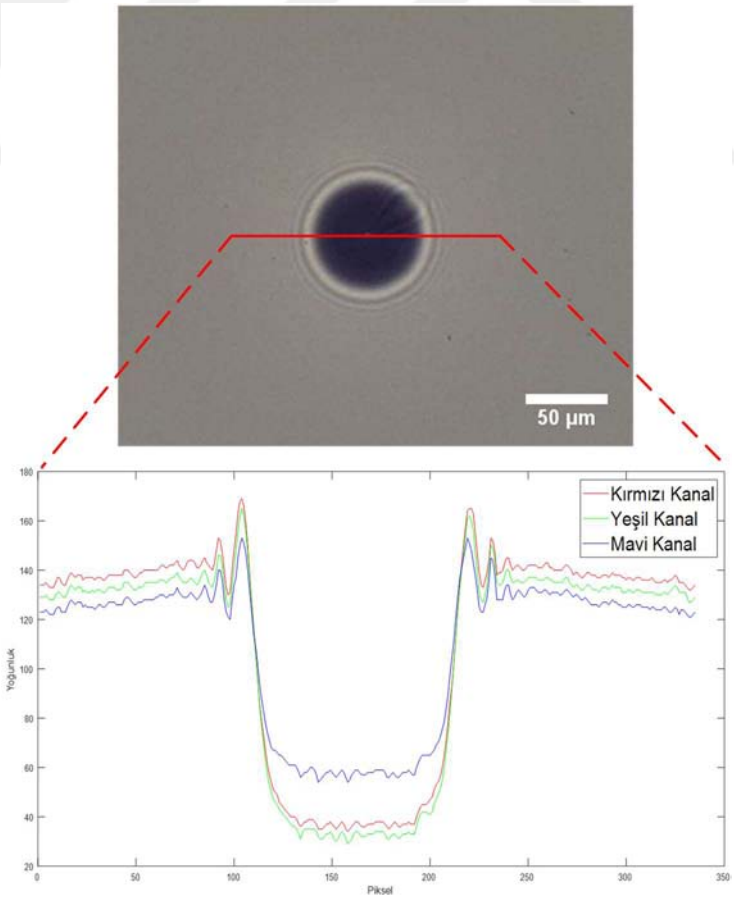
Gerçek zamanlı olarak elde edilen verilerin Tablo 3.3.'te ortalama farkları ele alındığında en fazla fark yeşil renk uzayından elde edilmiştir. Bu sonuç, kullanılan beyaz LED kaynağın ve kullanılan görüntüleme sensörünün arasındaki ilişki göz önünde bulundurulduğunda istenilen hedefe ulaşıldığını göstermektedir. Tezin devam eden bölümlerinde gerçek zamanlı görüntülerin bölütleme işlemi yapılırken bu bilgi göz önünde bulundurulmuştur.

Şekil 3.10.'da kalibrasyon lamelinin dairesel ölçütünden alınan gerçek zamanlı görüntü verilmiştir.

Şekil 3.11.'de seçilen ROI 2 ve bu bölgeye ait çizgisel piksel yoğunluk grafiği verilmiştir. Arka plan ve dairesel yapının merkezleri göz önünde bulundurulduğunda, renk ayrımının çizgisel ölçütte olduğu gibi, yeşil renk düzleminde daha ayrık sonuçlar ürettiği gözlenmektedir.



Şekil 3.10. Dairesel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü.



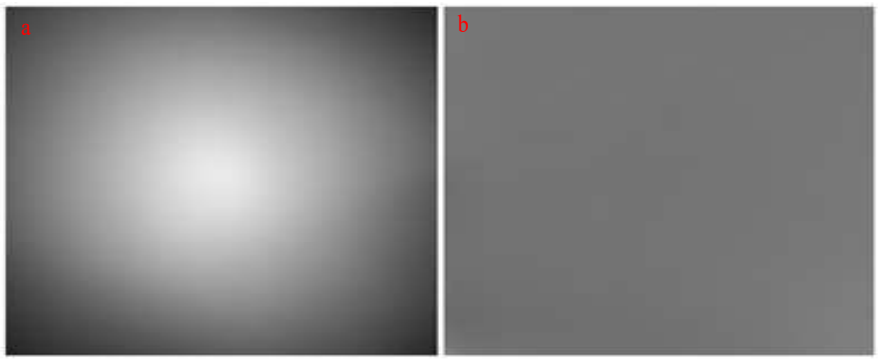
Şekil 3.11. ROI 2 ve çizgisel yoğunluk grafiği.

3.3.3. Gerçek zamanlı görüntülerin düzeltilmesi

Görüntüleme sistemlerinde görüntülerden elde edilen bilgiyi korumak amacı ile çeşitli görüntü işleme metotları mevcuttur. Literatürde olan çalışmalar ve yapılan deneyler neticesinde elde edilen bulgular homojen alan düzeltmesi ve interpolasyon metotlarının bahsedilen çerçevede lenssiz mikroskoplardan elde edilen görüntüler için uygun olduğunu göstermektedir. Çalışmanın bu kısmında beyaz LED ışıması altında elde edilen görüntülere bahsedilen metotlar uygulanmış ve daha iyi kontrast değeri elde edilmiştir.

Homojen alan düzeltmesi ile amaç, görüntüleme sensörünün piksel hassasiyetindeki değişiklikleri veya optik sebeplerden dolayı meydana gelen görüntü içerisindeki yapay iki boyutlu nesneleri görüntüden çıkarmaktır (Seibert, 1998). Çalışma içerisinde kullanılan görüntüleme sensörü bu işlemi olağan olarak gerçekleştirmektedir. Fakat çalışma içerisinde görüntüleme sensörü üzerindeki lens çıkarılıp, sensör doğrudan kullanıldığından dolayı olağan olarak yapılan işlemler yetersiz kalmaktadır. Ayrıca kullanılan LED kaynaklardan ötürü, elde edilen görüntülerde ışığın yer yer düzensiz dağılımı mevcuttur. Bahsedilen problemleri ortadan kaldırmak amacı ile, elde edilen verilerde kayıp olmaması adına, homojen alan düzeltmesi metodu uygulanmıştır.

Şekil 3.12.'de beyaz LED kaynak varlığında elde edilmiş arka plan görüntüsü ve bu görüntüye homojen alan düzeltmesi uygulandıktan sonra elde edilen görüntü verilmiştir. Görüntülerden de anlaşılacağı üzere, homojen alan düzeltmesi metodunun uygulanması, görüntüleme sisteminde optik kaynaklı oluşan yapay bileşenlerin ortadan kalkmasına ve ışığın homojen bir dağılım sağlamasına olanak sağlamıştır.



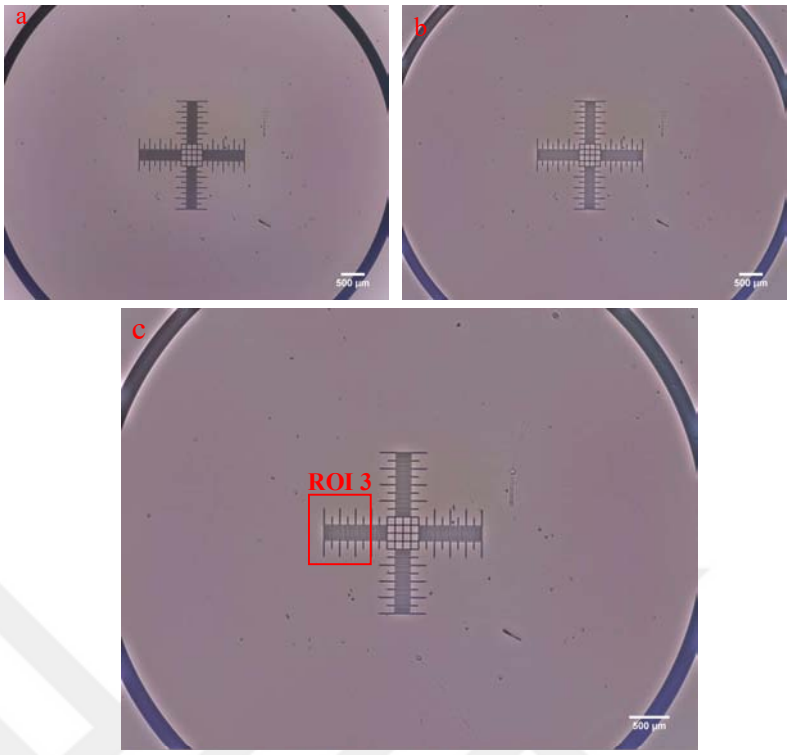
Şekil 3.12. a) Beyaz LED arka plan görüntüsü. b) Homojen alan düzeltmesi uygulanmış görüntü.

İnterpolasyon terimi genel olarak, veri içerisinde var olan değerleri kullanarak bu değerleri ilişkin ara değerler hesaplama yöntemidir. Lenssiz görüntüleme sistemlerinde elde edilen veriler, görüntüleme sensörünün fiziksel boyutu ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu fiziksel kısıtlamayı ortadan kaldırmak amacı ile interpolasyon yöntemleri elde edilen görüntülere uygulanabilir (Greenbaum, 2012).

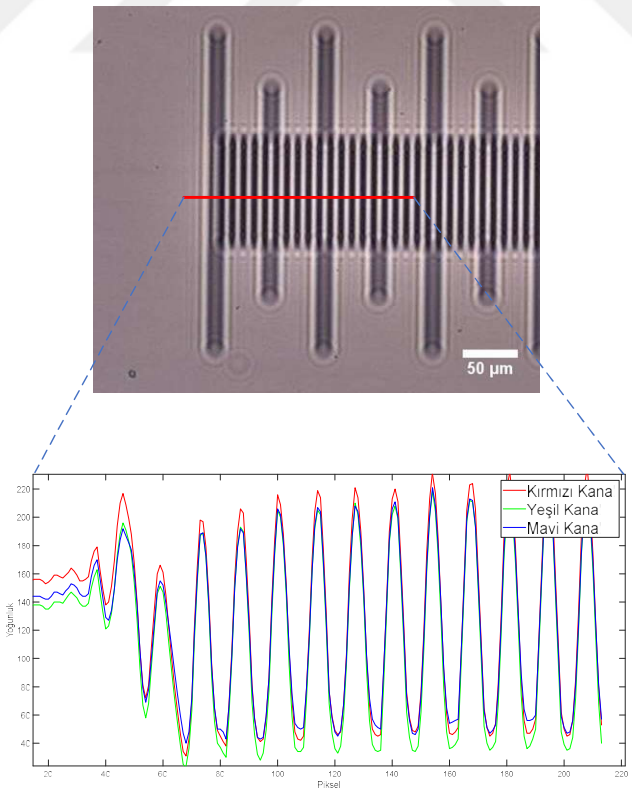
Literatürde çeşitli interpolasyon yöntemleri mevcuttur. Bu çalışmada elde edilen görüntülere kübik interpolasyon metodu uygulanmıştır. Diğer interpolasyon metotları kıyaslandığında hesaplama yoğunluğu fazla fakat diğer yöntemlere oranla daha yumuşak renk geçişleri oluşturmaktadır. Ayrıca görüntü içerisinde bulunan nesnelere keskinlik kazandırması başka bir avantajıdır (Jeon, 2015).

Şekil 3.13'te gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntülere sırası ile homojen alan düzeltmesi ve kübik interpolasyon uygulanmış görüntüler verilmiştir.

Tablo 3.4.'te gerçek zamanlı olarak elde edilen verilere uygulanan görüntü iyileştirme yöntemleri sonucu elde edilen çizgisel yoğunluk verileri verilmiştir. Tabloda var olan değerler elde edilirken ölçek çubuğundan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Gerçek zamanlı olarak elde edilen veriler ile Tablo 3.4.'de olan veriler kıyaslandığında, örnek düzleminin arka planı ile örnek düzleminde bulunan nesleler arasındaki yoğunluk farkının arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.13. a) Çizgisel ölçütün gerçek zamanlı görüntüsü. b) Homojen alan düzeltmesi uygulanmış görüntü. c) Kübik interpolasyon uygulanmış görüntü.



Şekil 3.14. Seçilen ROI 3 ve piksel yoğunluk grafiği.

Tablo 3.4. Düzeltilmiş gerçek zamanlı görüntüye ait çizgisel yoğunluk verileri

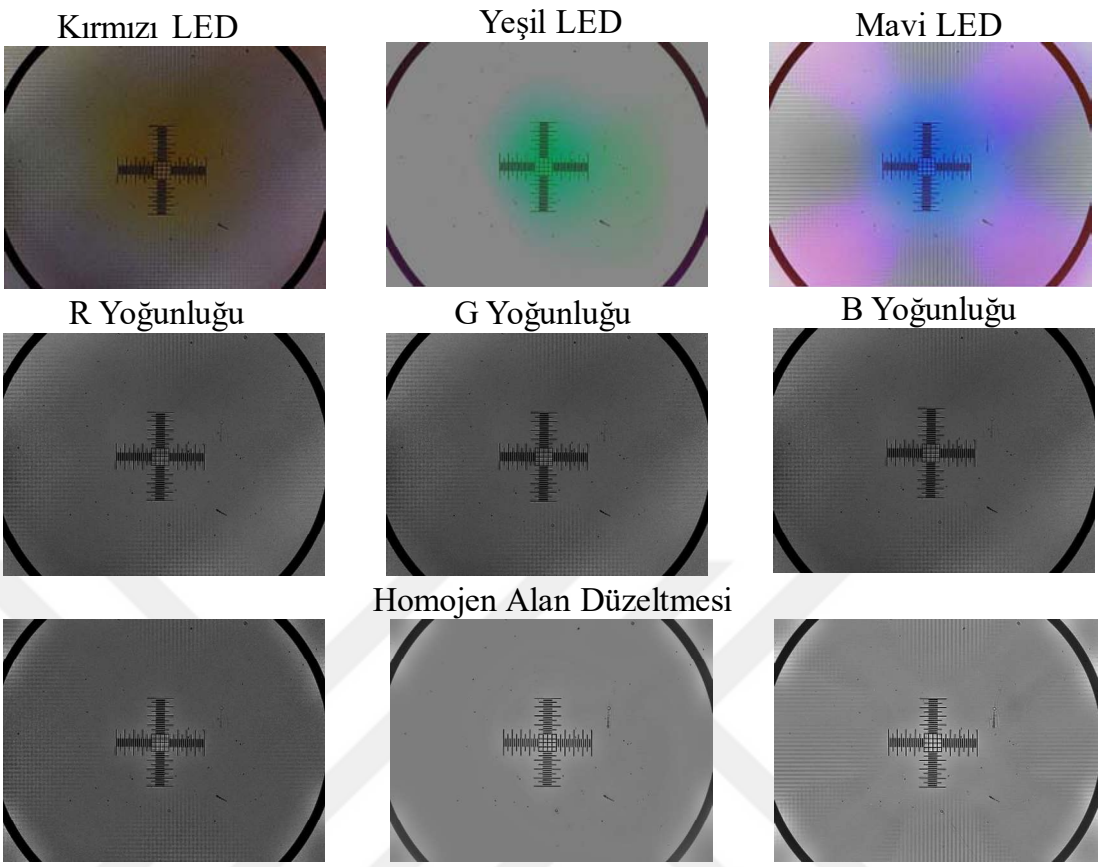
Yoğunluk Kanalı	Maksimum Yoğunluk	Minimum Yoğunluk	Fark
Kırmızı	205	41	164
Mavi	199	48	151
Yeşil	192	33	159

3.3.4. Değişken ışımalar elde edilen görüntülerin birleştirilmesi

Farklı dalga boyuna sahip ışık kaynaklarının, görüntülenecek örneklerde farklı etkileşimler gösterdiği önceki bölümlerde anlatılmıştı. Lenssiz görüntüleme sistemlerinde ise elde edilen görüntü, örnek düzleminde bulunan tıbbi örneğin ışın geçirme oranı ile oluşmaktadır. Bu iki bilginin doğru şekilde birleştirilmesi lenssiz görüntüleme sistemlerinde elde edilen görüntülerin uzaysal çözünürlüğünün ve görüntülerden elde edilen bilgilerin artmasına olanak sağlamaktadır

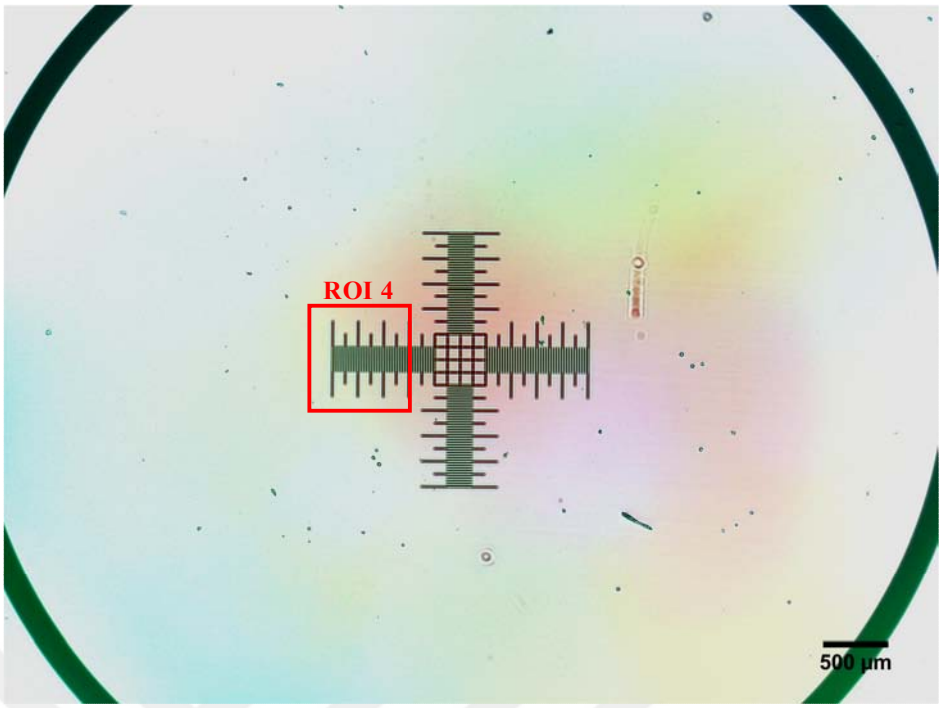
İkincil görüntüleme stratejisi olarak seçilen bu yöntemde; kırmızı, yeşil ve mavi LED kaynaklarından elde edilen yoğunluk bilgilerinden oluşturulmuştur. Elde edilen RGB görüntüler, sensörün LED kaynağa göre maksimum spektral tepkiyi veren renk kanalının seçilmesiyle oluşturulmuştur. Ayrıştırılan tek bir renk yoğunluk bilgisi ihtiva eden görüntülere homojen alan düzeltmesi uygulanmıştır. Homojen alan düzeltmesi ile görüntüler iki boyutlu yapay objelerden arındırılmıştır. Elde edilen düzeltilmiş tek renkli görüntüler RGB görüntü oluşturmak amacı ile bir matris altında toplanmıştır. Elde edilen RGB görüntüye kübik interpolasyon metodu uygulanarak ikincil görüntüleme stratejisi gerçekleştirilmiştir.

Kırmızı LED ışıması ile elde edilen RGB görüntünün R renk yoğunluğu, yeşil LED ışıması ile elde RGB görüntünün G renk yoğunluğu ve mavi LED ışıması ile elde edilen RGB görüntünün B renk yoğunluğu sensörün spektral tepkisinden dolayı tercih edilmiştir. Farklı renk kanallarından elde edilen yoğunluk bilgilerinin hepsine homojen alan düzeltmesi uygulanmıştır. Şekil 3.15.'te bu adımların uygulandığı görüntüler verilmiştir.

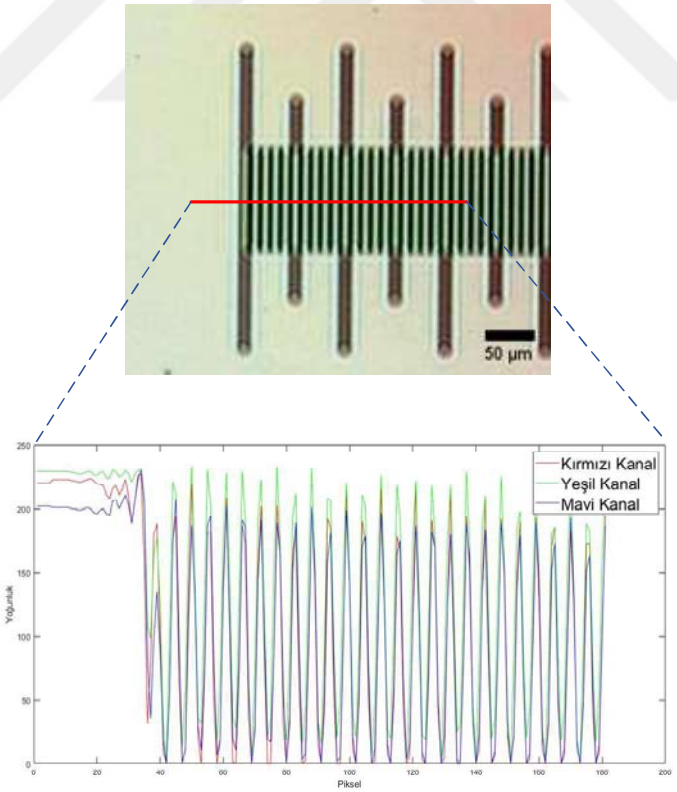


Şekil 3.15. Farklı ışıma ile elde edilen görüntülere uygulanan işlem basamakları.

Şekil 3.16.'da farklı renk yoğunluğuna ait kanalların birleşmesi sonucu elde edilen görüntü verilmiştir. Homojen alan düzeltmesi sonrası bu görüntüye de interpolasyon yöntemi uygulanmıştır. Homojen alan düzeltmesi ile 3280 x 2464 olan görüntü boyutu, interpolasyon işlemi sonucunda 4921 x 3697 boyutuna çıkarılmıştır



Şekil 3.16. Renk yoğunluklarının birleştirilmesi ve interpolasyon uygulanması sonucu elde edilen RGB görüntü.



Şekil 3.17. Seçilen ROI 4 ve piksel yoğunluk grafiği.

Şekil 3.17.'de seçilen ROI 4 ve bu bölgeye ait çizgisel piksel yoğunluk bilgilerinin grafiği verilmiştir.

Tablo 3.5.'de kalibrasyon lamelinin tümünden elde edilmiş piksel yoğunluk verilerinin ortalama değerleri verilmiştir.

Tablo 3.5. Görüntülerin birleştirilmesi ile elde edilmiş yoğunluk verileri

Yoğunluk Kanalı	Maksimum Yoğunluk	Minimum Yoğunluk	Fark
Kırmızı	191	3	190
Mavi	189	7	182
Yeşil	220	16	204

Çalışma içerisinde uygulanan görüntüleme stratejileri göz önünde bulundurulduğunda, stratejiler aralarında belirli avantajlar ve dezavantajlar mevcuttur. Gerçek zamanlı olarak elde edilen görüntülerin kontrast farkları daha düşük olsa bile, gömülü sistem içerisinde çalışması, ön işlem gerektirmemesi ve hızlı çıktılar üretmesi dolayısı ile tercih edilebilir bir stratejidir. Gerçek zamanlı görüntülere homojen alan düzeltmesi ve interpolasyon uygulanması kontrast değerini arttırmıştır. Farklı LED ışımalarından elde edilen görüntülerin birleştirilmesi ile kontrast değeri maksimum farkta elde edilmiştir. Fakat farklı renk yoğunluklarının birleştirilmesi süreci diğer stratejilere göre daha yavaş çalışmaktadır. Sonuç olarak, elde edilen iki farklı görüntüleme stratejisi farklı amaçlar dahilinde, tıbbi örneklere ait bilgileri maksimum bağıntıyla ortaya koymaktadır.

3.4. Kullanılan Görüntü Bölütleme Yöntemi

Doku örneklerinin hazırlanma süreçlerinde çeşitli boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulanmasında amaç, doku örneği içerisinde aynı özellikleri gösteren yapıları aynı renk yoğunluğundaki renkler ile boyamaktır. dolayısıyla renklendirilmiş doku örneklerinin değerlendirilmesi süreçlerinde doğru kategorize edilmesi önemli bir işlemdir (Mccann, 2015).

Lenssiz mikroskopi sistemleri, tıbbi örneklerin üzerinden geçen ışınları görüntüleme sensörü ile toplamasından dolayı, farklı renk yoğunluğuna sahip yapılar farkı yoğunluk katsayıları oluşturacaktır. Ayrıca lenssiz mikroskopi sistemleri geniş görüş alanına sahip

olması, doku örneklerinin değerlendirme süreçlerinde uzmanlara yardımcı olabilecek sistemlerini önemli hale getirmektedir.

Bu bölüm içerisinde, lenssiz mikroskoplar ile elde edilmiş RGB görüntülerin sadece bir kanalına ait yoğunluk bilgilerinin kümelenmesi için kullanılan görüntü bölütleme stratejisinden bahsedilecektir.

3.4.1. K-means algoritması

K-means algoritması, görüntüleri bölütlemek amacı ile kullanılan en yaygın sınıflandırma metotlarından birisidir (Berkhin, 2006). Diğer kümeleme yöntemleri ile kıyaslandığında, hesaplama seviyesi düşük, uygulaması kolay ve hızlı çalışan bir yöntemdir. Fakat başlangıçta belirlenen küme sayısı nedeniyle sonuç üretiminde hassas bir yöntemdir. İstenilen sonuçların elde edilme performansı belirlenen küme sayısı ile doğrudan ilişkilidir.

Genel olarak k-means algoritması; görüntü içerisindeki piksel yoğunluk değerlerini kullanır. Belirlenen rasgele küme merkezleri, uzaklık ölçütü ile güncellenmesi ile işletilir. Denklem (3.1)'de uzaklık ölçütünün genel denklemi verilmiştir.

$$l = \sum_{i=1}^{k} \sum_{l=1}^{s} \left\| v_j^{(i)} - c_i \right\|^p \tag{3.1}$$

Denklem (3.1)'de $p = 1$ olması Manhattan uzaklığını, $p = 2$ olması Öklid uzaklığını $p = \infty$ olması durumu ise Chebyschev uzaklığını formüle etmektedir. Denklem (3.1)'de $v_j^{(i)}$ ifadesi piksel yoğunluk değerini, c_i yoğunluk değerinin önceki küme merkezine olan uzaklığı ifade etmektedir. K-means algoritmasında uzaklık ölçütü Öklid mesafesi ile belirlenmektedir. Öklid mesafesi doğrultusunda her pikselin küme merkezi ile olan yakınlık ilişkisi hesaplanır. Sonraki adımda ise küme merkezi bu değer doğrultusunda güncellenir.

K-means algoritması 4 temel adımdan meydana gelmektedir (Thilagamani, 2011). Bu adımlar;

1. İlk küme merkezi rasgele olarak belirlenir.

2. Görüntüdeki pikseller en yakın kümeye atanır.

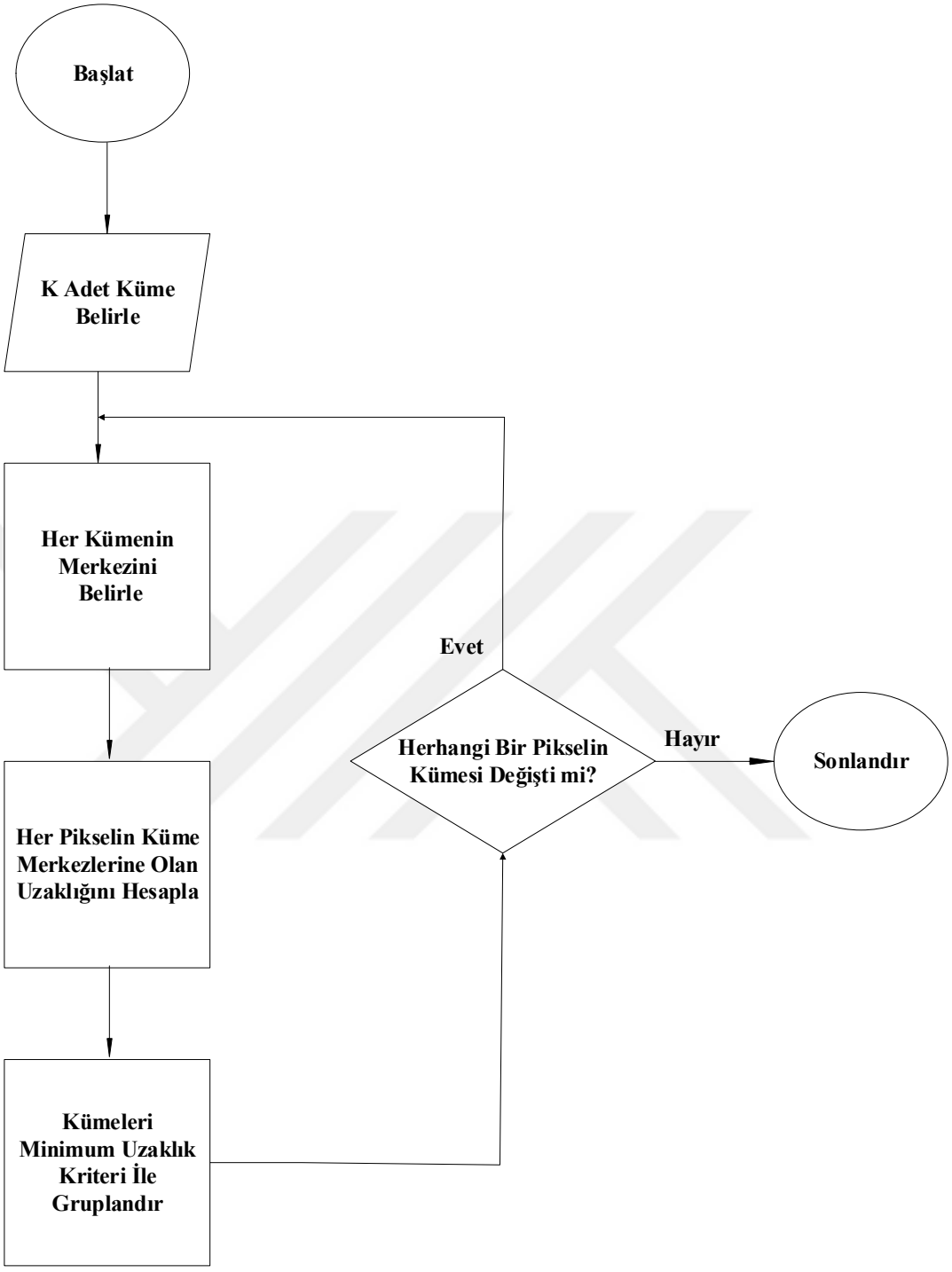
3. Küme merkezleri tekrar hesaplanır.

4. Küme merkezileri değişmeye kadar işlemler tekrar edilir.

3.adımda küme merkezini yeniden belirleme işlemi Denklem (3.2)'de verilen bağıntı ile belirlenir.

$$m_j = \frac{1}{n_j} \sum_{\forall t \in c_j} t \tag{3.2}$$

Burada m_j ifadesi j. kümenin merkez değerini; n_j ifadesi j. küme içerisindeki toplam piksel sayısını ve c_j ifadesi ise j. kümeyi ifade etmektedir. Şekil 3.18.'de k-means algoritmasının akış şeması gösterilmiştir.



Şekil 3.18. K-means algoritmasının akış şeması.

3.4.2. K-means++ algoritması

Küme sayısının önceden belirlenmesi ve belirlenen kümelerin rasgele bir noktadan başlaması k-means yönteminin zayıf noktalarıdır. Rasgele belirlenen küme merkezi zayıflığını gidermek amacı ile önerilmiş çeşitli yöntemler mevcuttur (Sathya, 2011). Görüntü ve veri sınıflandırmasında Arthur tarafından önerilen k-means++ algoritması bu yöntemlerin en efektif çalışanlarından bir tanesidir.

K-means++ kümeleme yöntemini k-means yönteminden ayıran temel kısım ilk küme merkezlerini belirleme sürecidir. Standart k-means yönteminde ilk küme merkezleri rasgele belirlenirken, k-means++ algoritmasında sadece birinci kümenin merkezi rasgele belirlenir ve diğer kümeler ilk küme referans alınarak belirlenir (Arthur, 2007). İlk küme merkezi c_i görüntüde rasgele belirlenir. Daha sonra diğer küme merkezleri c_i, $(i = 2, \dots, k)$ Denklem (3.3)'de verilen olasılık fonksiyonu ile belirlenir.

$$P\left(\frac{d^2(v,c_v)}{\sum_{v \in M} d^2(v,c_v)}\right) \tag{3.3}$$

Denklemdeki $d(v, c_v)$, en yakın küme merkezinin (c_v) veri noktasına olan uzaklığını ifade etmektedir.

K-means++ algoritması; sırası ile aşağıda verilen adımlar ile çalışmaktadır;

1. İlk kümenin merkezi rasgele belirlenir.

2. Diğer küme merkezlerinin ilk değerleri Denklem (3.3) verilen olasılık fonksiyonu ile belirlenir.

3. Küme merkezlerinde değişme olmayana kadar 1.adım ve 2.adım tekrarlanır.

4. Diğer adımlarda standart k-means algoritması işletilir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Veri Seti

Görüntüleme sisteminin test edilmesi ve başarısının ortaya koyulması amacı ile çeşitli boyama yöntemleri ile hazırlanmış muhtelif doku örnekleri kullanılmıştır. Doku örneklerinin muhtelif olarak seçilmesi, görüntüleme sisteminin çeşitli doku boyama yöntemlerinde ve farklı doku yapılarında kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Boyama yöntemleri göz önünde bulundurulduğunda hematoksilin-eozin yöntemi, dokular içerisindeki yapıları ayırmada diğer yöntemlere göre daha başarılı sonuçlar üretmektedir. Hematoksilin-eozin klinik şartlarda, en fazla tercih edilen doku boyama yöntemidir (Chan, 2014). Bu nedenle çalışma içerisinde ağırlıklı olarak hematoksilin-eozin yöntemi ile boyanmış doku örnekleri tercih edilmiştir. Çalışma boyunca, 20 farklı doku türüne ait 72 patolojik örnek lameli kullanılmıştır.

4.2. Görüntüleme Sonuçları

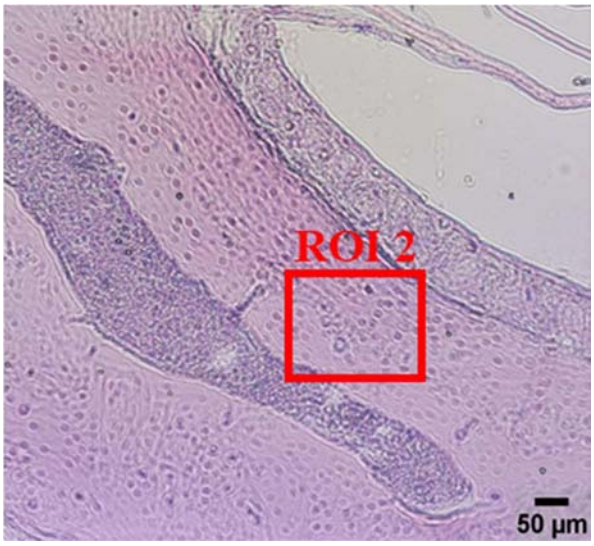
Bu bölüm içerisinde, üretilen görüntüleme sisteminin iki farklı görüntüleme stratejisiyle elde edilmiş görüntülere yer verilmiştir. Tüm görüntülerin sağ alt kısmına 200 µm büyüklüğü temsil eden ölçek çubukları yerleştirilmiştir. Bölüm içerisine konulan görüntüler, 1200 farklı görüntü içerisinden rasgele olarak seçilmiştir.

Şekil 4.1.'de hematoksilin-eozin boyası ile boyanmış muhtelif doku örneğinin gerçek zamanlı görüntüsü verilmiştir. Görüntüleme alanı yaklaşık $10\ mm^2$ boyutundadır.



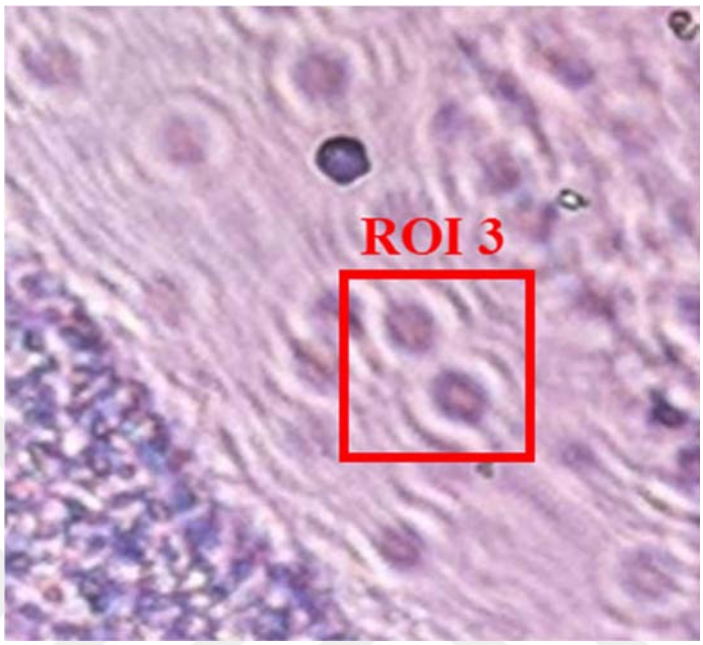
Şekil 4.1. Doku örneği 1'den elde edilmiş görüntü.

Şekil 4.2.'de seçilen ROI 1 verilmiştir. Bu bölgede doku örneği içerisindeki çekirdek yapıları yoğunlukla bulunmaktadır.



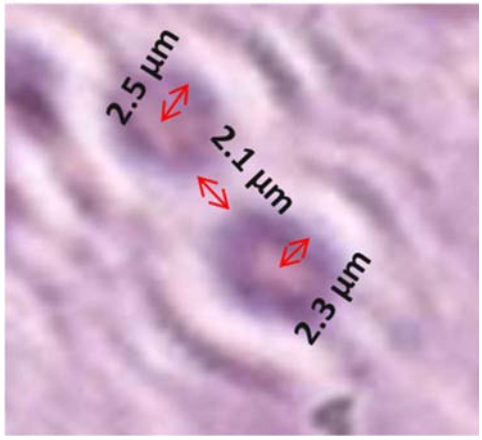
Şekil 4.2. ROI 1 görüntüsü.

Şekil 4.3.'de seçilen ROI 2 verilmiştir. Çekirdek yapıları, lenssiz görüntüleme sisteminin kontak-mod olmasından ötürü kırınım dalgaları ile birlikte görünmektedir.



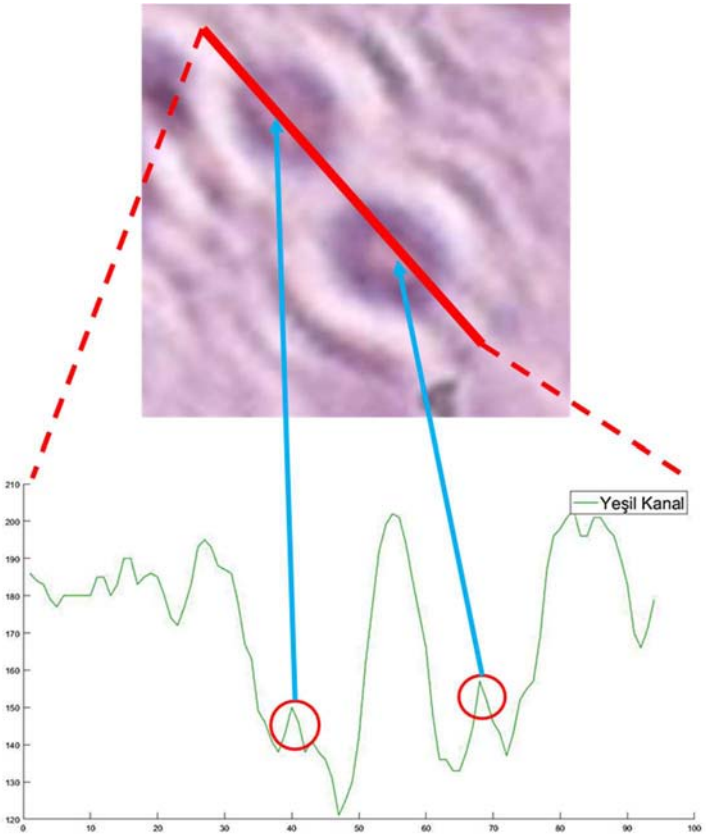
Şekil 4.3. ROI 2 görüntüsü.

Şekil 4.4.'de seçilen ROI 3 görüntüsü verilmiştir. Bu bölgede, 2,50 µm ve 2,30 µm yarıçap büyüklüğüne sahip iki farklı çekirdek yapısı bulunmaktadır. İki çekirdeğin arasında bulunan mesafe 2,10 µm boyutundadır.



Şekil 4.4. ROI 3 ve büyüklükler.

Şekil 4.5'te, Şekil 4.4'de bulunan çekirdek yapılarının yeşil renk kanalında çizgisel yoğunluk grafiğine yer verilmiştir. İki farklı çekirdeğin merkezi, grafik yardımı ile de kolaylıkla ayırt edilebilmektedir.

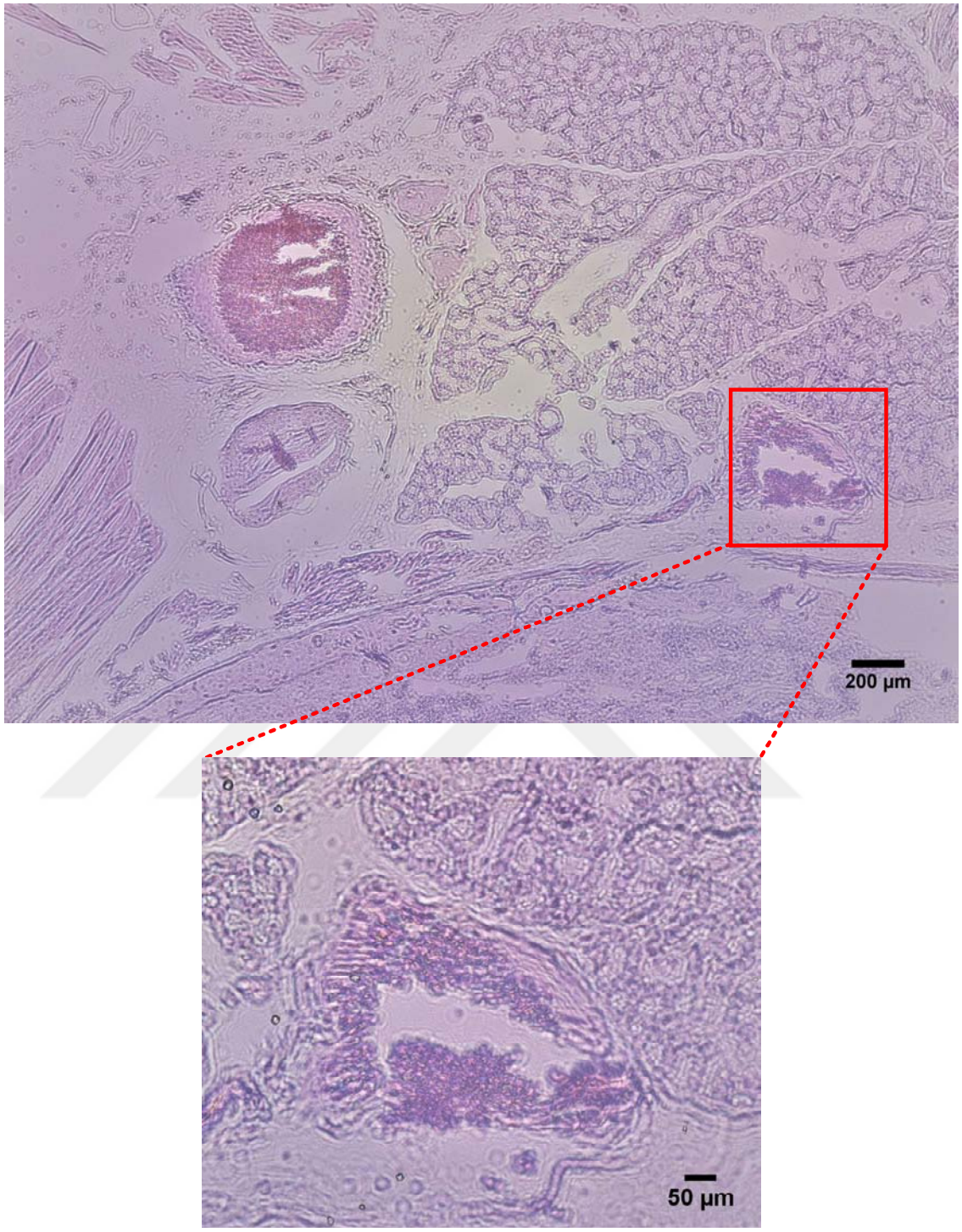


Şekil 4.5. Çekirdek yapıları ve çizgisel piksel yoğunluk grafiği.

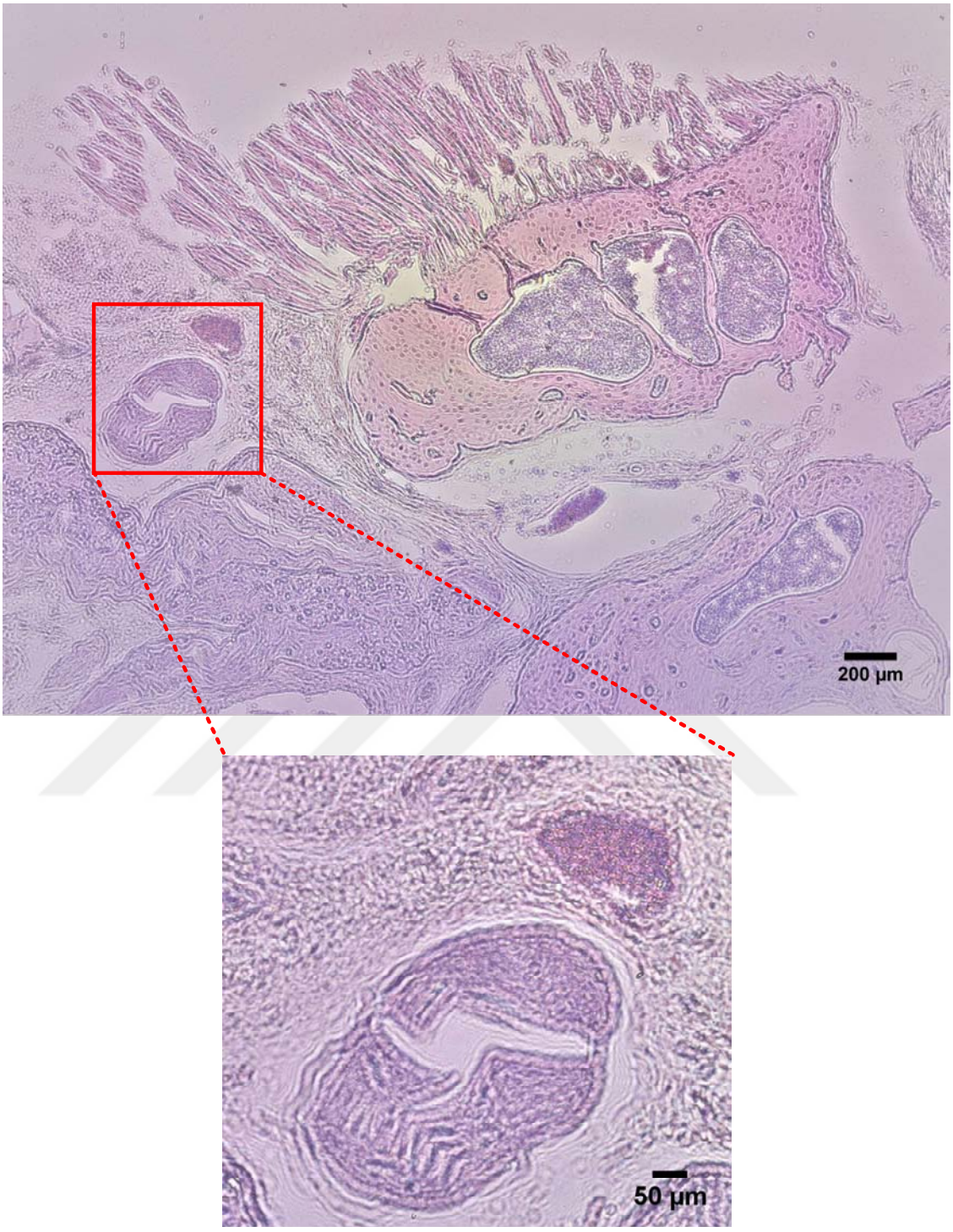
Şekil 4.6 ve Şekil 4.9 arasındaki şekillerde, doku örneklerinden gerçek zamanlı olarak elde edilmiş görüntülere yer verilmiştir.



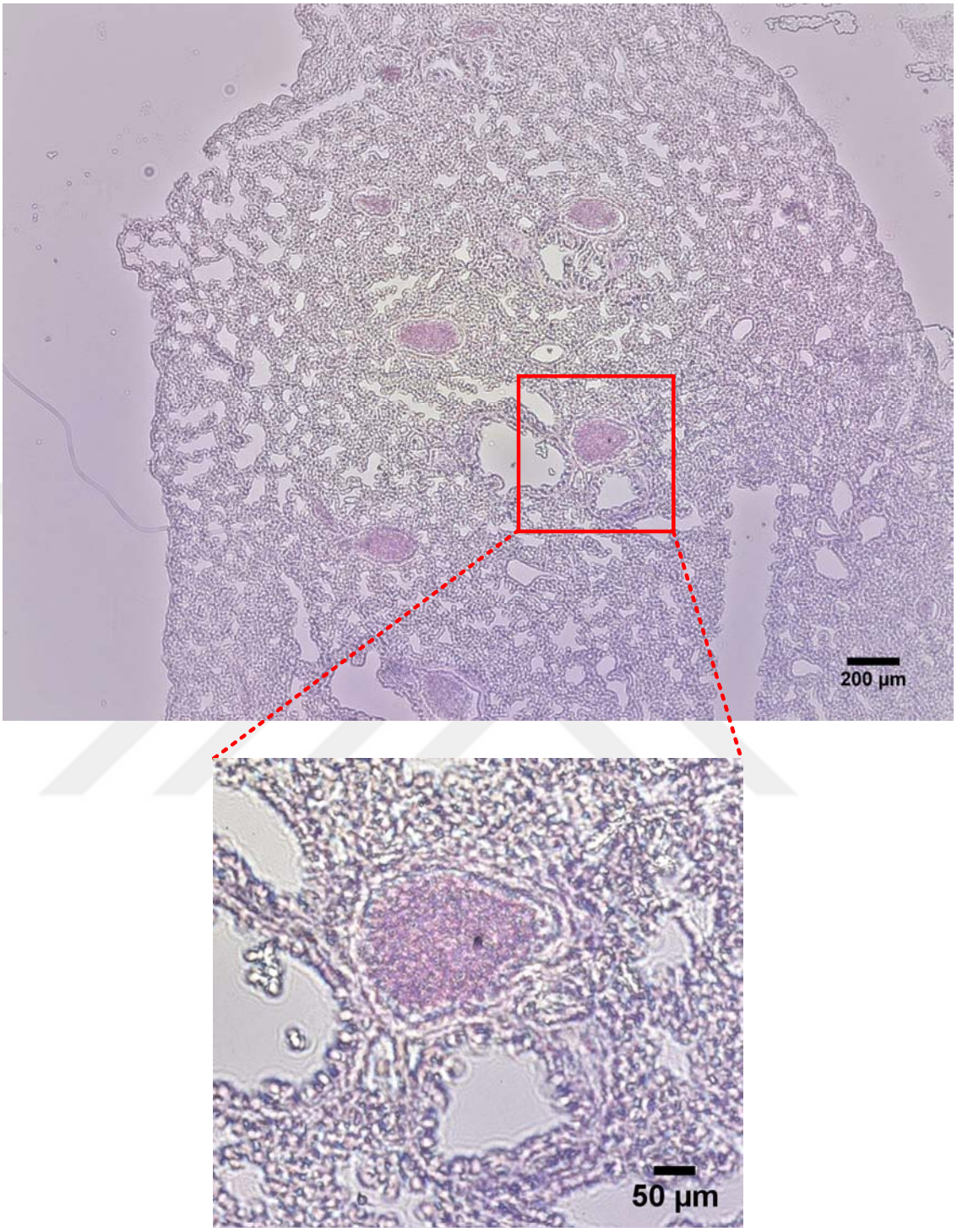
Şekil 4.6. Doku örneği 2'den elde edilmiş görüntü.



Şekil 4.7. Doku örneği 3'ten elde edilmiş görüntü.



Şekil 4.8. Doku örneği 4'den elde edilmiş görüntü.



Şekil 4.9. Doku örneği 5'ten elde edilmiş görüntü.

Şekil 4.10.'da, gerçek zamanlı elde edilen görüntülere homojen alan düzeltmesi ve interpolasyon uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 4.10. Doku örneği 1'e homojen alan düzeltmesi ve interpolasyon uygulanması sonucu elde edilen görüntü.

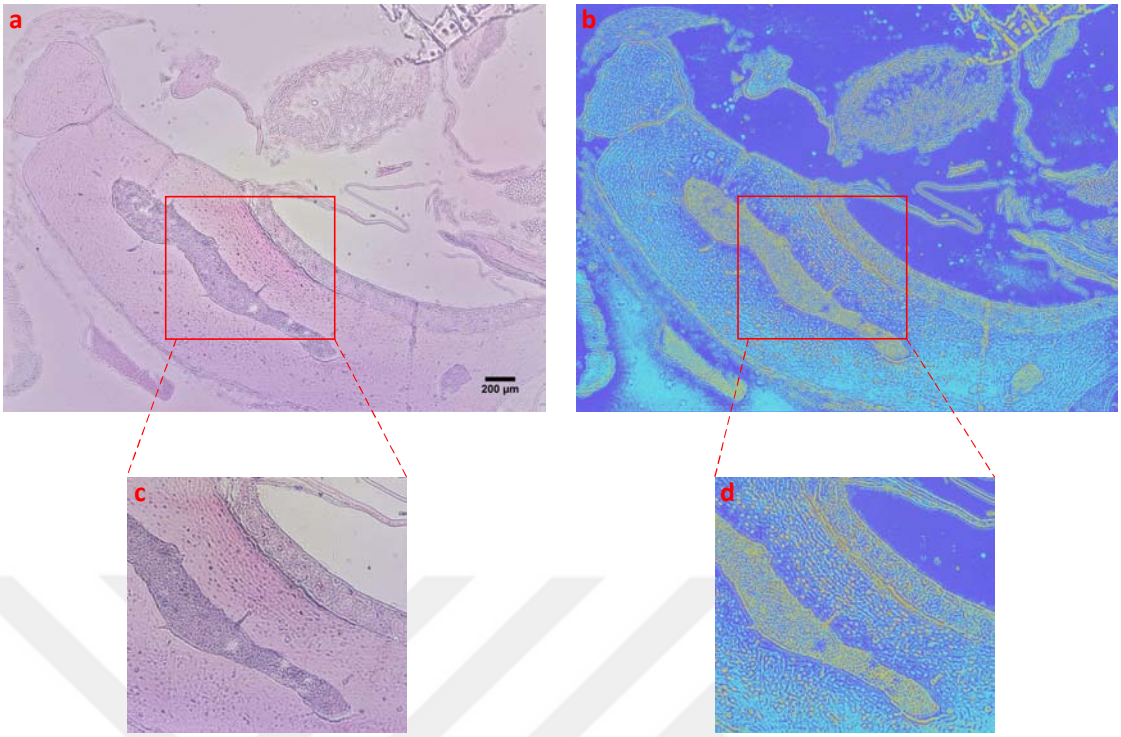
4.3. Bölütleme Sonuçları

Bu bölüm içerisinde k-means++ algoritmasının gerçek zamanlı görüntülere uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar paylaşılmıştır. Üretilen görüntüleme sisteminde, gerçek zamanlı görüntülerin piksel yoğunluk farkının en yüksek yeşil renk kanaldan elde edildiği bir önceki bölümlerde gösterilmişti. Tıbbi örneklere ait görseller kümelenirken; her piksele ait renk yoğunluk bilgisi, uzaklık ölçütü çerçevesinde bir alt kümeye dahil edilmiştir.

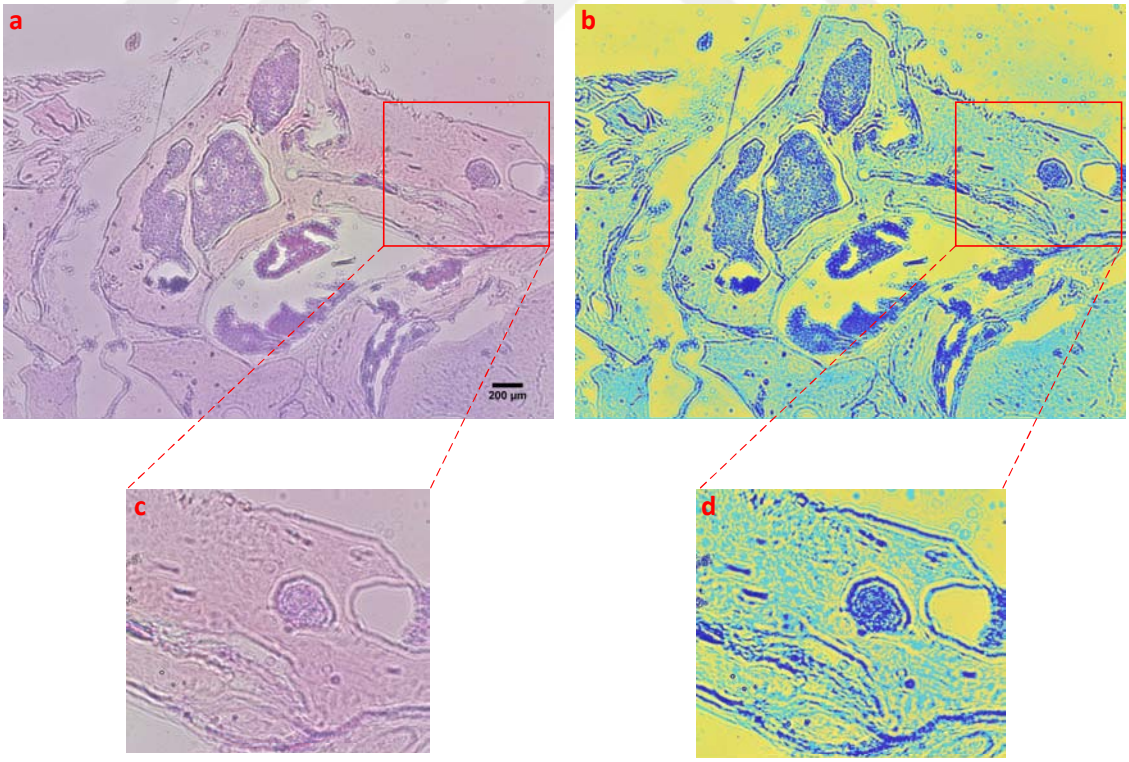
Çalışma içerisinde farklı yapılarda ve çeşitli boyama türleriyle hazırlanmış olduğu için doku örnekleri kümelenirken sabit bir küme sayısı belirlenmemiştir. Küme sayısı, kullanıcıya esneklik sağlaması için, örneği inceleyen uzmanın belirlemesine bırakılmıştır. Çalışma içerisinde bölütlenen görüntülerin küme sayıları, incelenen doku örneğine türüne ve boyama çeşidine göre farklı sayılarda seçilmiştir.

Şekil 4.11'de hematoksilin-eozin boyama yöntemi ile boyanmış doku örneğinin görüntüsü ve kümele sonucu elde edilen sonuç verilmiştir. Kümeleme işleminde küme sayısı 3 olarak alınmıştır. Kümeleme sonucu elde edilen verilerde, hücre çekirdekleri, çekirdek çevresindeki yapılar ve arka plan ayrı ayrı kümelerde yer almıştır. Geniş görüş alanına sahip görüntüleme sisteminde elde edilen verilerin sınıflandırılması ile, uzmanlara görüntüleri değerlendirme sürecinde aynı yapıları aynı alt kümelerde toplayacak algoritma tercih

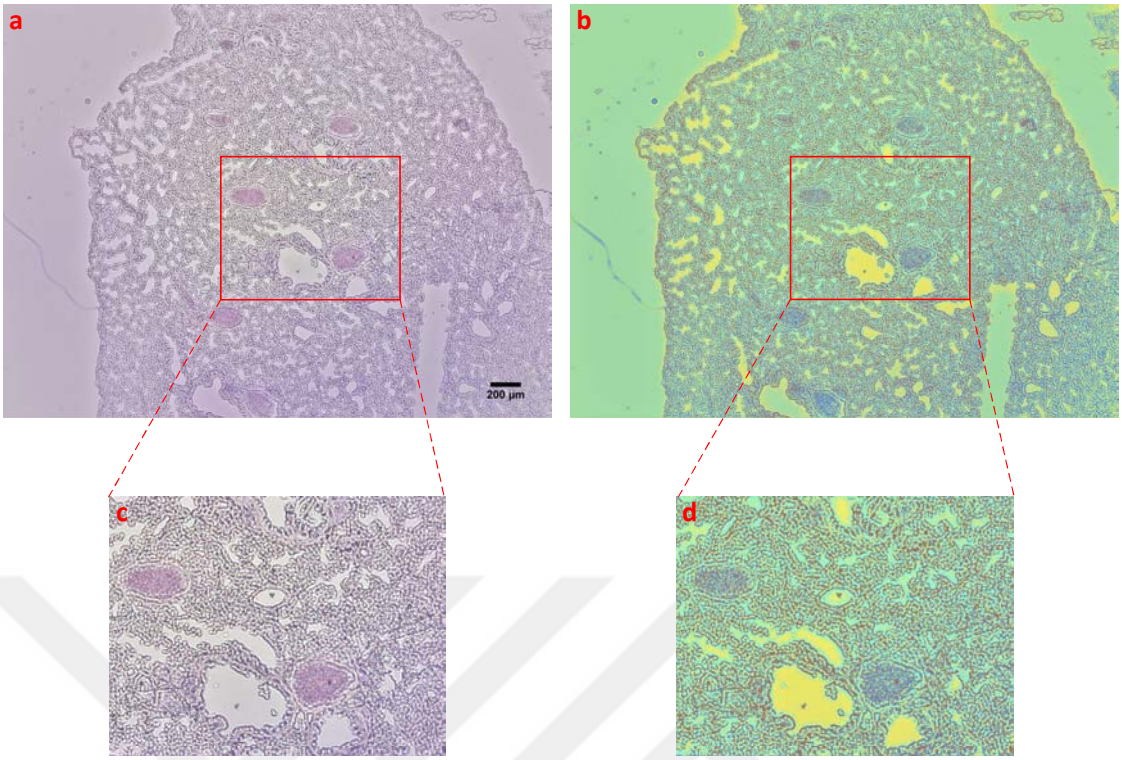
Şekil 4.12. ve Şekil 4.13.'de aynı kümeleme stratejisi farklı doku örneklerine uygulanmıştır. Şekil 4.12.'de küme sayısı 4, Şekil 4.13.'de küme sayısı 5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Doku örneği 1'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu.



Şekil 4.12. Doku örneği 2'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu.



Şekil 4.13. Doku örneği 5'den elde edilen görüntü ve görüntünün kümeleme sonucu.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE GELECEK ÇALIŞMALAR

5.1. Tartışma ve Sonuçlar

Bu tez çalışmasında; lenssiz mikroskopi yöntemlerine dayanan düşük maliyetli, taşınabilir, entegre olabilen açık kaynak kodlu bir görüntüleme sistemi tasarlamış ve üretilmiştir. Üretilen görüntüleme sistemi, tasarımı ve görüntüleme stratejileriyle klinik çalışmalara kolaylık ve farklı bakış açısı kazandıracak niteliktedir. Ek olarak, kullanılan bölütleme algoritması ile, farklı boyama yöntemleri ve doku türlerinde efektif çalışabilecek bir bakış açısı kazandırılmıştır.

Tezin ilk bölümünde genel anlamda bir giriş yapılmış ve lenssiz mikroskopları geliştirmek için yapılan çalışmalar ve lenssiz mikroskopların kullanıldığı önemli çalışmalara yer verilmiştir.

Tezin ikinci bölümünde optik mikroskoplar anlatılmış ve hangi parametrelerin görüntüleme açısından önemli olduğunun üzerinde durulmuştur. Devamında ise lenssiz mikroskopların genel yapısından, önemli parametrelerinden ve çeşitlerinden bahsedilmiştir. Matematiksel eşitlikler ile çözünürlüğün hangi ölçütlere bağlı olduğu gösterilmiştir. En iyi görüntüyü elde edebilmek amacı ile kullanılabilecek materyallerin özelliklerinden bahsedilmiştir. Bölümde, literatürde sıklıkla kullanılan görüntü bölütleme yöntemleri hakkında bilgi verilmiş ve çalışma içerisinde kullanılan yöntem detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Tezin üçüncü bölümünde, literatürdeki çalışmalar ışığında bir görüntüleme sistemi tasarlanma süreci anlatılmıştır. En iyi görüntüyü elde edebilmek amacı ile, kullanılan bileşenlerin birbirleri arasındaki maksimum uyum sağlanma süreçleri anlatılmıştır. Tıbbi örnekleri görüntüleyebilmek amacı ile farklı görüntüleme stratejileri uygulanmıştır.

Üretilen görüntüleme sistemi ve görüntüleme stratejilerinin dairesel ve çizgisel yapıları çözme kabiliyeti, kullanılan kalibrasyon lameli ile gösterilmiştir.

Son bölümünde ise lenssiz mikroskopi sistemi ile görüntüleri alınmış muhtelif doku örneklerine ait görüntüler ve bölütleme sonuçları verilmiştir. Farklı boyama türlerine ve yapılara sahip doku örneklerininden elde edilen görüntüler bu kısımda analiz edilmiştir.

5.2. Öneriler ve Gelecek Çalışmalar

Çip-üstü-laboratuvar sistemleri, sağladığı düşük maliyet ve entegre olabilme gibi çeşitli avantajlar dolayısıyla kullanım alan her geçen gün artırmaktadır. Yakın gelecekte bu sistemlerin daha fazla önem kazanması ve daha geniş kullanım alanına ulaşması öngörülmektedir.

Lenssiz görüntüleme sistemleri ise; hastaya özel teşhis ve tedavi imkânı sunmaktadır. Ayrıca hastalıkların değerlendirilmesinde sağladığı farklı bakış açılarıyla günümüzdeki ve gelecekteki dünyamız için büyük bir kazanımdır.

Yapılan tez çalışmasında, uygulanan tüm yöntemler genel kullanım amacına hitap etmekte olup, kalibrasyon lameli ve muhtelif doku örnekleri ile test edilmiştir. Üretilen görüntüleme sisteminde maliyet, uzaysal çözünürlük ve hız optimum seviyede tutulmuştur. Sonraki olası çalışmalarda; sistemde kullanılan materyalleri ve görüntü oluşturma metotlarını değiştirilmesi daha yüksek uzaysal çözünürlük elde edilmesine olanak sağlayabilir. Elde edilen verilere makine öğrenmesi yöntemlerinin uygulanması mühendislik literatürüne önemli katkıda bulunabilir. Ayrıca üretilen görüntüleme sistemiyle spesifik tıbbi örnekler üzerine yapılacak çalışmalarla tıp literatürüne önemli katkılar sağlanacağına inanılmaktadır.

KAYNAKLAR

Adams, J. K., Boominathan, V., Avants, B. W., Vercosa, D. G., Ye, F., Baraniuk, R. G., ... & Veeraraghavan, A. (2017). Single-frame 3D fluorescence microscopy with ultraminiature lensless FlatScope. Science advances, 3(12), e1701548. doi:10.1126/sciadv.1701548

Allier, C., Vincent, R., Navarro, F., Menneteau, M., Ghenim, L., Gidrol, X., ... & Bornens, M. (2018, February). Dynamic quantitative analysis of adherent cell culture by means of lens-free video microscopy. In Quantitative Phase Imaging IV (Vol. 10503, p. 105031R). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.2289525

Altunbay, D., Cigir, C., Sokmensuer, C., & Gunduz-Demir, C. (2009). Color graphs for automated cancer diagnosis and grading. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 57(3), 665-674. doi:10.1109/TBME.2009.2033804

Arthur, D., & Vassilvitskii, S. (2007, January). k-means++: The advantages of careful seeding. In Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms (pp. 1027-1035). Society for Industrial and Applied Mathematics

Bennett, A. H. (1943). The development of the microscope objective. JOSA, 33(3), 123-128. doi:10.1364/JOSA.33.000123

Berkhin, P. (2006). A survey of clustering data mining techniques. In Grouping multidimensional data (pp. 25-71). Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/3-540-28349-8_2

Bhanu, B., Lee, S., & Ming, J. (1995). Adaptive image segmentation using a genetic algorithm. IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics, 25(12), 1543-1567. doi:10.1109/21.478444

Bishara, W., Su, T. W., Coskun, A. F., & Ozcan, A. (2010). Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution. Optics express, 18(11), 11181-11191. doi:10.1364/OE.18.011181

Chan, J. K. (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, K. T., Chang, Y. J., Chen, C. L., & Wang, Y. N. (2015). Multichannel lens-free CMOS sensors for real-time monitoring of cell growth. Electrophoresis, 36(3), 413-419. doi:10.1002/elps.201400272

Chen, T., Catrysse, P. B., El Gamal, A., & Wandell, B. A. (2000, May). How small should pixel size be?. In Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications (Vol. 3965, pp. 451-460). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.385463

Coskun, A. F., Sencan, I., Su, T. W., & Ozcan, A. (2011). Wide-field lensless fluorescent microscopy using a tapered fiber-optic faceplate on a chip. Analyst, 136(17), 3512-3518. doi:10.1039/c0an00926a

Cui, X., Lee, L. M., Heng, X., Zhong, W., Sternberg, P. W., Psaltis, D., & Yang, C. (2008). Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for Caenorhabditis elegans and cell imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(31), 10670-10675. doi:10.1073/pnas.0804612105

Delacroix, R., Morel, S. N. A., Hervé, L., Bordy, T., Dinten, J. M., Drancourt, M., & Allier, C. (2017). Cerebrospinal fluid lens-free microscopy: a new tool for the laboratory diagnosis of meningitis. Scientific reports, 7, 39893. doi:10.1038/srep39893

Egmont-Petersen, M., de Ridder, D., & Handels, H. (2002). Image processing with neural networks—a review. Pattern recognition, 35(10), 2279-2301

El Gamal, A., & Eltoukhy, H. (2005). CMOS image sensors. IEEE Circuits and Devices Magazine, 21(3), 6-20. doi:10.1109/MCD.2005.1438751

McLeod, E., & Ozcan, A. (2016). Unconventional methods of imaging: computational microscopy and compact implementations. Reports on Progress in Physics, 79(7), 076001. doi:10.1088/0034-4885/79/7/076001

Fang, Y., Yu, N., Jiang, Y., & Dang, C. (2018). High-Precision Lens-Less Flow Cytometer on a Chip. Micromachines, 9(5), 227. doi:10.3390/mi9050227

Fang, Y., Yu, N., Wang, R., & Su, D. (2017). An on-chip instrument for white blood cells classification based on a lens-less shadow imaging technique. PloS one, 12(3), e0174580. doi:10.1371/journal.pone.0174580

Farjam, R., Soltanian-Zadeh, H., Jafari-Khouzani, K., & Zoroofi, R. A. (2007). An image analysis approach for automatic malignancy determination of prostate pathological images. Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 72(4), 227-240. doi:10.1002/cyto.b.20162

Felzenszwalb, P. F., & Huttenlocher, D. P. (2004). Efficient graph-based image segmentation. International journal of computer vision, 59(2), 167-181. doi:10.1023/B:VISI.0000022288.19776.77

Fontaine, R. (2013). The evolution of pixel structures for consumer-grade image sensors. IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing, 26(1), 11-16. doi:10.1109/TSM.2012.2237187

Gabor, D. (1948). A new microscopic principle. doi:10.1038/161777a0

Gest, H. (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. Notes and records of the Royal Society of London, 58(2), 187-201. doi:10.1098/rsnr.2004.0055

Gest, H. (2009). Homage to Robert Hooke (1635–1703): New Insights from the Recently Discovered Hooke Folio. Perspectives in Biology and Medicine 52(3), 392-399. Johns Hopkins University Press. Retrieved June 10, 2019, from Project MUSE database. doi: 10.1353/pbm.0.0096

Gonzalez, R.C., and Woods, R.E., 2002, Digital Image Processing 2nd Edition, PrenticeHall, Upper Saddle River - New Jersey, 567-642.

Göröcs, Z., & Ozcan, A. (2012). On-chip biomedical imaging. IEEE reviews in biomedical engineering, 6, 29-46.doi: 10.1109/RBME.2012.2215847

Gould, S., Gao, T., & Koller, D. (2009). Region-based segmentation and object detection. In Advances in neural information processing systems (pp. 655-663).

Greenbaum, A., Luo, W., Su, T. W., Göröcs, Z., Xue, L., Isikman, S. O., ... & Ozcan, A. (2012). Imaging without lenses: achievements and remaining challenges of wide-field on-chip microscopy. Nature methods, 9(9), 889. doi:10.1038/nmeth.2114

Hirakawa, K., & Parks, T. W. (2005). Adaptive homogeneity-directed demosaicing algorithm. IEEE Transactions on Image Processing, 14(3), 360-369. doi:10.1109/TIP.2004.838691

Hooke, R. (2003). Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon. Courier Corporation

Huszka, G., & Gijs, M. A. (2018). Super-resolution optical imaging: A comparison. Micro and Nano Engineering. doi:10.1016/j.mne.2018.11.005

Isikman, S. O., Bishara, W., Mavandadi, S., Frank, W. Y., Feng, S., Lau, R., & Ozcan, A. (2011). Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(18), 7296-7301. doi:10.1073/pnas.1015638108

Jeon, J., & Paik, J. (2015). Single image super-resolution based on subpixel shifting model. Optik, 126(24), 4954-4959. doi:10.1016/J.IJLEO.2015.09.169

Jeong, H. S., Jang, E. K., Jin, G. S., Seo, S., & Pack, S. P. (2014). High-throughput diatom counting method based on lens-free shadow image analysis. Sensors and Actuators B: Chemical, 193, 864-868. doi:10.1016/j.snb.2013.12.054

Ji, H., Sander, D., Haas, A., & Abshire, P. A. (2007). Contact imaging: simulation and experiment. IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers, 54(8), 1698-1710. doi:10.1109/TCSI.2007.902409

Kim, D. S., Choi, J. H., Nam, M. H., Yang, J. W., Pak, J. J., & Seo, S. (2011). LED and CMOS image sensor based hemoglobin concentration measurement technique. Sensors and Actuators B: Chemical, 157(1), 103-109.doi:10.1016/j.snb.2011.03.032

Kim, S. B., Bae, H., Koo, K. I., Dokmeci, M. R., Ozcan, A., & Khademhosseini, A. (2012). Lens-free imaging for biological applications. Journal of laboratory automation, 17(1), 43-49. doi:10.1177/2211068211426695

Krishnapuram, R., & Kim, J. (2000). Clustering algorithms based on volume criteria. IEEE Transactions on Fuzzy Systems, 8(2), 228-236. doi:10.1109/91.842156

Kwak, Y. H., Lee, J., Lee, J., Kwak, S. H., Oh, S., Paek, S. H., ... & Seo, S. (2014). A simple and low-cost biofilm quantification method using LED and CMOS image sensor. Journal of microbiological methods, 107, 150-156. doi:10.1016/J.MIMET.2014.10.004

Lange, D., Storment, C. W., Conley, C. A., & Kovacs, G. T. (2005). A microfluidic shadow imaging system for the study of the nematode Caenorhabditis elegans in space. Sensors and Actuators B: Chemical, 107(2), 904-914. doi:10.1016/j.snb.2004.12.039

Li, G., Zhang, R., Yang, N., Yin, C., Wei, M., Zhang, Y., & Sun, J. (2018). An approach for cell viability online detection based on the characteristics of lensfree cell diffraction fingerprint. Biosensors and Bioelectronics, 107, 163-169. doi:10.1016/j.bios.2018.01.047

McCann, M. T. (2015). Tools for automated histology image analysis (Doktora Tezi). *Carnegie Melon University Thesis Repo*.

Morel, S. N. A., Delon, A., Blandin, P., Bordy, T., Cioni, O., Hervé, L., ... & Allier, C. (2015, June). Wide-field lensfree imaging of tissue slides. In European Conference on Biomedical Optics (p. 95360K). Optical Society of America. doi.org/10.1364/ECBO.2015.95360K

Mudanyali, O., Erlinger, A., Seo, S., Su, T. W., Tseng, D., & Ozcan, A. (2009). Lensless on-chip imaging of cells provides a new tool for high-throughput cell-biology and medical diagnostics. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (34), e1650. doi:10.3791/1650

Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE transactions on systems, man, and cybernetics, 9(1), 62-66. doi: 0018-9472/79/0100-0062$00.75

Ng, H. P., Ong, S. H., Foong, K. W. C., Goh, P. S., & Nowinski, W. L. (2006). Medical image segmentation using k-means clustering and improved watershed algorithm. In 2006 IEEE Southwest Symposium on Image Analysis and Interpretation (pp. 61-65). IEEE. doi:10.1109/SSIAI.2006.1633722

Ohta, J. (2007). Smart CMOS image sensors and applications. CRC press0 doi: 10.1201/9781420019155.

Pal, N. R., & Pal, S. K. (1993). A review on Image Segmentation Techniques Pattern Recognition, vol. 26. *26*(9), 1277–1294. doi:10.1016/0031-3203(93)90135-J

Pham, D. L., Xu, C., & Prince, J. L. (2000). Current methods in medical image segmentation. Annual review of biomedical engineering, 2(1), 315-337. doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.315

Ram, S., Ward, E. S., & Ober, R. J. (2006). Beyond Rayleigh's criterion: a resolution measure with application to single-molecule microscopy. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(12), 4457-4462. doi:10.1073/pnas.0508047103

Rodenburg, J. M., Hurst, A. C., & Cullis, A. G. (2007). Transmission microscopy without lenses for objects of unlimited size. Ultramicroscopy, 107(2-3), 227-231. doi:10.1016/j.ultramic.2006.07.007

Roy, M., Jin, G., Seo, D., Nam, M. H., & Seo, S. (2014). A simple and low-cost device performing blood cell counting based on lens-free shadow imaging technique. Sensors and Actuators B: Chemical, 201, 321-328.doi:10.1016/j.snb.2014.05.011

Pagnutti, M. A., Ryan, R. E., Cazenavette, G. J., Gold, M. J., Harlan, R., Leggett, E., & Pagnutti, J. F. (2017). Laying the foundation to use Raspberry Pi 3 V2 camera module imagery for scientific and engineering purposes. Journal of Electronic Imaging, 26(1), 013014. doi:10.1117/1.jei.26.1.013014

Saha, M., & Panda, C. (2018). A Review on Various Image Segmentation Techniques for Brain Tumor Detection. International Journal of Scientific Research in Computer Science, Engineering and Information Technology

Saini, S., & Arora, K. (2014). A study analysis on the different image segmentation techniques. International Journal of Information & Computation Technology, 4(14), 1445-1452.

Salama, K., Eltoukhy, H., Hassibi, A., & El Gamal, A. (2004). Modeling and simulation of luminescence detection platforms. biosensors and bioelectronics, 19(11), 1377-1386. doi:10.1016/j.bios.2003.12.031

Satapathy, S. C., Raja, N. S. M., Rajinikanth, V., Ashour, A. S., & Dey, N. (2018). Multi-level image thresholding using Otsu and chaotic bat algorithm. Neural Computing and Applications, 1-23. doi:10.1007/s00521-016-2645-5

Sathya, B., & Manavalan, R. (2011). Image segmentation by clustering methods: performance analysis. International Journal of Computer Applications, 29(11), 27-32.

Seibert, J. A., Boone, J. M., & Lindfors, K. K. (1998, July). Flat-field correction technique for digital detectors. In Medical Imaging 1998: Physics of Medical Imaging (Vol. 3336, pp. 348-355). International Society for Optics and Photonics. doi:10.1117/12.317034

Sencan, I., Coskun, A. F., Sikora, U., & Ozcan, A. (2014). Spectral demultiplexing in holographic and fluorescent on-chip microscopy. Scientific reports, 4, 3760. doi:10.1038/srep03760

Seo, D., Oh, S., Lee, M., Hwang, Y., & Seo, S. (2017). A field-portable cell analyzer without a microscope and reagents. Sensors, 18(1), 85. doi:10.3390/s18010085

Seo, S., Su, T. W., Tseng, D. K., Erlinger, A., & Ozcan, A. (2009). Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics. Lab on a Chip, 9(6), 777-787. doi:10.1039/b813943a

Sharma, N., & Aggarwal, L. M. (2010). Automated medical image segmentation techniques. Journal of medical physics, 35(1), 3–14. doi:10.4103/0971-6203.58777.

Silfies, J. S., Schwartz, S. A., & Davidson, M. W. (2016). The diffraction barrier in optical microscopy. Nikon Inc.. https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy [Erişim Tarih 25. 05. 2019].

Singh, K. K., & Singh, A. (2010). A study of image segmentation algorithms for different types of images. International Journal of Computer Science Issues (IJCSI), 7(5), 414.

Sluder, G., & Nordberg, J. J. (2007). Microscope Basics. *Methods in Cell Biology*, *81*, 1–10. doi:10.1016/S0091-679X(06)81001-0

Steingart, K. R., Henry, M., Ng, V., Hopewell, P. C., Ramsay, A., Cunningham, J., ... & Pai, M. (2006). Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. The Lancet infectious diseases, 6(9), 570-581. doi:10.1016/S1473-3099(06)70578-3

Swamy & Sandeep, Dwivedi, Madhu & Dubey, Amita & Verma, Yamini. (2019). The advent of digital pathology: A depth review. Journal Of Entomology And Zoology Studies. 7. 43-49

Thilagamani, S., & Shanthi, N. (2011). A survey on image segmentation through clustering. International Journal of Research and Reviews in Information Sciences, 1(1), 14-17

Tseng, D., Mudanyali, O., Oztoprak, C., Isikman, S. O., Sencan, I., Yaglidere, O., & Ozcan, A. (2010). Lensfree microscopy on a cellphone. Lab on a Chip, 10(14), 1787-1792. doi:10.1039/c003477k

Wu, Y., & Ozcan, A. (2018). Lensless digital holographic microscopy and its applications in biomedicine and environmental monitoring. Methods, 136, 4-16. doi:10.1016/j.ymeth.2017.08.013

Xu, W., Jericho, M. H., Meinertzhagen, I. A., & Kreuzer, H. J. (2001). Digital in-line holography for biological applications. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(20), 11301-11305. 11301–11305. doi:10.1073/pnas.191361398

Yin, K., Yan, S., Song, C., & Zheng, B. (2019). A robust method for segmenting pectoral muscle in mediolateral oblique (MLO) mammograms. International journal of computer assisted radiology and surgery, 14(2), 237-248. doi:10.1007/s11548-018-1867-7

Yılmazbayhan, E. D. (2017). Toraks Patolojisinde Frozen İncelemesi, 45–52. doi:10.5578/tbc.2017.014

Yuksel, M. E. (2006). A hybrid neuro-fuzzy filter for edge preserving restoration of images corrupted by impulse noise. IEEE Transactions on Image Processing, 15(4), 928-936. doi: 10.1109/TIP.2005.863941

Zheng, G., Lee, S. A., Antebi, Y., Elowitz, M. B., & Yang, C. (2011). The ePetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (SPSM). Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(41), 16889-16894. doi: 10.1073/pnas.1110681108

ÖZGEÇMİŞ

Muhammed Ali PALA, [redacted] İlk ve orta eğitimini Zara'da, lise eğitimini Sivas'ta tamamladı. 2012 yılında Gültepe Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2012 yılında başladığı Erciyes Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nü 2017 yılında bitirdi. 2017 yılında Erciyes Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2017 yılında Sakarya Üniversitesi'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Akabinde yüksek lisans eğitimine Sakarya Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde devam etti. Halen Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.