

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MALZEMEYE VE HÜCRESEL
ÖZELLİKLERE AİT İMGELERİN GÖRÜNTÜ İŞLEME
TEKNİKLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ASSESSMENT OF IMAGES RELATED TO MATERIALS
AND CELLULAR FEATURES IN TISSUE ENGINEERING
BY IMAGE PROCESSING TECHNIQUES**

TANSEL UYAR

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

**DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MALZEMEYE VE HÜCRESEL
ÖZELLİKLERE AİT İMGELERİN GÖRÜNTÜ İŞLEME
TEKNİKLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**ASSESSMENT OF IMAGES RELATED TO MATERIALS
AND CELLULAR FEATURES IN TISSUE ENGINEERING
BY IMAGE PROCESSING TECHNIQUES**

TANSEL UYAR

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

DR. ÖĞR. ÜYESİ AYKUT ERDAMAR

Tez Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

TANSEL UYAR'ın hazırladığı “**Doku Mühendisliğinde Malzemeye ve Hücresel Özelliklere Ait İmgelerin Görüntü İşleme Teknikleri ile Değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**’ nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Osman EROĞUL
Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



Prof. Dr. Selma MUTLU
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Feyzi AKŞAHİN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma ama iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

25/07/2018



Tansel Uyar

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bir üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/07/2018



Tansel Uyar

ÖZET

DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE MALZEMEYE VE HÜCRESEL ÖZELLİKLERE AİT İMGELERİN GÖRÜNTÜ İŞLEME TEKNİKLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Tansel Uyar

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Eş Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aykut ERDAMAR

Temmuz 2018, 172 sayfa

Görüntü işleme teknikleri, çeşitli görüntüleme tekniklerine ait imgelerden kantitatif bilgilerin elde edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Doku mühendisliği ve hücre biyolojisi alanındaki imge analizleri, uzmanlık gerektiren ve zaman alan bir süreçtir. Aynı zamanda analizlerin subjektif sonuçları içermesi olasılığı da yüksektir. Bu nedenle, bilgisayarlı öğrenme/görme tabanlı uygulamalar son yıllarda hızla gelişmektedir. Gelişen uygulamalar sayesinde, kullanıcı bağımlı yazılımlar (ImageJ, DiameterJ vb.) yerine yarı-otomatik ya da tam-otomatik yazılımlar tercih edilmektedir. Kullanıcı etkisinin azaltılması amacıyla tercih edilen otomatikleştirilmiş yazılımlar ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilerek, çalışma sonuçlarının doğru yorumlanması sağlanmaktadır. Otomatikleştirilmiş yazılım kullanımı, araştırmanın gelecek çalışmalarında yanlış yönlendirmeyi de önlemektedir. Hücre ve doku mühendisliği çalışmalarında otomatikleştirilmiş yazılımlar kullanılarak, hücre ve malzemeye ait özelliklerin belirlenmesinde

çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, hücre tipi, hücre canlılığı ve hücre sayısı gibi hücreye ait özelliklerle birlikte fiber çapı, fiber yönelimi ve gözenek büyüklükleri gibi malzemeye ait özellikler de incelenmiştir.

Sunulan tez çalışması iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde kemik doku rejenerasyonunun hedeflendiği bir araştırmada kullanılmak üzere hücre canlılığı analizi gerçekleştirebilen bir yazılım tasarlanmıştır. Bu yazılımla, hücrelerin doku iskelesindeki canlılıklarının, iskele derinliğine bağlı incelenmesine olanak sağlanmaktadır. Geliştirilen yazılım ile ölü ve canlı hücrelere ait alan yüzdeleri hesaplanabilmektedir. Bu yazılımın test edilebilmesi için 35 imgelik bir veri seti oluşturulmuştur. Oluşturulan veri seti, aljinat ve aljinat-hidroksiapatit (HAp) doku iskelelerine ait lazer taramalı konfokal mikroskobu (LTKM) ile görüntülenmiş hücre kültür imgelerini içermektedir. Tasarlanan algoritma ile iki ayrı analiz gerçekleştirilmiştir. İlk analizde, algoritma ölçüm sonuçları, dört farklı analistin ImageJ ölçüm sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Analist ölçümlerinin ortalaması ile algoritma ölçümlerinin benzeştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, analistlerin kendi aralarındaki ölçüm farklılıkları varyasyon katsayısı (ölçüm sapması) hesaplanarak incelenmiştir. Varyasyon katsayısı değerlerinin, canlı hücre imgelerinde %13,18 ile %98,34 arasında, ölü hücre imgelerinde ise %9,75 ile %126,02 arasında değiştiği belirlenmiştir. İkinci analizde ise, üç ayrı doku iskelesine (aljinat-HAp, geleneksel jelatin-metakrilat (Jel-MA) ve mikrodalga destekli Jel-MA) ait hücre canlılığının derinliğe bağlı değişimi incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, maksimum hücre canlılıkları mikrodalga destekli Jel-MA, aljinat-HAp ve geleneksel Jel-MA iskeleleri için sırasıyla 63 μm , 72 μm ve 90 μm derinliklerinde tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, nanofiber ya da mikro metal çubuk yapılardan oluşan doku iskelelerinin fiziksel özelliklerinin incelenbildiği bir yazılım geliştirilmiştir. Bu yazılımın test edilebilmesi için 46 imgelik bir veri seti oluşturulmuştur. Oluşturulan veri seti, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiş nanofiber ve mikro metal çubuk imgelerini içermektedir. Farklı parlaklık ve karşıtlık özelliklerine sahip 46 adet imgenin bölütlenebilmesi için üç farklı bölütleme yöntemini içeren uyarlamalı bir yaklaşım tasarlanmıştır. Tasarlanan algoritmada kümeleme, yerel eşikleme ve histograma bağlı eşikleme gibi yöntemleri içeren üç farklı bölütleme yöntemi bulunmaktadır. Tasarlanan

yazılımın bölütleme sonuçları, DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar yapısal benzerlik ölçüm (YBÖ) indeksi olarak adlandırılan bir fonksiyon ile karşılaştırılmıştır. Kırkaltı (46) adet imgeye ait bölütleme sonuçları içinde, tasarlanan algoritma 27 adet imgede ve DiameterJ yazılımı ise 19 imgede en iyi sonuçları elde etmiştir. Karşılaştırma süreci sonrasında, doku iskelelerinin bölütlenmiş imgelerinde fiziksel özellikler analiz edilmiştir. Her bir doku iskelesine ait fiber yapı özellikleri (çap aralığı ile çap dağılımı, minimum ve maksimum çap değeri) ile gözenek yapı özellikleri (minimum, maksimum gözenek alanı ve toplam gözenek yüzdesi) tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Rejeneratif doku mühendisliği, hücre canlılığı analizi, uyarlamalı eşikleme, çapraz-ilinti fonksiyonu, kümeleme, yapısal benzerlik ölçüm indeksi, görüntü işleme, otomatikleştirilmiş bölütleme

ABSTRACT

ASSESSMENT OF IMAGES RELATED TO MATERIALS AND CELLULAR FEATURES IN TISSUE ENGINEERING BY IMAGE PROCESSING TECHNIQUES

Tansel Uyar

Doctor of Philosophy, Bioengineering Division

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Co-Advisor: Assist. Prof. Dr. Aykut ERDAMAR

July 2018, 172 pages

Image processing techniques are frequently used to obtain quantitative information from images of various imaging techniques. Image analysis in tissue engineering and cell biology is a time-consuming and specialized process. In addition, evaluation of the results may be subjective. Therefore, computer-based learning/vision-based applications have been developed rapidly in recent years. Instead of user-dependent software (ImageJ, DiameterJ etc.), semi-automatic or full-automatic software is preferred depending on these applications. Repeatable results are obtained with the preferred automated softwares to reduce the user effect, and the correct interpretation of the results is ensured. The use of automated software also prevents the researcher from misleading in

future work. There are various studies in cell and tissue engineering using automated software to determine cell and material properties. In these studies, characteristics of cells such as cell type, cell viability, cell number and properties of fiber such as fiber diameter, fiber orientation, pore size were investigated.

This study consists of two parts. In the first part, a software is designed that can perform cell viability analysis for use in an investigation targeting bone tissue regeneration. It is possible to examine the viabilities of the cells in the tissue scaffold depending on the depth of the scaffold using this software. The percentage of dead and live cell area can be calculated with the developed software. In order to test this software, a data set of 35 images was created. The generated data set includes cell culture images of alginate and alginate-hydroxyapatite tissue scaffolds visualized with laser scanning confocal microscopy (LSCM). Two different analyzes were performed with the designed algorithm. In the first analysis, the algorithm measurement results were compared with the ImageJ measurement results of four different analysts. It has been determined that the average of the analyst measurements is similar to the algorithm measurements. In addition, inter-analyst variabilities of measurements were examined by calculating the coefficient of variation (measurement deviation). The variation of coefficient values was determined from 13.18% to 98.34% for living cell images and from 9.75% to 126.02% for dead cell images. In the second analysis, the depth-dependent variation of cell viability of three different tissue scaffolds (alginate-HAp, conventional gel-MA and microwave-assisted gel-MA) was examined. As a result of this investigation, the maximum cell viability was determined at 63 μm , 72 μm and 90 μm depths for microwave-assisted gel-MA, alginate-HAp and conventional gel-MA scaffolds, respectively.

In the second part of the study, a software was developed to examine the physical properties of tissue scaffolds composed of nanofiber or micro metal rod structures. In order to test this software, a data set of 46 images was created. The generated data set includes images of nanofibers and micro metal rod visualized by scanning electron microscopy (SEM). An adaptive approach was designed that includes three different segmentation methods for segmenting 46 images with different brightness and contrast properties. The designed algorithm has three different segmentation methods including clustering, local

thresholding and histogram-dependent thresholding. The segmentation results of the designed software are compared with the segmentation results of open source code DiameterJ software. The results were compared with a function called structural similarity index measurement (SSIM). In the results of segmentation of 46 images, the designed algorithm obtained the best results for 27 images and DiameterJ software obtained the best results for 19 images. After the comparison process, the physical properties were analyzed in the segmented images of the tissue scaffolds. The pore structure properties (minimum, maximum pore size and total pore percentage) and the fiber structure properties (diameter range, diameter distribution, minimum and maximum diameter value) of each tissue scaffold were determined.

Keywords: Regenerative tissue engineering, cell viability analysis, adaptive thresholding, cross-correlation function, clustering, structural similarity index measurement, image processing, automated segmentation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın tamamlanmasında ve tez süresince, Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubunun tüm imkanlarını sunarak danışmanlığını, yol göstericiliğini, ilgi ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında engin bilgi ve tecrübeleri ile gösterdiği akademik desteği, akademik hayatımın ilk günlerinden doktora çalışmalarımın tamamlandığı son güne kadar bana ayırdığı değerli zamanı ve yine çalışma hayatım süresince bana kendi ailesinden biri gibi davranarak her gün gösterdiği abiliği ile danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut Erdamar'a ve değerli ailesine en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarına başladığım ilk günlerde desteğini esirgemeyen, her türlü sorunumda yardımları ile bana yol gösteren hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Feyzi Akşahin'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince akademik destekleri ve gerçekleştirdiğimiz ortak çalışmalar ile bilgi birikimime gösterdikleri katkılar sebebiyle Sayın Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri ve Sayın Prof. Dr. Erkan Yurtçu hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, olumlu yorum ve görüşleri ile bana ve tezime yön veren hocalarım Sayın Prof. Dr. Selma Mutlu ve Sayın Prof. Dr. Osman Eroğul'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince gösterdikleri katkıları sebebiyle Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarında çalışmalarını sürdüren kıymetli arkadaşlarım Burcu Sarıkaya'ya, Gülseren Irmak'a ve tüm diğer değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Lise günlerimden bu yana birlikte büyüdüğüm can dostum güzel insan Erdinç Polat'a, üniversite yıllarımdan bugüne her türlü huysuzluğuma katlanan can dostlarım güzel insanlar Sercan Yatan ve Hasan Can Öztürk ile hayat arkadaşı dostum Çağıl Kazancı'ya her türlü destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başkent Üniversitesi'nde çalışma hayatıma başladığım günden bu yana hem iş arkadaşlarım hem de dostlarım olan Tuğçe Kantar, Oya Çınar, Berrak Memiş ve Dr.

Öğr. Üyesi Orhan Erdem Haberal ile eski öğrencilerim şimdiki çalışma arkadaşlarım Büşra Kübra Karaca ve Burcu Oltu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında tanışma imkanı bulduğum ve dostluklarıyla manevi destekçilerim olan “Sour Squad” elemanları Can Yalçın Armutçuoğlu, Emre Kani, Can Ali Çetin, Metin Özdemir, Umut Karademir, Gökdeniz Gezer, Hüseyin Tabar, Çınar Yazıcı ve Fatih Tezcan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın en büyük ve en önemli parçası olan, koşulsuz seven, her anımda maddi ve manevi hür türlü desteği gösteren annem Aydan Alev Uyar, babam Ertan Uyar, kardeşlerim Tansu ve Göksu Uyar, dört ayaklı kardeşim Zekai ve tez sürecinde kaybettiğim anneannem Sevim Yüce, dedem Mehmet Niyazi Yüce ve babaannem Naciye Uyar'a en derin saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER	xii
ŞEKİLLER	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Hücre ve Doku	4
2.1.1 Ökaryotik Hücre ve Doku Özellikleri	4
2.2 Doku Mühendisliği	10
2.2.1 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler	10
2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Görüntüleme Teknikleri	12
2.3.1 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	13
2.3.1.1 Elektron kolonu	13
2.3.1.2 Vakum sistemi	16
2.3.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	16
2.3.2.1 Konfokal mikroskopisi prensipleri	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1 Veri Setleri ve Özellikleri	19
3.1.1 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop İmgeleri Veri Seti	20
3.1.1.1 Aljinat ve aljinat-hidroksiapatit (HAp) doku iskeleleri	20
3.1.1.2 Jelatin metakrilat (Jel-MA) doku iskeleleri	21
3.1.1.3 Veri setlerinin kullanımı	21
3.1.2 Taramalı Elektron Mikroskop İmgeleri Veri Seti	22
3.2 Analizde Kullanılan Sistemin Özellikleri	22
3.3 Çalışmanın Algoritma Basamakları	22
3.3.1 Hücrelerin Bölütlenmesi ve Hücre Canlılığı Analizi	22

3.3.2	Fiber Yapıların Bölütlenmesi ve Fiberlerin Özelliklerinin Analizi	23
3.4	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop İmgelerinin Bölütlenmesi.....	25
3.4.1	Renk Katmanlarının Ayrıştırılması ve Ön İşlemler	25
3.4.2	Canlı ve Ölü Hücrelerin Bölütlenmesi.....	28
3.4.2.1	Canlı hücrelerin bölütlenmesi.....	28
3.4.2.2	Ölü hücrelerin bölütlenmesi	29
3.4.2.3	Canlı ve ölü hücre imgelerinin ikili moda dönüştürülmesi ve hücre kenarlarının tespiti.....	30
3.4.3	Doku İskelesinde Canlılığın İncelenmesi.....	31
3.4.4	Doku İskelesinde Derinliğe Bağlı Canlılığın İncelenmesi	31
3.5	Doku İskelesi İmgelerinin Bölütlenmesi	31
3.5.1	Ön İşlemler	32
3.5.2	Yapısal Benzerlik Ölçüm (YBÖ) İndeksi.....	32
3.5.3	Bulanık C-Ortalama Kümeleme Yöntemi.....	34
3.5.4	Bradley-Roth Uyarlamalı Bölütleme Yöntemi	35
3.5.5	Üçgen Metodu ile Bölütleme Yöntemi	38
3.5.6	Bölütleme Yöntemlerinin Seçilim Algoritması	39
3.5.7	Bölütlenmiş İmgelere Uygulanan Morfolojik İşlemler.....	39
3.5.7.1	Küçük nesnelerin temizlenmesi	40
3.5.7.2	Morfolojik kapama işlemi.....	40
3.5.7.3	Morfolojik açma işlemi.....	43
3.5.8	Bölütlenmiş İmgelerin Uzaklık Dönüşüm Metodu ile Analizi	43
3.5.8.1	Fiber çaplarının hesaplanması.....	43
3.5.8.2	Gözenek alanlarının hesaplanması	45
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	46
4.1	Hücre Çalışmalarına Ait Sonuçlar	46
4.1.1	Algoritma ve Analistlere Ait Sonuçların Karşılaştırılması	48
4.1.2	Doku İskelesinde Derinliğe Bağlı Analiz Sonuçları.....	52
4.2	Doku İskelesi Çalışmalarına Ait Sonuçlar	53
4.2.1	Algoritmaya Ait Bölütleme Sonuçları	54
4.2.1.1	Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme.....	54
4.2.1.2	Üçgen metodu ile bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme....	54
4.2.1.3	Üçgen metodu ile bölütleme ve Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme	54
4.2.2	Algoritma ve DiameterJ Sonuçlarının Karşılaştırılması	58
4.2.3	Algoritmaya Ait Çap Analizi Sonuçları	70
4.2.4	Algoritmaya Ait Gözenek Analizi Sonuçları	73
4.3	Tartışma	76

4.3.1	Hücre Çalışmalarına Ait Sonuçların Yorumlanması	76
4.3.2	Doku İskelesi Çalışmalarına Ait Sonuçların Yorumlanması	78
5.	GENEL SONUÇLAR.....	80
	KAYNAKLAR.....	82
	EKLER.....	91
	EK 1: MC3T3-E1 Hücrelerine Ait 35 Adet İmge Veri Seti	91
	EK 2: Aljinat-HAp Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri	94
	EK 3: Geleneksel Jel-MA Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri	96
	EK 4: Mikrodalga Destekli Jel-MA Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri	98
	EK 5: Fiber Bazlı Doku İskelelerine Ait 46 Adet İmge Veri Seti	100
	EK 6: 46 Adet Fiber İmge Veri Setine Ait Çap Dağılım Grafikleri	104
	EK 7: 46 Adet Fiber İmge Veri Setine Ait Gözenek Karakterizasyon Matrisleri.....	127
	ÖZGEÇMİŞ.....	150

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin, malzeme formlarının ve üretim yöntemlerinin özeti.....	11
Çizelge 2.2. Doku mühendisliğinde kullanılan görüntüleme teknikleri ve özellikleri	14
Çizelge 4.1. İmge veri seti analiz sonuçları.....	48
Çizelge 4.2. Analist ölçümlerinin istatistiksel analiz özeti	51
Çizelge 4.3. YBÖ indeks değerlerine göre yöntemlerin karşılaştırılması	68
Çizelge 4.4. Yaklaşımların YBÖ indeks değerleri analizi	70
Çizelge 4.5. Minimum ve maksimum çap değerleri.....	72
Çizelge 4.6. Minimum ve maksimum gözenek alan değerleri	74
Çizelge 4.7. İmgelerdeki toplam gözenek alan yüzdeleri	75

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Ökaryotik hücre yapısı ve organeller [52]	5
Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskop kolonu [70]	15
Şekil 2.3. Lazer taramalı konfokal mikroskopunun şematik görüntüsü [72]	18
Şekil 3.1. Hücre alanı tespiti için tasarlanan algoritmaya ait akış şeması	24
Şekil 3.2. Fiber imgelerinin bölütlenmesi ve sayısal analizinin gerçekleştirilmesi için tasarlanan algoritmaya ait akış şeması	25
Şekil 3.3. LTKM tekniği ile görüntülenmiş hücreye ait işlenmemiş imge	26
Şekil 3.4. Konvolüsyon için kullanılan kenar tespit maskeleri: a) Sobel, b) Prewitt, c) Canny	30
Şekil 3.5. Bir doku iskelesine ait SEM imgesi	32
Şekil 3.6. İntegral imgesinde birinci satır ve sütunun oluşturulması	36
Şekil 3.7. İntegral imgesinin oluşturulması	37
Şekil 3.8. İntegral imgesi için hızlı hesaplama yöntemi	38
Şekil 3.9. Üçgen metodu ile eşikleme değerinin tespiti	39
Şekil 3.10. Bölütlenen imgelerin seçilim algoritması	40
Şekil 3.11. İmgede mantıksal 'veya' işlemi	41
Şekil 3.12. Morfolojik genişletme işlemi	41
Şekil 3.13. İmgede mantıksal 've' işlemi	42
Şekil 3.14. Morfolojik aşındırma işlemi	42
Şekil 3.15. Morfolojik kapama işlemi	42
Şekil 3.16. Morfolojik açma işlemi	43
Şekil 3.17. Uzaklık dönüşüm matrisi [96]	44
Şekil 3.18. İskelet ağaçlarının oluşturulması	45
Şekil 4.1. Ön işlemler uygulandıktan sonra elde edilen imgeler: a) Canlı hücreler, b) Ölü hücreler	46

Şekil 4.2. Eşikleme ve kenar tespiti işlemleri sonucunda elde edilen imgeler: a-c) Canlı hücreler, b-d) Ölü hücreler	47
Şekil 4.3. Hücre iskelelerindeki canlılığın derinliğe bağlı analizi	52
Şekil 4.4. Maksimum hücre canlılığının elde edildiği üç ayrı doku iskelesi imgesi: a) Aljinat-HAp (72 μm), b) Geleneksel Jel-MA (90 μm), c) Mikrodalga destekli Jel-MA (63 μm).....	53
Şekil 4.5. Bradley-Roth ve bulanık c-ortalama yöntemlerinin seçimi.....	55
Şekil 4.6. Üçgen ve bulanık c-ortalama yöntemlerinin seçimi	56
Şekil 4.7. Üçgen ve Bradley-Roth yöntemlerinin seçimi.....	57
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları	58
Şekil 4.9. İskeletlendirme ve uzaklık dönüşümü metodu ile çapların hesaplanması	71
Şekil 4.10. Çap değerlerine ait dağılım grafiği	73
Şekil 4.11. Komşuluk ilişkilerine bağlı gözenek öbeklerinin belirlenmesi	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Ortalama
Σ	Toplam
σ	Varyans

Kısaltmalar

3B	3 Boyutlu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
LTKM	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop
GFAP	Glial Fibril Asidik Protein
RNA	Ribonükleik Asit
YBÖ	Yapısal Benzerlik Ölçümü
ATP	Adenozintrifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
HAp	Hidroksiapatit partikül
Jel-MA	Jelatin Metakrilat
OKH	Ortalama Karesel Hata
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
AM	Asetoksimetil
EthD	Etidiyumhomodimer
RGB	Kırmızı Yeşil Mavi
İGS	İnsan Görsel Sistemi
A1	Analist 1
A2	Analist 2
A3	Analist 3
A4	Analist 4

AO	Analist Ortalaması
ASS	Analist Standart Sapması
AS	Algoritma Sonuçları
VK	Varyasyon Katsayısı Yüzdesi
HD	Hücre Durumu
CHİ	Canlı Hücre İmgesi
ÖHİ	Ölü Hücre İmgesi



1. GİRİŞ

İnsanoğlunun tarihindeki dönemler genellikle belirli materyallerden sonra adlandırılır [1]. Klasik çağlar taş, bronz ve demirden sonra adlandırılmışlardır. Son iki yüzyılda, endüstriyel atılımlar belirli materyallerle yakından ilişkilidir. Buhar ve elektrik, birinci ve ikinci sanayi devrimlerinin itici güçleri olarak, çelik ile yakından ilişkiliydi [2]. Silikon kısmen bilgi ve iletişim alanını şekillendirdi. Günümüzde yenilikçi teknolojilerin geliştirilmesi ve bu gelişmelerin başarısı, malzemenin seçimi ile doğrudan ilgili olmuştur [3].

Günümüzde, yenilikçi teknolojiler arasında hızla gelişim gösteren alanlardan biri de doku mühendisliği ve hücre gelişimine ait çalışmalardır. Literatürde, doku mühendisliği ve hücre gelişimi ile ilgili birçok çalışma ile birlikte birçok yöntem geliştirilmiştir [4-7]. Bu yöntemlerden biri olan üç boyutlu (3B) biyoyazıcı son yıllarda hücre ve doku çalışmalarında kullanılan yaygın tekniklerden biri olmuştur [8]. Biyoyazıcı, karmaşık 3B fonksiyonel canlı dokuların veya yapay organların üretilmesi için hücre yüklü biyomateriyalleri hassas bir şekilde dağıtmak amacıyla kullanılan bir 3B fabrikasyon teknolojisidir. Biyoyazıcı stratejileri, henüz erken aşamalarında bile, deri, kıkırdak ve kemik dahil olmak üzere çeşitli nakil edilebilir dokuları üretmek için rejeneratif tıpta potansiyel kullanımlarını fazlasıyla kanıtlamıştır [9]. Doku mühendisliği ve hücre uygulamalarında kullanılan etkili bir başka teknik de elektrostatik eğirme yöntemidir [10-13]. Bir polimer çözeltisine, yüksek voltaj uygulanarak "Taylor Konisi" adı verilen fiziksel yapı oluşturulur. Elektrik alan kuvvetlerinin etkisi sonucu gözlemlenen bu yapı ile nano boyutlarda fiberler elde edilebilmektedir. Bu nanofiber yapıların, bir yüzey üzerine biriktirilmesi ile çok farklı kimyasal ve fiziksel yapıda doku iskeleleri ve materyaller elde edilebilmektedir. Bu materyaller, filtrasyon [14,15], biyosensörler [16,17], kataliz [18], ilaç taşınımı ve farmasötikler [19], tekstil [20,21], kompozit malzeme üretimi [22,23], vb. gibi birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu uygulamalarda, doku iskelelerinin ve hücresel yapıların fiziksel olarak incelenmesinde genellikle Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu (LTKM) kullanılmaktadır. SEM ve LTKM imgeleri araştırmacılar tarafından ImageJ vb. gibi kullanıcı bağımlı yazılımlar kullanılarak incelenmektedir. Doku iskelesi çalışmalarında fiber çapı, fiber yönelimi, gözenek alanı vb. gibi özellikler, hücre çalışmalarında ise hücre tipi, hücre sayısı, hücre

canlılığı vb. gibi özellikler bu tip yazılımlar kullanılarak incelenebilmektedir [24-32]. Ancak, kullanıcı bağımlı yazılımların kullanımına bağlı olarak subjektif sonuçların edilebilmesi ile çalışmaların sonuçlarının doğrudan etkilenebileceği görülmüştür [33,34]. Çalışmaların sonuçlarının elde edilmesinde kullanıcı etkisinin azaltılması ve sonuçların objektif olarak incelenmesinin sağlanması için yarı otomatik ve tam otomatik yazılımların kullanımı yaygınlaşmıştır [35,36].

Literatürde, doku iskelesi ve hücre çalışmaları için çeşitli otomatikleştirilmiş yazılım yaklaşımları bulunmaktadır. Hücre çalışmalarında farklı hücre tiplerinin tespiti, sayılması ve sınıflandırılmasını içeren çeşitli analizler mevcuttur. Bir çalışmada beyin astrositlerinde bulunan işaretli glial fibril asidik proteinlerinin (GFAP) köklerinin tespiti ve bu yapılardaki farklı hücreler sınıflandırılmıştır [37]. Tespit işlemi için Poisson-dağılımı tabanlı minimum hata eşikleme algoritması kullanılırken, sınıflandırma işlemi için ise makine-öğrenmesi tabanlı yaklaşımlar kullanılmıştır. Başka bir çalışmada, fare hipokampusünden elde edilmiş hücre çekirdeğinin kırmızı ve ribonükleik asitin (RNA) yeşil ile boyandığı konfokal mikroskop imgelerinde, hücre çekirdeğine ait bölgeler Watershed algoritması ile belirlenmeye çalışılmıştır [38]. Beyaz kan hücrelerine ait mikroskop imgelerinin incelendiği bir çalışmada, hücrelerin Otsu yöntemi ile tespit edilerek boyama tekniği sonrasında oluşan motiflere bağlı hücrelerin sınıflandırıldığı bir yaklaşım geliştirilmiştir [39]. Canlı ve ölü hücrelerin en küçük karesel hata metodu ile tespit edildiği başka bir çalışmada ise, hemositometrik imgeler kullanılarak tripan boyama tekniği sonucunda boyanan hücreler analiz edilmiştir [40].

Doku iskeleleri çalışmalarında ise iskele yapısını oluşturan nanofiberlerin çapları, yönelimleri ve nanofiberler arasında bulunan gözenek büyüklüklerinin tespit edildiği analizler mevcuttur. Literatürde yer alan bu analizlerde yerel eşikleme [41,42], Otsu yöntemi [43-45], Hough dönüşümü [46], Radon dönüşümü [47], Fourier güç spektrumu analizi [48], dalgacık dönüşümü ile gri seviye eşdizimlilik matrisi analizi [49] ve yeni bir kümeleme yöntemi [50] kullanılarak fiziksel özellikler elde edilmiştir.

Sunulan tez çalışması iki ayrı analiz grubunu içermektedir. İlk grupta, hücre canlılığı analizlerinde kullanılan kalsein asetoksimetil (AM) ve etidiyum homodimer (EthD-1) kimyasalları ile boyanmış hücrelere ait LTKM imgeleri incelenerek hızlı ve güvenilir bir algoritma geliştirilmiştir. Bu algoritmada, çapraz ilinti fonksiyonu ve yeni bir uyarlamalı eşikleme yöntemi kullanılarak canlı ve ölü hücrelere ait alan yüzdeleri

tespit edilmiştir. Geliştirilen bu algoritmanın analiz sonuçları, dört farklı analistin ImageJ yazılımını kullanarak gerçekleştirdiği manuel ölçümleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma ile kullanıcı bağımlı bir yaklaşım tercih edildiğinde analistler arasında oluşabilecek ölçüm farklılıklarına ait sapma yüzdelerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu gruba ait son çalışmada ise, geliştirilen algoritma ile üç farklı doku iskelesine ait imge kümesi, iskele derinliğine bağlı olarak incelenmiştir. Analiz sonucunda elde edilen canlılık yüzdeleri doku iskelelerine ait özellikler temel alınarak karşılaştırılmıştır.

İkinci grup çalışmalarda, SEM görüntüleme tekniği kullanılarak elde edilmiş nanofiber ve mikro metal çubuk imgelerini içeren bir imge kümesi oluşturulmuştur. Literatür özeti verilen çalışmalarda kullanılmamış üç farklı bölütleme tekniğini içeren uyarlamalı bir yaklaşım geliştirilmiştir. C-ortalama kümeleme, Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme ve üçgen metodu ile bölütleme yöntemlerinin kullanıldığı bu algoritmada imgelerin parlaklık ve karışıklık problemlerinden en az etkileneceği bir sistem tasarlanmıştır. Bu sistemde, karar mekanizması olarak yapısal benzerlik ölçüm (YBÖ) indeksi yöntemi kullanılmıştır. YBÖ indeksi ile bölütleme yöntemleri sonucunda elde edilen imgeler, orijinal imge ile yapısal olarak karşılaştırılmış ve bir benzerlik yüzdesi hesaplanmıştır. En yüksek benzerlik yüzdesine sahip iki yöntemle ait imge birleştirilerek, morfolojik işlemlerde kullanılacak son imge elde edilmiştir. Daha sonra uygulanacak iki ayrı morfolojik işlem (açma ve kapama), kullanıcı kontrollü olarak uygulanmıştır. Bölütleme ve morfolojik işlemler sonucunda elde edilen imgeler mesafe dönüşüm algoritması kullanılarak yapılara ait çap dağılımları hesaplanmıştır. İkinci grup çalışmaların son aşamasında, algoritmaya ait bölütlenmiş imgelerin YBÖ indeksi değerleri, literatürde yer alan DiameterJ eklentisine ait bölütlenmiş imgelerin YBÖ indeksi değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, iki yaklaşımın başarı durumu benzerlik yüzdeleri üzerinden değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hücre ve Doku

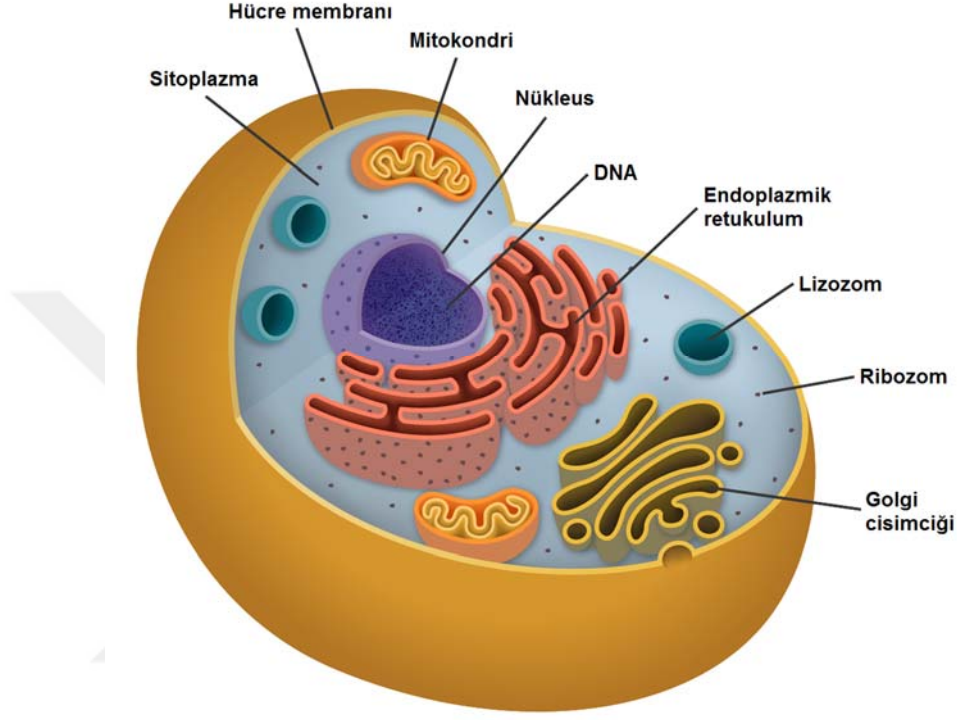
Hücre, canlılık özelliklerini taşıyan, canlının yapı ve görev bakımından en küçük birimdir. Hücre; bir kontrol merkezine, taşıyıcı bir sisteme, güç (enerji) kaynağına, ihtiyaç maddelerini üreten organellere ve atık maddeler ile atık maddeleri paketleyip atma işlemini yapan ünitelere sahiptir. Ökaryotik hücreler karmaşık yapılara sahip olmakla birlikte morfolojik olarak mikroskop altında incelenebilirler. Mikroskop; hücreler üzerinde çalışan biyologların en önemli araçlarından biridir. Hücre organellerinin birçoğu ışık mikroskopunda tanımlanmıştır. Son 30-40 yılda elektron mikroskopunun geliştirilmesi, araştırmacıların, hücrelerin ayrıntılı olarak incelenmesini sağlamıştır.

İnsan vücudundaki hücreler ökaryotik hücre olup, birbirinden bağımsız olarak çalışmaz. Bunun yerine ilgili hücreler, **doku** adı verilen hücre topluluklarında birlikte yaşar ve birlikte çalışırlar. Bir doku, ortak bir işlevi yerine getiren benzer yapıdaki bir hücre grubu olarak tanımlanır. Bununla birlikte, dokular tamamen hücrelerden oluşmaz. Hücreler arasında, hücre dışı matris olan, cansız bir materyal bulunur. Doku sözcüğü, eski Fransızca “örgü” kelimesinden türetilen ve farklı dokuların insan vücudunun “kumaşını” oluşturmak için birbirine dokunduğunu ifade eder. Vücutta bulunan dört temel doku türü, epitel doku, bağ dokusu, kas dokusu ve sinir dokusudur [51].

2.1.1 Ökaryotik Hücre ve Doku Özellikleri

Bir hücrenin yerine getirmek zorunda olduğu işlevler boyutlarını ve şeklini etkilemektedir. Örneğin sperm hücreleri minik, kırbaç şeklinde uzun kuyruklu hücrelerdir, bu kuyruğu, ovuma (yumurtaya) doğru hareket etmesi için kullanır. Ovum kadın vücudundaki en büyük hücrelerden biridir, fakat o bile ancak bir sayfa üzerindeki bir nokta büyüklüğündedir. Vücut yüzeyini saran epitel hücreleri, küçük yapı malzemeleri şeklinde tuğlalara benzer. Kas hücreleri "iğ" şeklinde olup, kasılmak ve gevşemek için özel olarak düzenlenmiştir. Sinir hücreleri çok uzun uzantılara sahiptir ve bu uzantılar sayesinde mesajı (haberi) vücudun en uzak mesafesine kadar ulaştırırlar. Lenfositler beyaz kan hücreleridir. Saldırgan bakterileri yok ederken aynı zamanda dokular arasında akarken şeklini değiştirme yeteneğine sahiptir. Hücrenin içini tamamen dolduran jele benzeyen madde sitoplazma olarak adlandırılır. Hücrenin ihtiyacı olan maddeler sitoplazma içinde

Çözünmüş olarak bulunur. Örneğın sitoplazmada bulunan aminoasitler protein gibi daha büyük molekülleri üretmek için kullanılır. Hücre içine tamamen dağılmış, uzmanlaşmış (özelleşmiş) organeller hücrenin solunumundan, boşaltımından ve metabolizmasından sorumludur yani tüm organellerin özel görevleri vardır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Ökaryotik hücre yapısı ve organeller [52]

Hücre zarı ile kaplanmış, hücre içindeki organeller sitoplazmayı farklı alanlara ayırırlar. Hücreler, ince bir zarla; plazma membranı ya da başka bir deyişle hücre zarı ile çevrilidir. Hücre zarı; hücreyi korurken, maddelerin hücre içine girişlerini ya da hücre dışına çıkışlarını da düzenlemektedir. Ayrıca hücre zarı, diğer hücreler ve organellerle bağlantı kurar. Örneğın; hücre zarının yüzeyinde uzanan bazı proteinler reseptör gibi hareket ederler ve endokrin salgı bezlerinden ya da diğer tip hücrelerden kimyasal mesaj alırlar. Endoplazmik retikulum bir kanallar sistemidir ve hücrenin sitoplazmasına tamamen yayılmıştır. Endoplazmik retikulum bir anlamda hücrenin bir bölümünden, diğer bir bölümüne maddelerin taşındığı bir tünel sistemi gibidir. Bu kanallar sayesinde hücrenin uzak noktaları birbirleri ile temasta bulunmaktadır. İki tip endoplazmik retikulum vardır; düzgün tip ve kaba tip. Kaba

endoplazmik retikulum granüllü bir görüntüye sahiptir. Bu granüller endoplazmik retikulum duvarında yer alan ribozom adı verilen organellerdir. Ribozomlar, proteinlerin üretildiği bir fabrikadır. Golgi cisimciği tabağa benzeyen membran katlarının, tabakalar halinde üst üste gelmesiyle oluşmuştur. Golgi cisimciği, proteinleri işleyen ve paketlemekle görevli organellerdir. Golgi cisimciğinin önemli bir görevi de lizozom üretmektir. Bu küçük keseler bakteri ya da diğer yabancı maddeleri yok eden etkili sindirim enzimleri içerirler. Hücre öldüğü zaman, lizozomların içindeki bu sindirim enzimleri sitoplazma içine dağılır ve hücre bu enzim tarafından kendi kendine parçalanır. Bir organizma öldüğü zaman hücreler hızla bozulur, çünkü yukarıda anlatılan "kendini yok etme" sistemi devreye girmiştir. Hücrelerin güç kaynakları, mitokondri denilen organellerdir. Mitokondrinin içindeki enerji molekülleri parçalanır ve enerji açığa çıkar. Bu olay, hücre içine aktarılan besin maddeleri ile oksijenin birleşmesi sonucu, mitokondride enerjinin açığa çıkması ile gerçekleşir ve hücresel solunum olarak adlandırılır. Bu enerji Adenozintrifosfat (ATP) olarak depo edilir. ATP; madde transferi, kimyasal sentezleme, kas kasılmaları ve sinir uyarıları için gerekli enerjiyi içermektedir. ATP molekülleri, enerjinin kullanılacağı yerlere aktarılır. Silia ise bazı hücre yüzeylerinden uzanan küçük, kıl benzeri organellerdir. Örneğin solunum yollarını döşeyen hücreler silialı hücrelerdir ve bu hücreler solunumla giren kir parçalarını yakalarlar ve akciğerlerden gelen balgamı dışarı atarlar. İnsan sperm hücresi de kamçı şeklinde ince bir kuyruğa sahiptir. Buna flagel denir ve sperm hücresi bu kuyruğu hareket için kullanır [51].

Hücrenin merkezinde, büyük ve yuvarlak bir organel olan çekirdek (nükleus) bulunmaktadır. Görevi hücrede enerji üreten kimyasal reaksiyonları düzenlemek, hücre içi düzeni idare etmek ve bölünerek çoğalmayı sağlamaktır. Bölünme süreci dışında bir hücrede çekirdek, gevşek ve kendi üstüne kıvrılmış kromatin ağı denilen bir madde içerir. Hücrenin bölünme evresi öncesinde, kromatin ağı daha sıkı ve silindirik şeklinde bir gövde oluşturacak biçimde sıkışır buna kromozom denir. Kromozomlar belli lineer dizilmiş birkaç yüz genin sıralı düzenlenmesinden oluşmuştur. Genler kimyasal olarak deoksiribonükleik asit (DNA) dizileridir [51].

Hücre zarı; geçirgenlik (permeabilite) özelliğine sahiptir. Bu geçirgenlik derecesi üç grupta toplanır: Hiç geçirmeyen, yarı geçirgen, seçici geçirgen. Hücre zarı seçici geçirgendir, yani maddeleri seçerek geçirir. Bu olay bazı maddelerin geçişini

önlere, belli maddelerin hücreye giriş ve çıkışına izin vermek şeklinde gerçekleşir. Bazı maddeler difüzyon, ozmoz ve filtrasyon gibi fiziksel yollarla hücre zarından pasif şekilde geçerler. Pasif geçirgenlik hücrenin enerji harcamasını gerektirmez. Diğer maddeler aktif geçirgenlikle hücre içine geçerler. Bu da iki yolla olur: Aktif taşıma ve fagositoz. Aşağıda söz konusu pasif ve aktif aktarım mekanizmaları açıklanmıştır [51].

Difüzyon: İyonların ya da moleküllerin yüksek yoğunluktan düşük yoğunluğa doğru kesintisiz olarak hareket etmesidir. Moleküller azalan yoğunluğa doğru hareket etme eğilimindedir. Difüzyon, moleküllerin kendine özgü rastlantısal hareketlerine bağlıdır.

Ozmoz: İyonlar ve moleküller devamlı olarak yer değiştirirler. İyonlarla moleküllerin birbirine ve bulundukları kabın çeperlerine çarpmasından dolayı ozmotik basınç oluşur. Yarı geçirgen zar ile ayrılmış bir ortamda ozmotik basıncın yüksek olduğu bölgeden, düşük olduğu bölgeye doğru bir geçme eğilimi bulunmaktadır. Geçiş hareketi çok yoğunluğa sahip bölgeden, az yoğun olan bölgeye doğru olur ve suyun basıncı zarın her iki tarafında eşitlenince geçiş hareketi durmaktadır. Bu olaya ozmoz adı verilmektedir. Canlı hücrelerin, hücre içi konsantrasyonları, içinde bulundukları çözeltinin konsantrasyonuna eşit olduğu zaman (izotonik) su molekülü konsantrasyonu da eşittir. Böylece su molekülleri hücreden içeriye ve dışarıya aynı oranda hareket ederler, su moleküllerinin net hareketliliği sıfırdır. Hücreler kendi konsantrasyonundan, daha yoğun bir çözelti içinde (hipertonik) bulundukları zaman, su hücreyi terk eder ve hücrenin büzülmesine, kurumasına ve ileri safhalarda da ölümüne yol açar. Hücreler, iç konsantrasyonlarından daha az yoğun bir çözelti içinde bulundukları zaman (hipotonik) hücre bu çözelti üzerinde ozmotik basınç yapar ve su hücre içine geçer. Hücre içine geçen su molekülleri hücrenin şişmesine, büyümesine ve ileri safhalarda da patlamasına yol açar.

Filtrasyon: Mekanik basınç yoluyla, maddelerin zar arasından geçmesidir. Örneğin kan basıncı, damarlardaki kanın plazma kısmının filtreleme yoluyla kapillerlerin duvarlarından dışarı sızmasına neden olur, bu da dokular arası sıvıları oluşturur.

Aktif İletim: Hücresel enerji gerektirir. Bu süreçte maddeler, düşük yoğunluktan, yüksek yoğunluğa hareket eder. Bu durum, bir enerji gerektirir. Hücre, aktif taşımayı devam ettirmek için ATP enerjisini kullanır.

Fagositoz: Kelime olarak "hücre yemek" anlamına gelir. Fagositozda, hücre, bakteri ve besin gibi katı maddeleri içersine alır (yutar). Hücre zarına ait uzantılar maddenin ya da bakterinin etrafını sarar ve maddeyi gövdenin içine çeker. İçeri alınan bu madde sitoplazmada yüzmeye başlar. Örnek olarak beyaz kan hücreleri, bakterileri bu yöntemle yutarlar, daha sonra lizozomlar bakterilerin hücre zarını eritirler ve güçlü enzimleriyle bakterileri parçalarlar.

Vücutta belli tip hücreler neredeyse sürekli bölünürler. Örneğin, vücutta her saniyede en az on milyon kan hücresi üretilir, diğer bazı hücreler, doğumdan sonra hiçbir şekilde bölünmezler. Yüksek derecede uzmanlaşmış kas ve sinir hücrelerinin kendilerini yenileme yeteneği yoktur. Yaşlandıkları ya da hastalıkla yıkıma uğradıkları zaman giderek azalır. Hücreler bölünmeden önce, kromozomlar tamamiyle kopyalanırlar ve hücre mitoz bölünmeye uğrar. Mitoz bölünmede, kromozom öbeklerinin tamamı ana hücrenin iki ucuna çekilir. Esas hücre bölündükten sonra, oluşan herbir yeni hücre, ana hücrede bulunan aynı sayı ve tipte kromozom içerir. Döllenen bir yumurta bölündüğü zaman, yeni hücreler esas hücrenin tüm genetik bilgilerinin tamamının kopyasını alırlar. Yüzlerce bölünmeden sonra vücuttaki herbir hücre (eşey hücreleri hariç) sperm ve yumurtanın katkıda bulunduğu tamamlanmış orijinal kromozom grubu içerir. Eşey hücreleri mayoz denen kromozom sayılarını ikiye bölen özel bir süreçten geçerler.

İnsan vücudu, dört temel doku tipinden oluşur; epitel, bağ, kas ve sinir dokuları. Bu dokular bileşimlerinde ve işlevlerinde değişiklik gösterir. Her dokunun rolüne dair temel bir anlayış, belirli işlevleri daha kolay anlamaya yardımcı olur:

Epitel doku: Epitel, vücudun yüzey kaplamalarını oluşturur. Bu şekilde koruma, emilim, boşaltım, salgılama, filtrasyon ve duysal alım dahil olmak üzere birçok amaca hizmet eder. Epitelin sınıflandırılması, hücrelerin şekline ve hücrelerin doku içindeki düzenlemesine dayanır.

Bağ doku: Bağ dokusunun ana görevi vücut dokularını birbirine bağlamak ve bazı dokuları, aynı zaman da vücudu ve vücut yapılarını desteklemektir. Ayrıca altındaki organları da korumaktadır. Neredeyse vücuttaki tüm organlar bağ dokusundan oluşan destekleyici bir iskelete sahiptir. Bağ dokusuna ait temel tipler: Gerçek bağ doku; Kemik doku; Kıkırdak doku; Kan, lenf ve kan hücreleri üreten dokular; Yağ dokudur.

Bağ dokusu liflerine ait 3 tip vardır: Kollajen lif, retiküler lif ve elastik lif. Kollajen lifler en çok olanlardır ve sayıca vücutta en çok bulunan kollajen proteinleri içerirler. Kollajen oldukça dayanıklı bir maddedir. Kollajen lifler vücut yapılarına büyük sağlamlık sağlar. Retiküler lifler çok ince liflerdir, ayrıca birçok dokuyu ve organı destekleyen ağı oluştururlar. Elastik lifler kolayca esner ve esnemesi gereken organların önemli bir parçasını oluştururlar. Örneğin akciğer duvarındaki elastik lifler havayla dolduğu zaman akciğerlerdeki hava kabarcıklarının esnemesine ve sonra da nefes verirken havayı ciğerden uzaklaştırmak için kapanmasına izin verir. Gerçek bağ dokusu, vücut parçalarının arasında ince bir dolgu olarak bulunur, su ve tuz deposu olarak görev yapar. Yağ dokusu ile birlikte, gerçek bağ dokusu cildi dokulara ve altındaki organlara bağlayan doku katmanlarını oluştururlar. Yağ dokusu yağ depolar ve vücuda hücresel çalışma için enerji gerektiği zaman onu serbest bırakır. Yağ dokusu vücudun şekil almasına yardım eder ve yalıtım sağlar.

Kas dokusu: Kas dokusu, kasılmak için özelleşmiş hücrelerden oluşmuştur. Kas hücreleri kasıldıktan sonra kısalırlar ve kalınlaşırlar. Kısaldıktan sonra, kaslara bağlı vücut parçasını da hareket ettirirler. Uzun ve dar oldukları için kas hücreleri içcikleri olarak nitelenirler. Kas lifleri çoğunlukla bağ doku tarafından çevrelenmiş olup, yığın ya da katmanlar şeklinde düzenlenmiştir. Kas dokusu, iskelet kası, kalp kası ve düz kas olmak üzere 3 tiptir. Kasları düşündüğümüz zaman, normalinde yürümemizi koşturmamızı ya da diğer bazı şekillerde vücudu hareket ettirmemizi sağlayan istemli kasları düşünürüz. Bu tür hareketler kemiklerle bağlantılı iskelet kaslarının görevidir. İskelet kas lifleri, çizgili görünüme sahiptir. Bu lifler, sinirler tarafından uyarıldığı zaman kasılır. Kalp (kardiak) kası kalbin duvarlarında bulunur, çizgili kaslardan oluşmasına rağmen isteğimiz dışında çalışır. Düz kaslar, sindirim yolunun duvarlarında, uterusda, kan damarlarında ve diğer iç organlarda görülen kaslardır. İsteğimiz dışında çalışırlar. Otonom sinir sistemi ile idare edilirler.

Sinir dokusu: Sinir dokusu, sinir sistemini oluşturan dokudur ve uyarımı ileten uzmanlaşmış nöronlarla, bu nöronları destekleyen ve besleyen glial hücrelerden (sinir sistemini destekleyen dokular ile ilgili hücreler) oluşur. Tipik bir nöron çekirdek ve ondan çıkan iki tip uzantıyı içeren geniş bir hücre gövdesine sahiptir. Dendritler (sinir hücresine giden ince lif) uyarı almak üzere uzmanlaşmışlardır. Buna karşılık tek akson (lif şeklinde nöron uzantısı) bilgiyi hücre gövdesinden uzaklaştırır.

2.2 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik prensiplerinin ve yaşam bilimlerinin uygulandığı, dokunun işlevini veya tüm organı restore eden, koruyan veya geliştiren, biyolojik yapıların geliştirildiği disiplinler arası bir alandır [51]. Doku mühendisliği, doku boşluğunu doldurmak, yapısal destek sağlamak ve organ nakli üzerine vücutta dokuları oluşturma kabiliyetine sahip olan büyüme faktörleri ve/veya hücreleri sağlamak için iskele matrislerini kullanır. Doku mühendisliği/rejeneratif tıp stratejileri, uygun fiziksel ve hücresele sinyallerin dahil edilmesiyle doku ve hücrelerle etkileşimi ve bütünleşmeyi gerektirir. Bu nedenle, biyolojik olarak aktif proteinler ve DNA gibi modifiye edici faktörlerin varlığı başarı için kritik öneme sahiptir. Halen, daha basit yapıdaki dokuların mühendislik yaklaşımlarında başarı sağlanmıştır. Örneğin, hasarlı kıkırdadığın yenilenmesi için birincil kondrositlerin kullanımı yanı sıra hasarlı ciltler için deri hücresi tabakalarının kullanılması gibi [53-55]. Ayrıca, daha büyük ve daha karmaşık doku yenilemeleri, özellikle mesane, doku mühendisliği yaklaşımlarıyla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve gelecekte daha karmaşık doku mühendisliği yöntemleri için umut vaad etmiştir [56].

Temel fonksiyonel doku mühendisliği stratejileri önemli olmasına rağmen, hücre kaynaklarının gelecekteki gelişimi, bireysel olarak özelleştirilmiş hücre destekleri, bağışıklık modülasyonu, vaskülarizasyon ve bilgisayar ile matematiksel modellemenin daha karmaşık materyaller için öngörülmesi gibi yaklaşımların yakın gelecekte kullanılması beklenmektedir. Doku mühendisliği alanında üretilmiş dokularda iki ana yaklaşım kullanılmaktadır. İlkinde, hücrelerin *in vitro* olarak ekildiği hücre destek materyali olarak kullanılan iskeleler ile nakil için kullanılacak dokular üretilmektedir. İkincisinde ise iskeleler, büyüme faktörü ve ilaç taşıyıcı aygıt olarak kullanılmaktadır [6].

2.2.1 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Malzemeler

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için iskele malzemeleri, en geniş haliyle sentetik ya da doğal olarak sınıflandırılabilir. Kökeni ne olursa olsun, bu tür iskele materyalleri, seçilen hücre topluluklarının bağlantısını, bakımını, çoğalmasını ve zaman zaman da farklılaşmasını desteklemeyi amaçlar. Ek olarak, iskele, planlanan anatomik bölge için yeterli form ve yapısal destek sağlamalıdır. Bu gereklilikler çözülmesi zor ve hatta zorlayıcı olan memeli bedenindeki materyalin varlığından dolayı konakçı tepkisinin, yaralı veya eksik dokunun hastanın ömrü boyunca işlevsel

olarak değiştirilmesine izin verebilmelidir. Bu durum, iskelenin çevredeki dokularla organların büyümesine ve gelişmesine adapte olması gereken pediatrik hastalarda özellikle önemlidir. Bir iskele malzemesinin en önemli özelliğinin bileşimi, şekli, mekanik özellikleri, gözenekliliği veya hücre büyümesini destekleme kabiliyeti değil, konakçının iskele malzemesine karşı tepkisinin olduğu tartışılabilir. Malzemenin nakli sırasında ne kadar ideal görüldüğü ve hissettirdiğinden çok, başarının gerçek ölçüsü, malzemenin nakilden 1, 5 ve 10 yıl sonra nasıl görüldüğü ve hissettirdiğidir. Her materyal için artılar ve eksiler olmakla birlikte en iyi iskele malzemesi klinik uygulamaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [57]. Çizelge 2.1’de doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli biyomalzemeler, bu malzemelerin uygulanma formu ve üretim yöntemini özetleyen bilgiler yer almaktadır [58].

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin, malzeme formlarının ve üretim yöntemlerinin özeti

Biyomalzeme	Uygulama Formu	Üretim Yöntemi	Üretilmiş Doku Türü
Doğal kökenli: Kollajen ağ, aljinat, kitosan, fibrin ve hyaluronik asit	Polimerler, hidrojel ya da iskele	Çözücü dökme, kriyo aşındırma, elektrostatik eğirme, mineralizasyon	Kıkırdak, kalp kası
Sentetik kökenli: Poli(glikolik asit), poli(laktik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit), poli(hidroksimetilme takrilat), Kitosan	Hidrojel ya da iskele	Serbest form üretim, çözücü dökme, elektrostatik eğirme	Tendon, vertebra arası disk
Seramik, kalsiyum fosfat, biyocam	İskele, taşıyıcı, kaplama	Doğal kemikten sinterleme, sol-jel işlemi	Kemik için kaplama ya da iskele, kıkırdak için taşıyıcı
Tantal, magnezyum	Metaller, iskele	Metalürjik toz, döküm	Kemik ya da kıkırdak için bağlantı

2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Görüntüleme Teknikleri

Doku mühendisliği alanı sürekli gelişmektedir; mühendislik, moleküler biyoloji, sentetik kimya, eczacılık ve tıp dahil çeşitli alanlardan ileri teknolojiler kullanılarak çok yönlü araştırmalar yürütülmektedir. Doku mühendisliği *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların ötesine ilerlemiştir ve klinik uygulamalara doğru hızla ilerlemektedir. Doku mühendisliği teknolojisi olgunlaştıkça, malzeme inşası için nano ölçekli stratejilere doğru ilerler [59-61]. Bu nedenle araştırmacılar, doku mühendisliği ile ilgili gelişmiş uygulamaları değerlendirmek için, doku mühendisleri sadece morfolojik değil, aynı zamanda fonksiyonel ve moleküler bilgileri de izleyebilen çok yönlü görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç duyarlar [62]. Bu geleneksel metotları kullanarak doku mühendisliği ile üretilen yapıların görüntülenmesi numunelerin tahribatına neden olmakta ve üç boyutlu hacimsel değerlendirmeyi son derece sınırlandırmaktadır. Bununla birlikte, doku mühendisleri için birçok gelişmiş görüntüleme tekniği mevcuttur ve son zamanlarda artan sayıda doku mühendisliği çalışmasıyla, çeşitli gelişmiş görüntüleme yöntemlerinin yaklaşımı keşfedilmeye başlanmıştır [63-65]. Gelişmiş görüntüleme teknikleri, doku mühendisliği ile üretilen yapıların girişimsel olmayan, üç boyutlu ve tutarlı bir şekilde görüntülenmesini sağlar ve böylece geleneksel yöntemlerin sınırlamalarının üstesinden gelir. Doku mühendisliği için ideal görüntüleme yöntemi, hücre altı seviyeden itibaren uygulanabilir olmalı, hayvan ve insan çalışmaları için güvenli, sayısallaştırılabilir ve girişimsel olmayan bir izleme sağlamalıdır. Bu nedenle, ideal görüntüleme teknolojisi, tüm farklı tipte uygulamayı destekleyebilecek, tüm vücuda nüfuz edebilen ve hücre altı seviyede elde edilen sinyalleri çözümleyebilmelidir. Ayrıca, görüntüleme aracı, morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişiklikleri kapsayan tüm gerekli bilgileri görüntülemek için yeterli detayı verebilmelidir. Bununla birlikte, pratikte, doku mühendisliğiyle üretilen yapılar için bilgiler ve tüm uygulamalar için uygun olan tek bir görüntüleme yöntemi bulunmamaktadır. Doku mühendisliği için mevcut olan tüm görüntüleme sistemleri, bir iç veya dış enerji kaynağı (elektromanyetik dalgalar, basınç dalgaları, vb.) ve görüntülenene nesne (dokular, organlar, hücreler, nano-parçacıklar, moleküller, vb.) arasındaki fiziksel etkileşime dayanır. Görüntüleme sistemleri, bir görüntü oluşturmak için nesneden aktarılan enerji değişikliğini tespit eder. Dolayısıyla, uzamsal ve zamansal çözünürlük, geçirgenlik derinliği, iç kaynaklı ve dış kaynaklı uygulanabilir kontrast ajanları, güvenlik ve maliyet gibi tıbbi görüntüleme yöntemlerinin spesifik özellikleri, enerji

kaynaklarının yoğunluğu, dalga boyu ve görüntüleme sisteminin özellikleri ile belirlenir [62,66-69]. Bu nedenle, herbir görüntüleme yönteminin kendi uygulama alanı ve görüntüleme tekniğinin kendine özgü özelliklerinin sağladığı bilgiler bulunmaktadır. Dolayısıyla, doku mühendisliği çalışmalarının gereksinimlerine göre, doku mühendisleri tarafından çeşitli görüntüleme yöntemleri arasından en uygun araç seçilmelidir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan görüntüleme teknikleri X-ışını, bilgisayarlı tomografi, pozitron emisyon tomografisi, tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, ultrason görüntüleme ve optik görüntüleme gibi birçok yöntem (Çizelge 2.2) içermektedir [70,71].

2.3.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

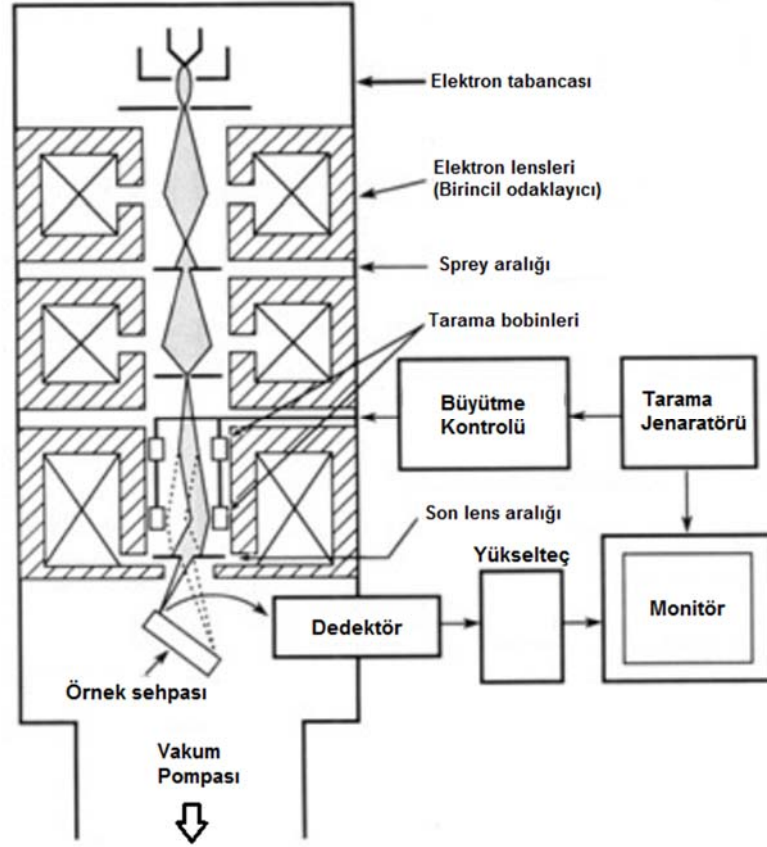
Taramalı elektron mikroskopu, elektronik panel ve elektron kolonu olmak üzere iki ana bileşenden oluşur. Elektronik konsolda filaman akımı, hızlanma voltajı, odaklanma, büyütme, parlaklık ve karşıtlık gibi cihaz ayarlarına izin veren kontrol düğmeleri ve anahtarlar bulunmaktadır. Tüm birincil kontrollere bilgisayar sistemi üzerinden erişilmektedir. Kullanıcının eski tip taramalı elektron mikroskoplarında bulunan kontrol düğmeleri ve anahtarları yerine cihazı kontrol eden grafiksel kullanıcı arayüzü veya yazılım hakkında bilgi sahibi olması yeterlidir. Taramalı elektron mikroskopunda üretilen görüntü, eski tip taramalı elektron mikroskoplarında cihaz üstünde bulunan tüplü tip monitörlerde görüntülenirken, yeni tip mikroskoplarda cihaza bağlı bilgisayar ekranında gözlemlenebilmektedir. Ayrıca mikroskopta yakalanan görüntüler dijital ortamda kaydedilip baskılanabilmektedir.

2.3.1.1 Elektron kolonu

Elektron kolonu, elektron demetinin vakum altında üretildiği, küçük bir çapa odaklandığı ve elektromanyetik saptırma bobinlerinin kullanılmasıyla bir numunenin yüzeyi boyunca tarandığı bölümdür. Kolonun alt bölgesi örnek bölmesi olarak adlandırılmaktadır. İkincil elektron dedektörü örnek bölmesi içerisinde örnek sehпасının üst bölgesinde bulunmaktadır. Örnekler, bir gonyometre ile kontrol edilen sehpaye monte edilir ve sabitlenir. Yazılım ile kontrol edilebilen örnek sehпасı x-y-z eksenlerinde hareket ederken 360° dönebilmekte ve 90° eğilebilmektedir. Şekil 2.2’de elektron kolonuna ait bölümler görülmektedir.

Çizelge 2.2. Doku mühendisliğinde kullanılan görüntüleme teknikleri ve özellikleri

Görüntüleme modeli	Karşıtlık mekanizması	Uzamsal çözünürlük	Geçirgenlik derinliği	Avantajları	Dezavantajları
Ultrason	Akustik yansıma	0.3 mm	10 cm	Girişimsel olmayan, yüksek hız, derin geçirgenlik	Düşük çözünürlük, düşük kimyasal hassasiyet, bağlanma ajanı ihtiyacı
Manyetik rezonans	Foton manyetizasyonu ve boşalımı	1 mm	50 cm	Girişimsel olmayan, derin geçirgenlik	Pahalı, düşük görüntüleme hızı
Çoklu foton mikroskobu Konfokal mikroskop	Floresan yayım, optik saçılım	1 μ m	1 mm	Girişimsel olmayan, hücre seviyesinde çözünürlük, yüksek kimyasal hassasiyet	Yüzeysel geçirgenlik
Optik tutunum tomografisi	Optik geri saçılım	10 μ m	2 mm	Girişimsel olmayan, hücre seviyesinde çözünürlük, yüksek görüntüleme hızı	Yüzeysel geçirgenlik, düşük kimyasal hassasiyet
Fotoakustik tomografi	Optik emilim	0.1 mm	10 cm	Girişimsel olmayan, yüksek fonksiyonel ve kimyasal hassasiyet, derin geçirgenlik	Bağlanma ajanı ihtiyacı
X-ışını görüntüleme	X-ışını emilim	0.1 mm	40 cm	Girişimsel olmayan, derin geçirgenlik, yüksek çözünürlük	İyonize radyasyon, düşük kimyasal hassasiyet
Geçirgenlik/taramalı elektron mikroskopisi	Elektron saçılımı ya da kırılımı	1 nm	0.1 μ m	Nano seviyede çözünürlük	Girişimsel (örnek fiksasyon ihtiyacı), kompleks örnek hazırlama, yüzeysel geçirgenlik
Pozitron emisyon tomografisi	Gama ışını yayımı	5 mm	50 cm	Girişimsel olmayan, derin geçirgenlik, yüksek moleküler hassasiyet	Düşük çözünürlük, ısınimsal işaretleme



Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskop kolonu [70]

Elektron tabancası: 2700K sıcaklıkta tungsten filamandan termiyonik yayılımla üretilen serbest elektronların bulunduğu kolonun üst bölgesinde yer almaktadır. Wehnelt muhafazası içerisindeki filaman, tabancadan çıkan elektronları kontrol etmektedir. Anod boyunca hızlandırılan elektronlar 200V'tan 30kV'a kadar ayarlanabilmektedir.

Toplayıcı lensler: Elektron demeti, anodu geçtikten sonra iki toplayıcı lens ile yönlendirilerek demetin odaklanmasını ve odak noktasından geçmesini sağlamaktadır. Elektron demeti, toplayıcı lenslerde orijinal boyutuna göre 1000 kat büyütülmüş olarak odaklanmaktadır. Seçilen hızlanma voltajı ile bağlantılı olarak, toplayıcı lensler, numuneye çarpan elektron demetinin yoğunluğunun belirlenmesinden sorumludur.

Aralıklar: Mikroskoba bağlı olarak elektron kolonunda bulunan aralıklar bir ya da daha fazladır. Bu aralıkların işlevi, lenslerdeki ikincil elektronları azaltmak ve uzaklaştırmaktır. Tarama bobinlerinin altında bulunan son aralık lensi örneğe ulaşan

elektron demetinin odak büyüklüğünü ya da çapını belirlemektedir. Örneğe ulaşan odak büyüklüğü de alan derinliğini ve çözünürlüğü belirlemektedir. Odak büyüklüğünün küçülmesi çözünürlüğü ve alan derinliğini artırırken, aydınlıkta da görüntü kaybına neden olmaktadır.

Tarama Sistemi: Objektif lensi içinde bulunan saptırma bobinleri kullanılarak elektron demetinin örnek üzerinden taranarak geçirilmesi ile görüntüler oluşturulmaktadır. Objektif lensinde bulunan odak düzeltici manyetik alan kullanarak elektron demetindeki düzensizlikleri azaltmaktadır. Elektron demeti örneğe ulaştığında dairesel bir kesite sahip olmalıdır ancak genellikle eliptik kesite sahip ışının düzenlemesi odak düzeltici kullanılarak kontrol edilir.

Örnek Bölümü: Kolonun alt bölümünde örnek sehpa ve kontrolcüler bulunmaktadır. Örnekten gelen ikincil elektronlar, pozitif bir yük ile dedektöre çekilir.

2.3.1.2 Vakum sistemi

Taramalı elektron mikroskobunun kontrollü bir elektron demeti üretebilmesi için elektron kolonunun en az 5×10^{-5} torr basınç altında olması gerekmektedir. Çeşitli nedenlerle yüksek vakum ihtiyacı bulunmaktadır. İlk olarak, filamandan geçen akım filamanı yaklaşık 2700 K sıcaklığa çıkarmaktadır. Atmosferik basınç altında sıcak tungsten filaman ortamdaki havayı oksitler ve yakar. İkincisi, kolon optiklerinin düzgün çalışması, tozdan arındırılmış bir ortam gerektirmektedir. Bir diğer neden, kolon içerisindeki hava partikülleri ve toz, elektronların örnek bölümü içerisindeki numuneye ulaşamamasına ve engellenmesine sebep olabilmektedir. Bu nedenlerle, kolon içerisinde yeterli vakumun sağlanabilmesi için vakum sistemi içerisinde iki ya da daha fazla vakum pompası bulunmalıdır.

2.3.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop

Işık ve elektron mikroskobu, hücresel yapının, biyolojik dokuların işlevinin ve fizyolojisinin analizi için önemli araçlardır. Konvansiyonel ışık mikroskobu, canlı hücrelerin yanı sıra sabit hücrelerin ve dokuların doğrudan incelenmesini sağlar ve bu nedenle dinamik süreçler sayısal olarak gözlemlenebilir ve analiz edilebilir. Ancak, diğer tekniklere oranla elde edilen düşük çözünürlükten dolayı protoplazmik ayrıntılar elde edilemez; dahası, örnek, yapaylıklara (artefakt) yol açabilecek fiksasyon ve kesitleme gerektirir. Floresan ya da radyoaktif işaretleyici gibi yayılabilen moleküllerin tespiti mümkündür, ancak doğru olmayan görsel bilgiler, görüntünün özellikle de üst üste nesnelerin bulunduğu kalın örneklerin

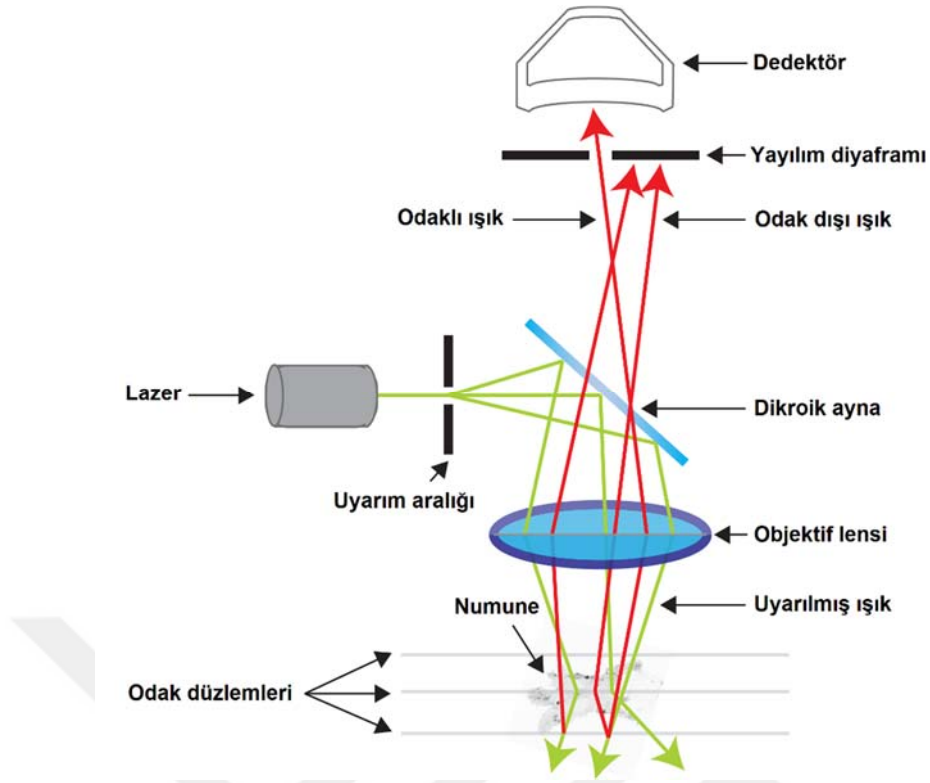
görüntüsünün kalitesini ve anlaşılabilirliğini azaltmaktadır. Bununla birlikte, bu problem, lazer taramalı konfokal mikroskopisi (LTKM) kullanılarak çözülebilir.

LTKM, biyolojik ve diğer örneklerden yüksek çözünürlüklü görüntülerin eldesinde kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu yöntemin önemli avantajlarından biri hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda, girişimsel olmayan bir şekilde makul zaman çözünürlüğü ile optik bölümlerin görüntülerini elde etme yeteneğine sahip oluşudur. Bir diğer avantajı ise, mekanik olarak kesitleme yapmaya gerek kalmadan yüzeye paralel kesitlerde ve farklı derinliklerde görüntüleme yapabilmektedir.

Diğer yandan, LTKM görüntülemesinin ana problemi, florofor uyarımının elde edilebilmesinde kullanılan lazerlerin aralığıdır. Ayrıca, yüksek yoğunluklu lazer ışması hem canlı dokular hem de florofor için oldukça yüksek tahribata sebebiyet verebilmektedir. Başka bir problem ise, biyolojik örneklerin kendinden floresan özellik göstermesidir. Bu nedenle, ideal olarak LTKM için belli bir kesitteki dokunun lazer uyarımı ve floresan yayılımı için yeterli oranda geçirgen ve ışığı saçmayan özellikte olmalı ve aynı zamanda da kendinden floresan özellik göstermemelidir.

2.3.2.1 Konfokal mikroskopisi prensipleri

Konvansiyonel mikroskopide, aydınlatma objektifin odaklandığı noktadaki düzlem için numunenin hacmi ya da derinliğinin çoğu yerinde eşittir. Bu durum, odak düzleminin üzerindeki ve altındaki alanlarda odak dışı bulanıklığa neden olmaktadır. Odak dışı ışık kontrastı ve çözünürlüğü azaltır, hücresel yapıları ayırt etmeyi zorlaştırır. Buna karşılık, konfokal mikroskopide aydınlatma eş zamanlı değil sıralıdır. Aydınlatma, bir seferde, numunenin bir hacim elemanı üzerinde bir nokta olarak odaklanır. Konfokal görüntüleme elde etmek için, lazer tarama konfokal mikroskoptan gelen uyarılmış ışık, numuneye doğru yönlendirilir. Işık demeti bir tarama sisteminden geçer ve tarama ışını örnek üzerinde bir noktaya odaklayan hedefe ulaşır. Numune tarafından oluşturulan floresan yayılım tüm yönlerde saçılır. Numunenin odak düzleminde gelen floresan, objektif ve tarama sistemi ile geri döner ve dikroik aynadan yansır, daha sonra da bir dedektöre odaklanır. Dedektörün önünde, mikroskobun odak düzlemindeki noktanın görüntüsünü kısıtlayan bir diyafram (iğne deliği ya da kesit) içeren uzamsal filtre bulunur. Böylece, uzamsal filtre sadece odaktaki ışık için dedektöre sürekli erişim sağlamakla kalmaz, aynı zamanda odak dışı düzlemlerden gelen ışığı etkili bir şekilde bastırır. Şekil 2.3'te lazer taramalı konfokal mikroskopa ait şematik görüntü verilmiştir.



Şekil 2.3. Lazer taramalı konfokal mikroskobunun şematik görüntüsü [72]

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, sunulan tez kapsamında yer alan malzeme ve hücre yapıları, bu yapılardan elde edilen imgeler ve veri setleri, bu veri setlerinde tespit edilen nicelik ve nitelikler, tespit için geliştirilen algoritma ve geliştirilen algoritmada kullanılan yöntemler detaylandırılmıştır. Sunulan tez çalışması iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde, kemik doku mühendisliğinde kullanılan MC3T3-E1 fare osteoblastlarının proliferasyonunun iyileştirilmesi çalışmalarından elde edilen LTKM imgeleri ile veri setleri oluşturulmuştur. Bu veri setlerinden biri kullanılarak, hücre canlılığının incelenebilmesi için canlı ve ölü hücre alanı tespiti yapabilen hızlı ve güvenilir bir algoritma geliştirilmiştir. Bu algoritma aracılığıyla Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubunun gerçekleştirdiği kemik doku mühendisliği çalışmalarından elde edilmiş üç ayrı doku iskelesine ait LTKM imge veri setinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizle, üretilen doku iskelelerinde derinliğe bağlı hücresel canlılık incelenmiştir. Bu bölümün son aşamasında, geliştirilen otomatikleştirilmiş yaklaşıma ait analiz ile dört ayrı kullanıcının ImageJ kullanılarak gerçekleştirdiği analizler karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda analistlerin ölçümleri arasındaki değişkenlikler de incelenmiştir.

İkinci bölümde, SEM görüntüleme tekniği kullanılarak elde edilmiş çeşitli nanofiber ve mikro metal çubuk imgelerinin bulunduğu bir imge veri seti oluşturulmuştur. Bu veri seti kullanılarak, literatürde fiber bölütlemelerinde kullanılmamış üç farklı bölütleme tekniği uygulanmıştır. Bu bölütleme yöntemleri, bir sistem içerisine yerleştirilerek imge özelliklerine bağlı uyarlamalı çalışacak şekilde tasarlanmıştır. İmgenin karşıtlık ve parlaklık özelliklerine göre değişkenlik gösteren bu uyarlamalı sistem ile fiber yapılar bölütlenmiştir. Bölütleme işlemleri sonucunda elde edilen imgeler, orijinal görüntü ile YBÖ indeksi yöntemi kullanılarak benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir. Aynı veri seti kullanılarak DiameterJ yazılımı ile bölütleme analizleri gerçekleştirilmiştir. İki yaklaşıma ait analizler, orijinal imgeler ile YBÖ indeksi yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış ve yöntemlerin başarıları tespit edilmiştir. Son olarak, tez kapsamında tasarlanan yaklaşım ile bölütlenen imgelere ait çap ve gözenek alan değerleri hesaplanmıştır.

3.1 Veri Setleri ve Özellikleri

Sunulan tez çalışmasında, iki ayrı veri seti oluşturulmuş ve kullanılmıştır. İlk veri seti hücresel canlılığın incelendiği LTKM imgelerini içermektedir. İkinci veri seti ise SEM

yöntemi kullanılarak elde edilmiş nanofiber ve mikro metal çubuk imgelerini içermektedir.

3.1.1 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop İmgeleri Veri Seti

Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubunun gerçekleştirdiği kemik doku mühendisliği alanında, MC3T3-E1 fare osteoblastlarının proliferasyonunun iyileştirilmesine ait iki ayrı çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu iki çalışmada, farklı doku iskelesi tasarımlarının hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 3B biyoyazıcı ile üretilmiş dört ayrı doku iskelesinin (Aljinat, Aljinat-Hidroksiapatit, Geleneksel jelatin metakrilat ve Mikrodalga jelatin metakrilat) destek malzemesi olarak kullanıldığı osteoblast proliferasyonu performansının araştırıldığı iki çalışmadaki hücresel aktivite, LTKM tekniği kullanılarak karakterize edilmiştir. Üretilen doku iskeleleri ve bu iskelelere ait karakterizasyon adımları bir alt başlıkta detaylandırılmıştır.

3.1.1.1 Aljinat ve aljinat-hidroksiapatit (HAp) doku iskeleleri

Aljinat ve Aljinat-HAp doku iskeleleri çapraz bağlanma reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Sodyum aljinat (%3 w/v) ve CaSO_4 (%1 w/v) çözeltileri ayrı ayrı fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH:7.4) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra iki çözelti üç yollu vana aracılığıyla karıştırılarak iç çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir. Hidrojel çözeltisi hazırlama aşamasında CaSO_4 ve sodyum aljinat çözeltilerinin karışma oranları, baskılanabilirlik ve jelleşme açısından optimize edilmiştir. Hücrelerin enkapsülasyonu için, MC3T3 pre-osteoblastları 3×10^7 hücre/mL yoğunluğunda hidrojellerin içine dağıtılmışlardır. Elde edilen viskoz çözelti Fab@Home biyoyazıcı aracılığıyla 24 gözlü Petri kaplarına baskılanmıştır. Ekstrüder-temelli baskılama işlemi sonucunda silindirik geometride doku iskeleleri (1 mm x 6 mm) elde edilmiştir. Daha sonra bu yapılar CaCl_2 ile çapraz bağlanarak CO_2 inkübatöründe besi ortamı varlığında hücre kültürü aşamasına geçilmiştir. Aynı işlem biyomimetik yaklaşımla üretilen nano-HAp'in sodyum aljinat çözeltisi içerisine katılmasıyla tekrarlanmış ve böylelikle MC3T3 hücrelerini içeren aljinat-HAp doku iskeleleri elde edilmiştir [73].

Sunulan çalışmada, hücrelerin canlılık analizi için kullanılan görüntülerin elde edilmesi LTKM (Zeiss, LSM510) ve canlı/ölü analiz moleküler probu (Life Technology, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kültürün 3. ve 9. günlerinde, hücre yüklü hidrojeller PBS (pH:7.4) ile yıkanıp görüntüleme öncesi 2 μM kalsein

AM ve 4 μ M etidiyum homodimer (EthD-1) çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Bu protokolde canlı hücreler floresan işaretçisi kalsein AM ile yeşil renkte boyanırken, ölü hücreler EthD-1 ile kırmızı renkte boyanmıştır. Kullanılan teknik ile elde edilen RGB görüntüler 1024x1024 piksel boyutlarında 'tif' imge formatında kaydedilmiştir.

3.1.1.2 Jelatin metakrilat (Jel-MA) doku iskeleleri

Jelatin metakrilat iki yöntem ile üretilmektedir: Geleneksel [74] ve mikrodalga destekli metakrilatlama [75]. Reaksiyon ürünleri, geleneksel Jel-MA ve mikrodalga destekli Jel-MA, liyofilizatör (Christ, Almanya) içerisinde kurutularak hidrojel hazırlık aşamasına kadar -80°C derecede saklanmaktadır. Jel-MA hidrojeller, fotobaşlatıcı (Irgacure, 0.3 w/v) eşliğinde foto-çapraz bağlanma ile hazırlanmıştır. Irgacure, 50°C'de PBS (pH: 7.4) içinde tamamen çözündürülür. Jel-MA, 37°C'de çözelti içinde çözündürülür. MC3T3-E1 fare preosteoblast hücreleri, 2×10^7 hücre/mL yoğunluğunda steril hidrojel çözeltisi içerisine yayarak karıştırılmıştır. Fab@Home biyoyazıcının birikim şırıngalarına yerleştirilen hücre-biyo-mürekkep karışımı, X-Y-Z hedef eksenleri boyunca yazıcı aracılığı ile yazdırılmaktadır. Yazdırma işleminden sonra hücre yüklü hidrojel diskler (6 mm x 1 mm) 200 mW/cm² yoğunluktaki ultraviyole ışık altında 40 sn süreyle çapraz bağlama işlemine tabi tutulmuştur.

Hidrojel gruplarının hücre canlılığı, canlılık analizi teçhizatı kullanılarak analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre yüklü hidrojeller PBS ile yıkanarak 30sn süresince 2 μ M Kalsein AM ve 4 μ M EthD-1 çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Hücre yüklü Jel-MA hidrojeller, LTKM (Zeiss, LSM 510) ile incelenmiştir. 3B biyoyazıcı ile üretilmiş doku iskelelerine ait iki ayrı imge veri seti kültürün üçüncü gününe ait görüntülemelerden oluşturulmuştur. Kullanılan teknik ile elde edilen RGB görüntüler 1024x1024 piksel boyutlarında 'tif' imge formatında kaydedilmiştir.

3.1.1.3 Veri setlerinin kullanımı

LTKM imge veri setleri iki farklı aşamada kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, aljinat ve aljinat-HA doku iskelelerine ait 35 farklı imge (EK 1) kullanılarak hücre alanlarının tespit edildiği uyarlamalı algoritma tasarlanmıştır. Aynı veri seti kullanılarak, dört ayrı kullanıcı tarafından ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir. Hücre çalışmalarının ikinci aşamasında, Aljinat-HA (EK 2), geleneksel Jel-MA (EK 3) ve mikrodalga destekli Jel-MA (EK 4) doku iskelelerinin üçüncü günlerine ait LTKM imgeleri kullanılmıştır. Bu imge veri setlerinin her birinde 25 adet kesit imgesi bulunmakla birlikte her bir kesit 9 μ m'de bir görüntülenerek 1024x1024 piksel

boyutlarında ve 'tif' imge formatında kaydedilmiştir. Üç ayrı imge veri seti kullanılarak derinliğe bağlı hücresel canlılık analizi gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Taramalı Elektron Mikroskop İmgeleri Veri Seti

Sunulan tez çalışmasının ikinci bölümünde, doku iskelelerindeki nanofiber ve mikro metal çubuk yapılara ait SEM tekniği ile görüntülenen imgelerden oluşan 46 adet (EK 5) siyah-beyaz imge içeren bir veri seti oluşturulmuştur. Bu veri setinin 33 tanesi nanofiber ve 13 tanesi mikro metal çubuk imgelerinden oluşmaktadır. Nanofiber imgeleri, farklı çalışmalarda çeşitli polimerik yapılardan üretilen doku iskelesi görüntülerinden seçilmiştir. Mikro metal çubuk imgeleri ise, DiameterJ yazılımına ait test veri setine aittir. İmge veri seti içinde 288 x 207 ile 1280 x 894 piksel boyutları arasında bulunan 'tif' formatında imgeler yer almaktadır. Bu imge veri seti kullanılarak, tasarlanan uyarlamalı algoritma ile fiber yapılar bölütlenmiştir.

3.2 Analizde Kullanılan Sistemin Özellikleri

Sunulan tez çalışmasında tasarlanan algoritmalar, Mathworks MATLAB 2017b sürümü kullanılarak kodlanmıştır. Kodlamanın gerçekleştirildiği ve algoritmanın test edildiği bilgisayar sistemi, Intel Xeon E5620 model 2.40 GHZ hızında çift işlemci, 16GB hafızalı Ram ve Windows 8.1 Pro işletim sistemine sahiptir.

3.3 Çalışmanın Algoritma Basamakları

Sunulan tez çalışması, iki ana bölümden oluşmaktadır. Hücre alanlarının bölütlenmesi ile hücre canlılığı analizinin gerçekleştirildiği algoritma ilk bölümde geliştirilmiştir. İkinci bölümde ise fiber yapılarının bölütlendiği ve analizinin gerçekleştirildiği bir algoritma geliştirilmiştir. Geliştirilen algoritmalar Bölüm 3.3.1 ve 3.3.2'de detaylandırılmaktadır.

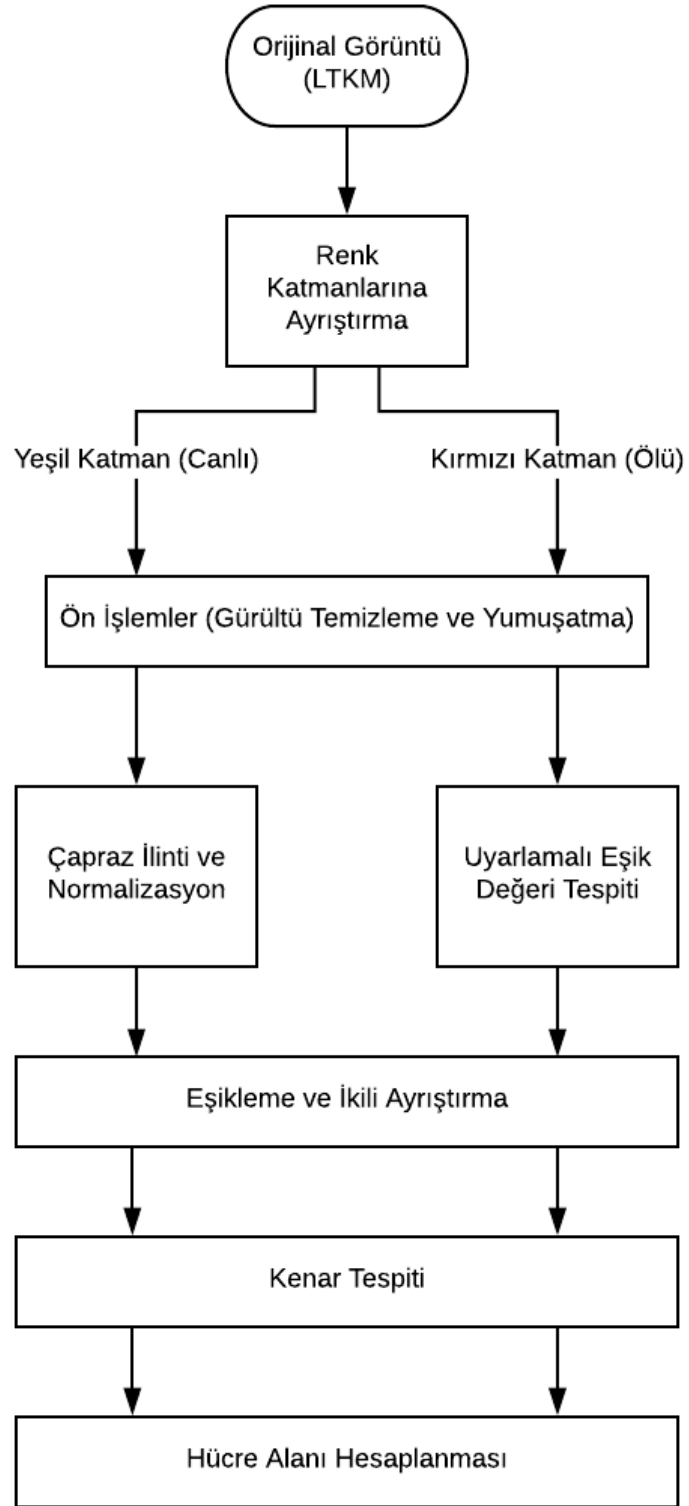
3.3.1 Hücrelerin Bölütlenmesi ve Hücre Canlılığı Analizi

Sunulan tez çalışmasının ilk bölümünde, MC3T3-E1 hücrelerine ait LTKM imgelerinin bölütlenerek, hücrelerin alanlarının tespit edildiği bir algoritma geliştirilmiştir. Bu algoritma, toplamda altı işlem basamağından oluşmaktadır. İlk adımda, RGB imge renk katmanlarına ayrıştırılarak yeşil ve kırmızı rengin bilgisinin taşındığı iki ayrı matris olarak kaydedilmiştir. Bu adımda yeşil ve kırmızı katmanların kullanılmasının sebebi, hücre boyama tekniğinde yeşil rengin canlı hücreleri, kırmızı rengin ise ölü hücreleri temsil etmesinden ileri gelmektedir. Ayrıştırılma işleminden sonra, matrisler ayrı ayrı ön işlem basamaklarına tabi tutulmuştur. Ön işlem basamaklarında, Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtresi ile Gaussian tipi beyaz

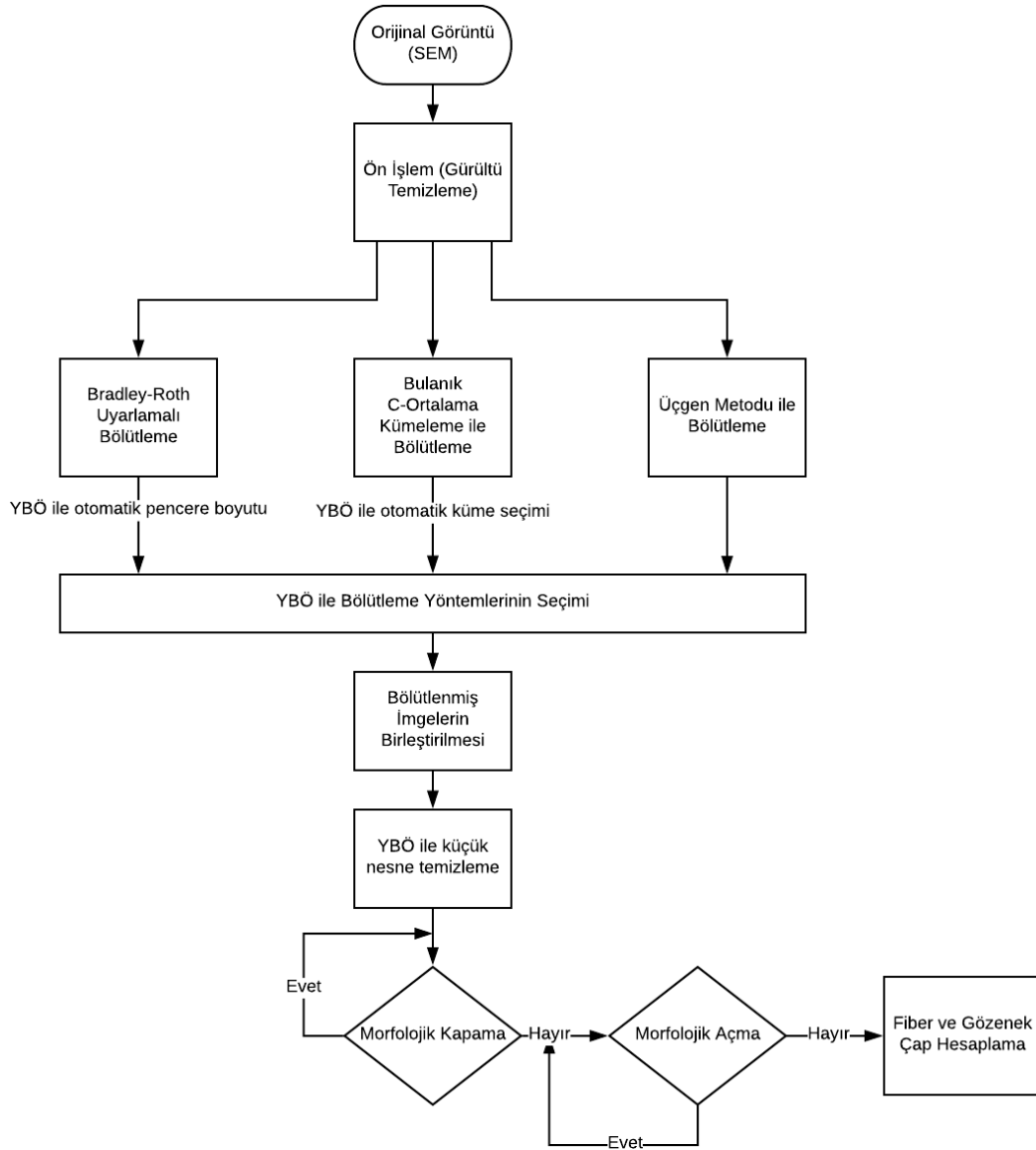
gürültü temizlenirken; Gaussian filtresi ile de imgede yumuşatma işlemi gerçekleştirilmiştir. Üçüncü adımda, yeşil ve kırmızı katmanlara farklı bölütleme işlemleri uygulanmıştır. Yeşil katman matrisine çapraz-ilinti fonksiyonu ve normalizasyon işlemi uygulanırken, kırmızı katman matrisine yeni bir uyarlamalı eşik değeri tespit işlemi uygulanmıştır. İki katmana da belirlenen eşik piksel değerlerine bağlı olarak eşikleme işlemi uygulanmış, ardından da ikili moda dönüştürme ile hücre bölgeleri işaretlenmiştir. Hücre bölgelerinin tespitinin görsel olarak doğrulanması amacı ile literatürde kullanılan kenar tespit maskeleri uygulanmıştır. Doğrulama sonrasında hücre canlılığı analizi için hücre alanları piksel² biriminde hesaplanmıştır. Aynı algoritma, üç ayrı imge veri setine de uygulanarak canlı hücrelerin derinliğe bağlı aktiviteleri belirlenmiştir. Tasarlanan algoritmanın akış şeması Şekil 3.1’de detaylandırılmıştır.

3.3.2 Fiber Yapıların Bölütlenmesi ve Fiberlerin Özelliklerinin Analizi

Sunulan tez çalışmasının ikinci bölümünde, nanofiber ve mikro metal çubuk yapılara ait SEM imgelerinin bölütlenmesi için bir algoritma tasarlanmıştır. Bu algoritma toplamda sekiz basamaktan oluşmaktadır. Algoritmanın ilk adımı ön işlem basamağı olup, Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtresi ile imgelerde bulunan Gaussian tipi beyaz gürültü temizlenmiştir. Algoritmanın tasarlanan ikinci ve üçüncü adımında, imgeler karşıtlık ve parlaklık özelliklerine bağlı olarak üç farklı bölütleme yöntemine tabi tutulmuşlardır. Uygulanan yöntemler sonucunda elde edilen imgeler, YBÖ indeksi yaklaşımı ile incelenerek hangi imgelerin seçileceğine algoritma aracılığıyla karar verdirilmiştir. Uygun bulunan bölütlenmiş imgeler birleştirilerek son bölütlenmiş imge elde edilmiştir. Bölütleme işlemini izleyen bir sonraki adımda ise fiber bölgelere ait olmayan küçük nesneler yine YBÖ indeksi yaklaşımı kullanılarak bölütleme imgesinden temizlenmiştir. Karşıtlık ve parlaklık özelliklerine bağlı olarak bölütleme işlemi sonucunda tam olarak ayrıştırılamamış imgelerin iyileştirilmesi için kullanıcıya morfolojik kapama ve açma işlemleri sunulmuştur. Son olarak, nihai olarak elde edilen bölütlenmiş fiber imgeleri üzerinden çap ve gözenek alan değerleri hesaplatılmıştır. Tasarlanan algoritmanın akış şeması Şekil 3.2’de detaylandırılmıştır.



Şekil 3.1. Hücre alanı tespiti için tasarlanan algoritmaya ait akış şeması



Şekil 3.2. Fiber imgelerinin bölütlenmesi ve sayısal analizinin gerçekleştirilmesi için tasarlanan algoritmaya ait akış şeması

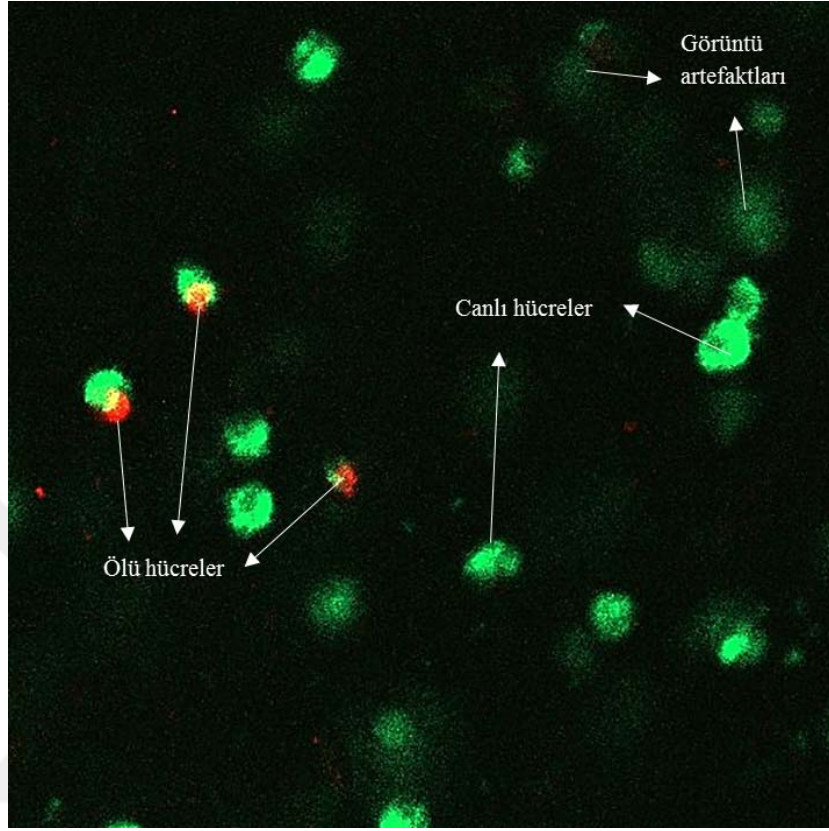
3.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop İmgelerinin Bölütlenmesi

Bu bölümde, LTKM imgelerinin bölütlenmesi için tasarlanan işlemler detaylı olarak anlatılmaktadır.

3.4.1 Renk Katmanlarının Ayırıştırılması ve Ön İşlemler

RGB imgeler kırmızı, yeşil ve mavi katmanların toplamından oluşan matrisler topluluğudur. Hücre çalışmasında kullanılan boyama tekniğinde canlı hücreler yeşil,

ölü hücreler ise kırmızı renkte floresan maddeler ile boyanmaktadır. Boyama sonrasında LTKM tekniği ile sayısallaştırılan imgeye ait bir örnek Şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.3. LTKM tekniği ile görüntülenmiş hücreye ait işlenmemiş imge

Canlı ve ölü hücrelerin alanlarının tespiti için RGB imgeden bu renklerin bulunduğu katmanlar ayrıştırılarak farklı iki matris olarak kaydedilmiştir. Ayrıca bu kaydetme işlemi sırasında, hücresel canlılığın belirsizliği sebebi ile canlı ve ölü hücrelerin çakışma bölgeleri matris bilgisinden çıkarılmaktadır.

Ayrıştırma işlemi sonrasında, imgeye bölütleme işlemi öncesinde analizi etkileyebilecek ve hatalı sonuçlar doğurabilecek etkenlerin ortadan kaldırılması amacı ile iki ayrı ön işlem uygulanmıştır. Bunlardan ilki, görüntüleme tekniğinden kaynaklanan Gaussian tipi beyaz gürültünün Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtreleme işlemidir. Bu filtre, sinyale bağlı sıfır ortalamalı Gaussian tipi beyaz gürültünün temizlenmesinde kullanılan etkili bir araçtır [76]. Gürültülü imge, Eşitlik 1'de yer alan ifadeye göre modellenebilir.

$$x_{i,j} = y_{i,j} + n_{i,j} \quad (1)$$

Gürültülü imge $x_{i,j}$ ile, gürültüden temizlenmiş imge $y_{i,j}$ ile ve Gaussian tipi beyaz gürültü $n_{i,j}$ ile ifade edilmektedir. Gürültü temizleme işleminin hedefi, gürültülü imgedeki $(x_{i,j})$ ortalama karesel hatanın (OKH) minimuma indirgenmesidir. Eşitlik 2'e göre $y_{i,j}$ orijinal imgesinden lineer bir tahmin $(\hat{y}_{i,j})$ türetilmektedir. Aynı Eşitlikteki N değeri ise $y_{i,j}$ 'de bulunan eleman sayısını ifade etmektedir. Bu noktada, Wiener filtre Eşitlik 2'ye göre türetilen imge ile orijinal imge arasındaki ortalama karesel hatayı minimuma indirmektedir [77].

$$OKH(\hat{y}) = \frac{1}{N} \sum_{i,j=1}^N (\hat{y}_{i,j} - y_{i,j})^2 \quad (2)$$

$N \times N$ boyutunda bir imgedeki piksellerin yoğunluk değerleri $x_{k,l}$ ile ifade edilmektedir. Pksel temelli Wiener uyarlamalı filtre, $(2n + 1) \times (2m + 1)$ boyutlarında bir komşuluk penceresini kullanarak yerel ortalama ve standart sapmayı hesaplar. Sunulan tez çalışmasında bu pencerenin boyutları 5×5 olarak belirlenmiştir [78]. Gürültünün sıfır ortalaması ve $\sigma_{i,j}$ varyansı ile sabit olduğunu ve orijinal görüntü $x_{k,l}$ ile ilintisiz olduğunu varsayar. Bu varsayımlara dayanarak, Eşitlik 3 ve 4'e göre her bir piksel çevresindeki yerel ortalama ve varyans değeri Wiener uyarlamalı filtre ile hesaplanır [78-80]. Varyans değerinin büyük olduğu durumlarda filtrenin yumuşatma etkisi çok azdır. Varyans değeri küçüldükçe Wiener filtrenin yumuşatma etkisi artmaktadır. Eşitlik 3'e göre yerel ortalama $(m_{i,j})$, Eşitlik 4'e göre de yerel varyans $(\sigma_{i,j})$ hesaplanmaktadır.

$$m_{i,j} = \frac{1}{(2n + 1)(2m + 1)} \sum_{k=i-n}^{n+i} \sum_{l=j-m}^{m+j} x_{k,l} \quad (3)$$

$$\sigma_{i,j} = \frac{1}{(2n + 1)(2m + 1)} \sum_{k=i-n}^{n+i} \sum_{l=j-m}^{m+j} (x_{k,l} - m_{i,j})^2 \quad (4)$$

Lokal gürültü varyansı $(v_{i,j})$ ise tüm yerel varyansların ortalaması ile hesaplanır [78-80]. Daha sonra bu hesaplamalar kullanılarak, Eşitlik 5'e göre üretilen piksel temelli filtre ile Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtresi uygulanır.

Gürültü temizleme aşamasından sonra, hücrelerdeki küçük boşlukları doldurmak ve yüksek frekanslı gürültüyü temizlemek için Gaussian tipi alçak geçiren filtre uygulanmıştır. Çoğu kenar tespit algoritmaları gürültüye duyarlıdır [81]. Bu sebeple kenar tespit algoritmaları uygulanmadan önce bu filtreleme uygulanmıştır. Gaussian matrisi (h_g), 5x5 pencere boyutu ve $\sigma=1$ standart sapma değeri kullanılarak Eşitlik 6'ya göre oluşturulmuştur [82]. Oluşturulan Gaussian matrisi kullanılarak, Eşitlik 7'ye göre imgeye konvolüsyon ile uygulanarak yeni yumaşatılmış imge (h) elde edilmiştir.

$$h_g(n_1, n_2) = e^{\frac{-(n_1^2 + n_2^2)}{2\sigma^2}} \quad (6)$$

$$h(n_1, n_2) = \frac{h_g(n_1, n_2)}{\sum_{n_1} \sum_{n_2} h_g} \quad (7)$$

3.4.2 Canlı ve Ölü Hücrelerin Bölütlenmesi

Canlı ve ölü hücrelerin bölütlenmesi için iki ayrı yaklaşım tasarlanmıştır. Canlı hücreler için çapraz ilinti fonksiyonu ile normalizasyon işlemi uygulanırken ölü hücreler için yeni bir uyarlamalı eşik değeri tespit yöntemi tasarlanmıştır.

3.4.2.1 Canlı hücrelerin bölütlenmesi

Canlı hücrelerin bölütlenmesinde çapraz ilinti fonksiyonu kullanılarak hücre alanlarının bulunduğu bölgeler nesne ve arka plan ayrıştırması ile netleştirilmiştir. Normalizasyon işlemi ile de hücre dışındaki bölgeler negatif değerde ve hücre bölgeleri pozitif değerde piksel yoğunlukları ile tanımlanmıştır.

İki boyutlu çapraz ilinti fonksiyonu Eşitlik 8'e göre hesaplanmıştır.

$$C(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} X(m, n) \bar{H}(m - k, n - l), \quad \begin{aligned} &-(P - 1) \leq k \leq M - 1, \\ &-(Q - 1) \leq l \leq N - 1, \end{aligned} \quad (8)$$

$M \times N$ boyutundaki işlenmemiş X imgesi ve $P \times Q$ boyutundaki maske olarak seçilen H şablon matrisi ile çapraz ilinti fonksiyonu hesaplanmıştır (Eşitlik 8). H şablon matrisi, bir adet hücreyi kapsayacak şekilde belirlenen ve her seferinde kullanıcı tarafından seçilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu sebeple, Eşitlik 8'de yer alan P ve Q değerleri değişebilmektedir. Çapraz ilinti fonksiyonunun hesaplanması sonucunda, $(N+Q-1) \times (M+P-1)$ boyutlarında ilinti matrisi elde edilmiştir [83]. İlinti matrisinin hesaplanmasından sonra da Eşitlik 9'a göre normalizasyon işlemi uygulanmıştır.

$$X' = \frac{X - \mu}{\sigma} \quad (9)$$

Eşitlik 9'da, X' ile normalize çapraz ilinti matrisi, μ ile çapraz ilinti matrisinin ortalaması ve σ ile çapraz ilinti matrisinin standart sapma değeri ifade edilmektedir. Normalize çapraz ilinti matrisi, çapraz ilinti matrisinin ortalama değerinin bu matristen çıkartılması ve elde edilen sonucun çapraz ilinti fonksiyonunun standart sapma değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır. Bu işlem ile canlı hücreler pozitif ve canlı olmayan nesneler negatif piksel yoğunluk değerleri ile tanımlanmıştır. Bu tanımlama ile de eşikleme değeri sıfır olarak belirlenmiştir.

3.4.2.2 Ölü hücrelerin bölütlenmesi

Canlı hücreler için tasarlanan eşikleme yöntemi, ölü hücre imgelerinin ayrıştırılmasında yetersiz kalmıştır. Bu yetersizliğin temel sebebi, ölü hücre imgelerinin piksel yoğunluk değerlerinin dağılımı ile açıklanabilir. Hücre bölgeleri ve hücre olmayan nesnelerin piksel yoğunluk değerlerinin birbirine çok yakın olması bu ayrıştırmayı zorlaştırmıştır. Bu nedenle, eşikleme noktası değerinin tespitinde tüm imgenin incelendiği istatistiksel bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşıma göre, ölü hücre imgesinden türetilen iki ayrı eşik değeri hesaplanmaktadır. 'eşik 1' değeri, imgenin matris değerlerinin ortalamasının, yine bu değerlerin standart sapmasına bölüm değerinin mutlak değeri ile hesaplanmaktadır (Eşitlik 10). 'eşik 2' değeri ise, imgenin matris değerlerinin ortalamasının mutlak değeri ile hesaplanmaktadır (Eşitlik 11).

$$eşik1 = \left| \frac{ortalama(matris)}{standartsapma(matris)} \right| \quad (10)$$

$$eşik2 = |ortalama(matris)| \quad (11)$$

Eşik değerleri hesaplandıktan sonra, imge matrisindeki her bir satırın medyan değeri bir vektör haline getirilir ve bu vektörün en büyük piksel yoğunluk değeri uyarlamalı eşikleme için seçim ölçütü olarak kullanılır. Bu seçim işlemi, Eşitlik 12'deki koşul ifadesine göre gerçekleştirilir.

$$\begin{aligned}
& \text{Eğer } |\text{maksimummedyandeğeri}| \geq \text{eşik2} \quad \Rightarrow \text{eşik1 kullan;} \\
& \text{Eğer } |\text{maksimummedyandeğeri}| < \text{eşik2} \quad \Rightarrow \text{eşik2 kullan;}
\end{aligned}
\tag{12}$$

Bu koşul ifadesini sağlayan durum için eşikleme noktası değeri seçilerek eşikleme işlemi gerçekleştirilir.

3.4.2.3 Canlı ve ölü hücre imgelerinin ikili moda dönüştürülmesi ve hücre kenarlarının tespiti

Bölütleme işlemlerinin gerçekleştirilmesi için gerekli olan eşikleme noktası değerleri tespit edilmiştir. Tespit işleminden sonra imgelerde hücre bölgelerinin ikili moda dönüştürülmesi ve hücre sınırlarının belirlenmesi işlemleri uygulanmıştır. Eşikleme noktası değerleri kullanılarak, imgeler hücrelerin görüntülenmesi için ikili moda dönüştürülmüştür. İkili duruma getirme (benirizasyon) işlemi, imgedeki piksel yoğunluk değerlerinin iki ayrı sayısal değere ayrıştırılması ile gerçekleştirilir. Bu sayısal değerler genellikle mantıksal '0' ve '1' ya da 8-bit imgelerde '0' ve '255' olarak seçilmektedir. Ayrıştırma işlemi ise eşikleme noktası değerine göre gerçekleştirilir. Bu değerden küçük yoğunluk değerleri, mantıksal '0' ya da 8-bit '0' ile değiştirilirken bu değerden büyük yoğunluk değerleri de mantıksal '1' ya da 8-bit '255' değerleri ile değiştirilmektedir.

İkili duruma getirilen imgelerde hücre sınırlarının belirlenmesi amacıyla, kenar tespit algoritmaları kullanılmıştır. Kenar tespitlerinin gerçekleştirilmesinde üç ayrı algoritmanın (Sobel, Prewitt ve Canny) konvolüsyon sonuçlarına ait matrisler elde edilmiş ve bu matrisler toplanarak hücre sınırları tespit edilmiştir [84]. Konvolüsyon işlemi kullanılan kenar tespit maskeleri Şekil 3.4'te detaylandırılmıştır.

1	2	1	-1	0	1	1	1	1	-1	2	-1	-1	0	1	1	2	1
0	0	0	-2	0	2	1	-8	1	2	-4	2	-2	0	2	0	0	0
-1	-2	-1	-1	0	1	1	1	1	-1	2	-1	-1	0	1	-1	-2	-1
a)			b)			c)											

Şekil 3.4. Konvolüsyon için kullanılan kenar tespit maskeleri: a) Sobel, b) Prewitt, c) Canny

3.4.3 Doku İskelesinde Canlılığın İncelenmesi

Hücre alanlarının tespitini izleyen işlem adımında, hücrenin imgede ne kadarlık bir alanı kapladığı sayısal olarak hesaplanmıştır. Hücre olarak işaretlenen pikseller tüm piksel sayısına oranlanarak yüzdesel bir hücre alanı hesaplaması ile hem canlı hem de ölü hücreler için bir sayısallaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sayısallaştırma işlemi ile LTKM imgelerine ait Aljinat ve Aljinat-HA doku iskeleleri için 35 adet imge veri setinin analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı veri seti kullanılarak, dört ayrı analist ImageJ v1.5 yazılımı ile aynı analizi gerçekleştirmiştir.

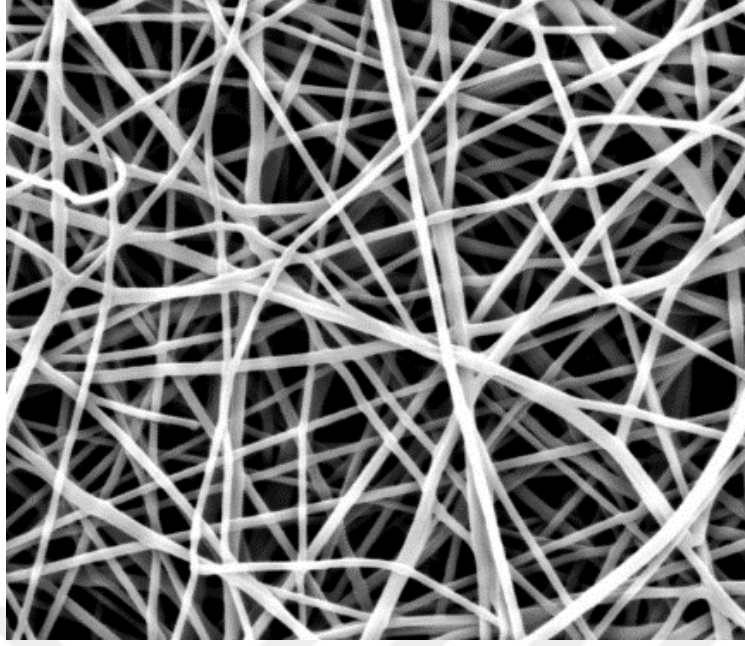
Bu iki analizin sonuçları çalışmaların doğru değerlendirilmesi ve yönlendirilmesi açısından istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu incelemede, analistlerin her bir imge için ölçümleri kaydedilerek bu ölçümlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı yüzdeleri hesaplanmıştır. Analistlerin ölçümleri arasındaki değişim oranının ortalamaya göre ne kadarlık bir sapmaya sahip olduğunu ifade eden varyasyon katsayısı, standart sapmanın ortalamaya bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Diğer bir değişle, ölçümlerdeki subjektifliğin sayısal olarak ifade edilmesidir. Son olarak, istatistiksel analiz sonucunda elde edilen veriler otomatikleştirilmiş yaklaşımın sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.4.4 Doku İskelesinde Derinliğe Bağlı Canlılığın İncelenmesi

Hücre çalışmalarının son aşamasında, tasarlanan algoritma ile üç farklı doku iskelesine ekilen MC3T3-E1 hücre hattının aktivitesi, doku iskelesinin derinliği boyunca incelenmiştir. Aynı kesit aralığında (9µm) LTKM ile görüntülenmiş imgelere ait toplamda 75 adet imge incelenerek üç ayrı doku iskelesinde derinliğe bağlı hücresel canlılık karakterize edilmiştir. Minimum ve maksimum hücre canlılığının tespit edildiği derinlik noktaları belirlenmiştir.

3.5 Doku İskelesi İmgelerinin Bölütlenmesi

Bu bölümde, nanofiber ve mikro metal çubuk yapılara ait SEM imgelerinin bölütlenmesi için tasarlanan işlemler detaylı olarak anlatılmaktadır. Bölütlemeye kullanılan nanofiberlere ait bir SEM imgesi Şekil 3.5'te görülmektedir.



Şekil 3.5. Bir doku iskelesine ait SEM imgesi

3.5.1 Ön İşlemler

SEM görüntüleme tekniği kullanılarak elde edilen imgelerde, görüntüleme tekniğinden kaynaklanan Gaussian tipi beyaz gürültünün temizlenmesinde Bölüm 3.4.1’de detaylandırılan Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtresi kullanılmıştır.

3.5.2 Yapısal Benzerlik Ölçüm (YBÖ) İndeksi

Yapısal benzerlik ölçüm (YBÖ) indeksi, iki görüntü arasındaki benzerliği ölçmek için kullanılan iyi bilinen bir kalite ölçüsüdür. Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu indeksin, insan görsel sisteminin (İGS) kalite algısıyla ilintili olduğu düşünülmektedir [85]. Geleneksel hata toplama yöntemlerini kullanmak yerine, YBÖ indeksi herhangi bir imge bozulmasını; ilinti kaybı, parlaklık bozulması ve karşıtlık bozulması olmak üzere üç faktörün bir birleşimi olarak modellemek suretiyle tasarlanmıştır. Birçok çalışmada da değerlendirme ölçütü olarak kullanılmaktadır [85-87]. Yapısal benzerlik ölçüm indeksi Eşitlik 13’te tanımlanmaktadır. f ve g , benzerlik indeksinin belirleneceği iki ayrı imgeyi ifade etmektedir.

$$YBÖ(f, g) = l(f, g) \cdot c(f, g) \cdot s(f, g) \quad (13)$$

YBÖ indeksi, hesaplanırken parlaklık (l), karşıtlık (c) ve yapı (s) özellikleri bağımsız olarak elde edilir. İki ayrı imgenin parlaklık, karşıtlık ve yapı özelliklerinin karşılaştırıldığı matematiksel hesaplamalar Eşitlik 14, 15 ve 16'da özetlenmiştir.

$$l(f, g) = \frac{2\mu_f\mu_g + c_1}{\mu_f^2 + \mu_g^2 + c_1} \quad (14)$$

$$c(f, g) = \frac{2\sigma_f\sigma_g + c_2}{\sigma_f^2 + \sigma_g^2 + c_2} \quad (15)$$

$$s(f, g) = \frac{\sigma_{fg} + c_3}{\sigma_f\sigma_g + c_3} \quad (16)$$

Parlaklık karşılaştırma fonksiyonu (Eşitlik 14), iki imgenin parlaklık ortalamalarının (μ_f ve μ_g) yakınlığını ölçmektedir. Bu faktörün maksimum ve 1 olduğu durum $\mu_f = \mu_g$ şartı sağlandığında elde edilebilir. İkinci faktör olan karşıtlık karşılaştırma fonksiyonu (Eşitlik 15), iki imgenin karşıtlık değerlerinin standart sapmalarının (σ_f ve σ_g) yakınlığını ölçmektedir. Bu faktörün maksimum ve 1 olduğu durum $\sigma_f = \sigma_g$ şartı sağlandığında elde edilebilir. Son faktör ise f ve g imgeleri arasındaki ilinti katsayısının hesaplandığı, yapısal karşılaştırma fonksiyonudur (Eşitlik 16). σ_{fg} değeri f ile g imgeleri arasındaki kovaryansı ifade etmektedir. c_1, c_2 ve c_3 sabit değerleri paydadaki sıfır böleni önlemek için kullanılmaktadır. Bu sabit değerler Eşitlik 17 ile ifade edilmektedir.

$$C_{1,2,3} = K_{1,2,3} \cdot L^2 \quad (17)$$

K değerleri 1'den çok küçük ve 0'a yakın bir değer seçilmektedir. Bununla birlikte L değeri de imgenin maksimum yoğunluk değerine eşittir.

YBÖ indeksi değeri, pozitif ve 0 ile 1 aralığında ifade edilmektedir. İndeks değerinin 0'a eşit olması iki imge arasında hiçbir benzerlik bulunmadığını ifade etmektedir. İndeks değerinin 1'e eşit olması ise iki imgenin aynı imge olduğunu ifade etmektedir. 0'dan 1'e doğru iki imge arasındaki benzerliğin arttığı söylenebilir. Sunulan tez çalışmasının ikinci kısmında bölütleme yöntemlerinin parametreleri ve seçim ölçütlerinin belirlenmesinde YBÖ indeksi kullanılmıştır.

3.5.3 Bulanık C-Ortalama Kümeleme Yöntemi

Bulanık c-ortalama kümeleme yöntemi, bir veri parçasının iki veya daha fazla kümeye ait olmasını sağlayan bir kümeleme yöntemidir. Bulanık bölünmeli kümeleme, iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [88,89]. Bu yöntem 1973 yılında Dunn tarafından geliştirilmiş ve Bezdek tarafından 1984 yılında iyileştirilmiştir [91]. K-ortalama algoritmasına göre en büyük avantajı her bir nesnenin tek bir kümeye değil birden fazla kümeye ait olabilme derecesine sahip olmasıdır. Özetle bu yöntem, nesnelerin iki veya daha fazla kümeye ait olabilmesine izin verir. Bulanık mantığın prensibinde yer alan bu yaklaşımla, veriler kümelerin her birine $[0,1]$ arasında değişen birer üyelik değerine sahiptir. Bir verinin tüm sınıflara olan üyelik değerleri toplamı “1”den fazla olmamalıdır. Veri hangi küme merkezine yakın ise o kümeye ait olma üyeliği diğer kümelere ait olma üyeliğinden daha büyük olacaktır.

Önerilen yöntem iteratif bir yöntem olmakla birlikte Eşitlik 18’de yer alan amaç fonksiyonunun alabileceği en küçük değerin elde edilmesi temeline dayanmaktadır. Yani kısaca, amaç fonksiyonunun değeri en küçük olana kadar işlemler tekrarlanmaktadır. Amaç fonksiyonunun belirlenen minimum ilerleme değerine yakınsamasıyla kümeleme işlemi tamamlanır. Bulanık mantığına sahip bu algoritma özellikle kesişen kümelere sahip veri bloklarında çok daha uygundur.

$$J_m = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^C u_{ij}^m \|x_i - c_j\|^2, \quad 1 \leq m < \infty \quad (18)$$

m , 1’den büyük herhangi bir gerçektek sayı olmak üzere; u_{ij} , x_i ’nin j kümesine ait olma derecesini ifade eder. x_i , ölçülen veriyi, c_j ise o kümenin merkez değerini ifade etmektedir. Bulanık bölümlleme işlemi, Eşitlik 19 ve 20’ye göre amaç fonksiyonu minimum değeri alana kadar, u_{ij} aittik derecesini ve c_j küme merkezlerini hesaplamaya devam eder. Minimum değer elde edildiği noktada bölümlleme işlemi sona erer.

$$u_{ij} = \frac{1}{\sum_{k=1}^C \left(\frac{\|x_i - c_j\|}{\|x_i - c_k\|} \right)^{\frac{2}{m-1}}} \quad (19)$$

$$c_j = \frac{\sum_{i=1}^N u_{ij}^m \cdot x_i}{\sum_{i=1}^N u_{ij}^m} \quad (20)$$

Sunulan tez çalışmasında, bulanık c-ortalama kümeleme yöntemi kullanılarak imgelerin piksel yoğunluk değerleri üç ayrı küme grubu için iteratif olarak hesaplanmış ve üç ayrı merkez noktası (c_1, c_2, c_3) tespit edilmiştir. Bu merkez noktalarından c_2 ve c_3 kullanılarak iki ayrı eşiklenmiş imge elde edilir. Elde edilen bu eşikleme imgeleri, orijinal imgeyle YBÖ indeksi kullanılarak karşılaştırılır ve karşılaştırma sonucunda 1 değerine yakın olan eşiklenmiş imge algoritma tarafından tercih edilir. Bu adım sonucunda, bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme işlemi tamamlanır.

3.5.4 Bradley-Roth Uyarlamalı Bölütleme Yöntemi

Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemi, Wellner bölütleme algoritmasının geliştirilmiş ve iyileştirilmiş halidir. Bu yöntem, Wellner bölütleme algoritmasına göre daha hızlı ve hafıza kullanımı açısından daha verimli çalışmaktadır. Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemi, imgelerdeki parlaklık farklılıklarından en az etkilenen ve bölütlenmesi hedeflenen nesneyi tespit etmede oldukça başarılı sonuçlar verebilen bir tekniktir [92]. Bu nedenle çalışmanın ikinci bölümünde kullanılan SEM imgelerinde de bulunan parlaklık farklılıkları bu yöntemin seçiminde temel nedenlerden biridir. Bu yöntem, durağan imgelerle birlikte, canlı video aktarımlarının analizinde de kullanılabilen bir yöntem olarak öne çıkmıştır [93].

Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemi, Wellner bölütleme yöntemini temel alan bir tekniktir. Wellner bölütleme yöntemi temelinde, boyutları önceden belirlenmiş bir pencerenin imge üzerinde dolaştırılması ile yerel uyarlamalı bir analize imkân sağlamaktadır. Yöntemde, pencerenin merkez piksel yoğunluk değerinin, satır hareketli pencerenin toplam piksel yoğunluk değerinin ortalamasından küçük ya da büyük olması durumu analiz edilmektedir. Hesaplanan ortalama değer %t oranından küçük ise merkez piksel 0, büyük ise 1 yapılarak imgede ikili moda dönüştürme işlemi uygulanır. Buradaki %t oranı Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemi için önceden belirlenebilen bir parametredir. Ancak Wellner metodunda, pencere satır büyüklüğü için görüntünün piksel genişliğinin 1/8 oranı ve %t oranı içinse %15 değeri sabit olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, Wellner bölütleme yöntemi hem yön bağımlı (soldan sağa, sağdan sola ya da transvers) hem de görüntü satırlarında uygulanan hareketli ortalama yaklaşımı sebebiyle yavaş bir yöntemdir.

Bradley-Roth yönteminde ise bilgisayarla görü çalışmalarında da sıklıkla kullanılan integral imgesi oluşturularak çok daha hızlı hesaplamalar yapılabilir.

Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemi, görüntü içeriğinin parlaklık ve yoğunluk değerlerinde uzamsal varyasyonları dikkate alır. İlk olarak, toplama alan tablosu da denilen integral imgesi hesaplanmalıdır. Bu işlem, bir $f(x, y)$ fonksiyonun var olduğu durumlarda gerekli olmakla birlikte, bu fonksiyonun toplamının, imgenin dikdörtgen bir bölgesi üzerinde hesaplanması istenir. İntegral imgesindeki herhangi bir noktadaki (x, y) değeri, (x, y) 'nin üstündeki ve solundaki tüm piksellerin toplamıdır (Eşitlik 21).

$$I(x, y) = \sum_{\substack{x' \leq x \\ y' \leq y}} i(x', y') \quad (21)$$

Bu toplama işlemi iki şekilde gerçekleştirilebilir. İlki toplama işleminin sürekli olarak tekrarlanması ile sağlanabilir. İntegral imgesinde, orijinal imgedeki değerler üst üste toplanarak birinci satır ve birinci sütun oluşturulur (Şekil 3.6).

4	3	7	8		4			
3	6	4	5					
5	6	4	7					
5	7	4	2					
4	3	7	8		4	7		
3	6	4	5					
5	6	4	7					
5	7	4	2					
4	3	7	8		4	7	14	
3	6	4	5					
5	6	4	7					
5	7	4	2					
4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5					
5	6	4	7					
5	7	4	2					
4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5		7			
5	6	4	7		12			
5	7	4	2		17			

Şekil 3.6. İntegral imgesinde birinci satır ve sütunun oluşturulması

Birinci satır ve sütun oluşturulduktan sonra integral imgesindeki diğer değerler, hesaplanacak pikselin üstünde ve solunda kalan piksel değerlerinin toplamı olarak hesaplanır (Şekil 3.7).

4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5		7	16		
5	6	4	7	⇒	12			
5	7	4	2		17			

4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5		7	16	27	
5	6	4	7	⇒	12			
5	7	4	2		17			

4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5		7	16	27	40
5	6	4	7	⇒	12			
5	7	4	2		17			

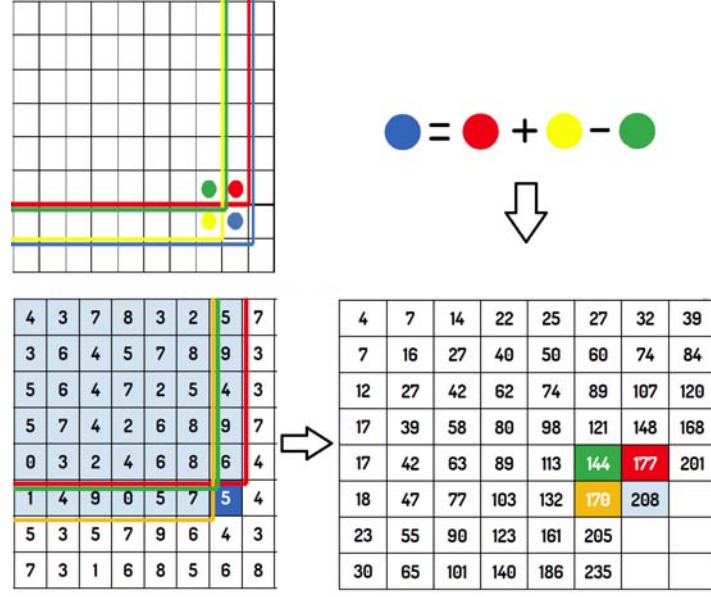
4	3	7	8		4	7	14	22
3	6	4	5		7	16	27	40
5	6	4	7	⇒	12	27	42	62
5	7	4	2		17	39	58	80

Şekil 3.7. İntegral imgesinin oluşturulması

Ancak bu yöntem işlem adımlarının çok olması sebebi ile tercih edilmemektedir. Bunun yerine ikinci bir yol olan köşe pikselleri kullanılarak hesaplamalar daha hızlı yapılabilir. Bu yolda, hesaplanacak pikselin solunda ve üstünde kalan değerler toplanırken sol üst çaprazında kalan piksel değeri çıkartılarak daha hızlı bir hesaplama gerçekleştirilir (Şekil 3.8).

İntegral imgesi oluşturulmasından sonra, daha önce de bahsedilen hareketli pencerelerdeki yerel ortalamalara bağlı bölütleme işlemi gerçekleştirilir.

Sunulan tez çalışmasında, %t oranı literatürde daha önce de tercih edilen, %10 olarak seçilmiştir [92]. Pencere boyutu ise imgeye bağlı optimize edilebilmesi için YBÖ indeksi kullanılarak uyarlamalı olarak algoritma tarafından belirlenmiştir. Orijinal imgenin referans olarak kullanıldığı YBÖ indeksi hesaplamalarında en yüksek YBÖ indeksine sahip pencere boyutu belirlenmiş ve %10 t eşik değeri kullanılarak bölütleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.



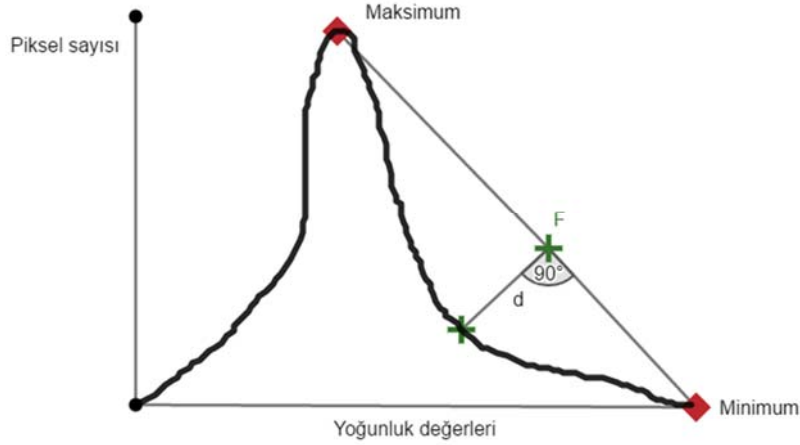
Şekil 3.8. İntegral imgesi için hızlı hesaplama yöntemi

3.5.5 Üçgen Metodu ile Bölütleme Yöntemi

Global eşikleme yöntemlerinden biri olan üçgen metodu, imgenin histogram özelliklerinin analizi ile eşikleme noktasının belirlendiği bir bölütleme yöntemidir. Bu yöntem genellikle bölütlenmek istenen nesneye ait piksel yoğunluk değerinin histogram içerisinde düşük bir tepe değerine sahip olduğu durumlarda iyi sonuçlar vermektedir [93,94].

Üçgen metoduna göre, imgede bulunan minimum ve maksimum piksel yoğunluk değerlerini birleştirilen bir doğru çizilir. Histogram içerisinde yer alan yoğunluk değerlerinin piksel sayısı noktalarının bu doğruya çizilen dik uzaklıkları hesaplanmaktadır (Şekil 3.9). Hesaplanan bu dik uzaklıklardan en büyük değere sahip olan piksel yoğunluk değeri eşikleme noktası değeri olarak seçilmektedir. Seçilen bu değer kullanılarak ikili moda dönüştürme işlemi gerçekleştirilir ve bölütleme tamamlanır.

Sunulan tez çalışmasında, üçüncü bölütleme yöntemi olarak üçgen metodu kullanılmıştır. Üçgen metodunun, yöntem basamakları eşik noktasının optimal değerinin tespiti üzerine kurulmuş bir yöntem olması sebebiyle herhangi bir basamakta YBÖ indeksi karar ölçütü olarak kullanılmamıştır.



Şekil 3.9. Üçgen metodu ile eşikleme değerinin tespiti

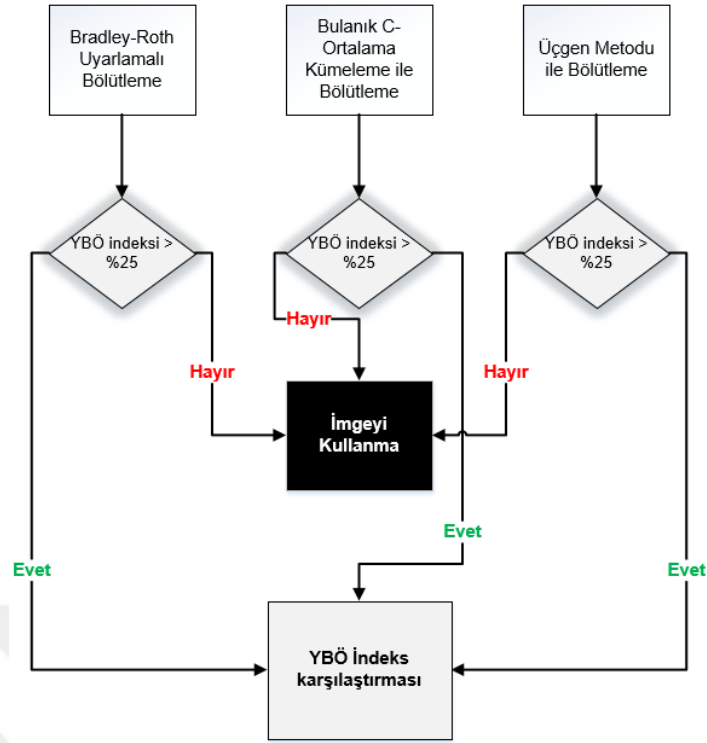
3.5.6 Bölütleme Yöntemlerinin Seçilim Algoritması

Sunulan tez çalışmasının ikinci bölümünde, fiber yapıların bölütlenmesi için üç ayrı bölütleme tekniği kullanılmıştır. Bu bölütleme yöntemleri ile üç ayrı bölütlenmiş fiber imgesi üretilmiştir. Bölütlenmiş üç ayrı fiber imgesinin orijinal imge referans olarak seçilmesiyle YBÖ indeks değerleri hesaplanmıştır. İki aşamalı seçilim algoritmasında, ilk adım olarak YBÖ indeks değeri %25 altında kalan bölütlenmiş imgeler bu adımda elenmektedir. İndeks değeri eşigini geçen bölütlenmiş imgeler bir sonraki adımda, indeks değeri temel alınarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada, indeks değeri en büyük iki bölütlenmiş imgenin matris değerleri toplanarak algoritmanın bölütleme süreci tamamlanmıştır (Şekil 3.10).

Bölütleme işlemlerinin tamamlanmasını izleyen adımda fiber yapıların morfolojik işlemlerle iyileştirilmesi gerçekleştirilmiştir.

3.5.7 Bölütlenmiş İmgelere Uygulanan Morfolojik İşlemler

Bölütleme adımları tamamlanarak, bölütlenmiş son imge elde edilmiştir. Bu adımdan sonra fiber yapıların iyileştirilmesini ve bölütleme sonucunda analizi etkileyebilecek istenmeyen küçük nesnelerin temizlenmesini içeren morfolojik işlemler kullanılmıştır. Sunulan tez çalışmasının ikinci bölümünde kullanılan morfolojik işlem basamakları üç ayrı adımdan oluşmaktadır.



Şekil 3.10. Bölütlenen imgelerin seçim algoritması

3.5.7.1 Küçük nesnelerin temizlenmesi

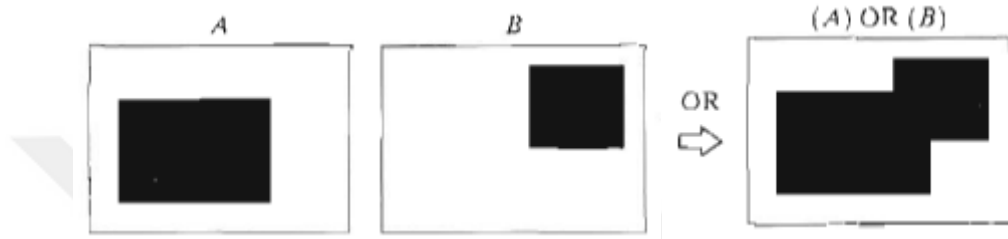
Birinci adımda bölütleme işlemi sonucunda, analizi etkileyebilecek istenmeyen küçük nesnelerin temizlenmesi için bir alt algoritma tasarlanmıştır. Bu algoritmaya göre, ikili moda dönüştürülmüş piksel öbeklerinin komşuluk ilişkileri incelenmiştir. Birbiri ile bağlantılı olan piksel öbeklerinin boyutları analiz edilerek temizlenecek öbek boyutuna karar verilmesinde YBÖ indeksi kullanılmıştır. Bu işleme göre, öbek içindeki toplam piksel sayısı 10 değerinden küçük nesnelerin temizlenmesi ile başlanmıştır. Üst sınır 1500 piksel öbeği olmak üzere, öbek boyutu her seferinde bir tane artırılarak YBÖ indeksi ile orijinal imge karşılaştırılmıştır. Elde edilen YBÖ indeks değeri bir vektör içinde kaydedilmiştir. Oluşturulan bu vektör içindeki en yüksek YBÖ indeks değeri kullanılarak optimal piksel öbeği boyutu belirlenmiştir. Optimal piksel öbek boyutu ile temizleme işlemi tamamlanmıştır.

3.5.7.2 Morfolojik kapama işlemi

İkinci adımda morfolojik kapama işlemi kullanılarak bölütleme imgesindeki fiber yapıların iyileştirilmesi için kullanıcının takip edebildiği bir yaklaşım tasarlanmıştır. Bu yaklaşımda morfolojik kapama işleminin uygulanıp uygulanmayacağı YBÖ

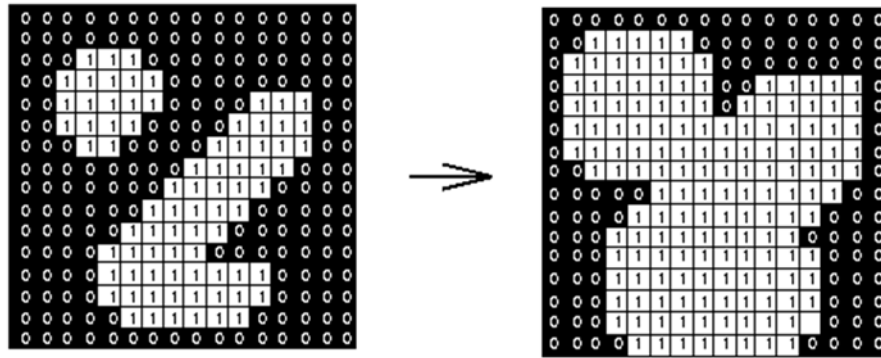
indeksi kullanılarak kullanıcının tercihi sunulmuştur. Kullanıcı YBÖ indeksini kontrol ederek kapama işlemi için karar vermekte ve bu adımı sonlandırmaktadır.

Morfolojik kapama işlemi iki farklı morfolojik işlemin ard arda uygulanmasından elde edilen mantıksal bir hesaplama değildir. Morfolojik kapama işlemi, genişletme ve aşındırma işlemlerinin sırası ile uygulanmasını içermektedir. Öncelikle, geometrik şekli önceden belirlenen bir yapısal eleman kullanılarak genişletme işlemi uygulandıktan sonra aynı yapısal eleman ile aşındırma işlemi uygulanır. Genişletme işlemi mantıksal 'veya' işlemine karşılık gelmektedir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. İmgede mantıksal 'veya' işlemi

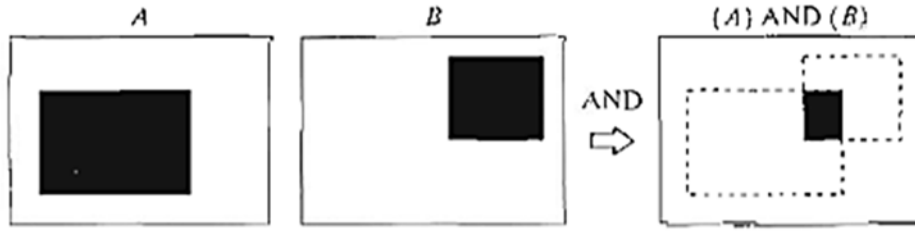
Genişletme işlemi Eşitlik 22'de özetlenen nesnelerin yapıcı büyümelerini sağlayan mantıksal hesaplamalardır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Morfolojik genişletme işlemi

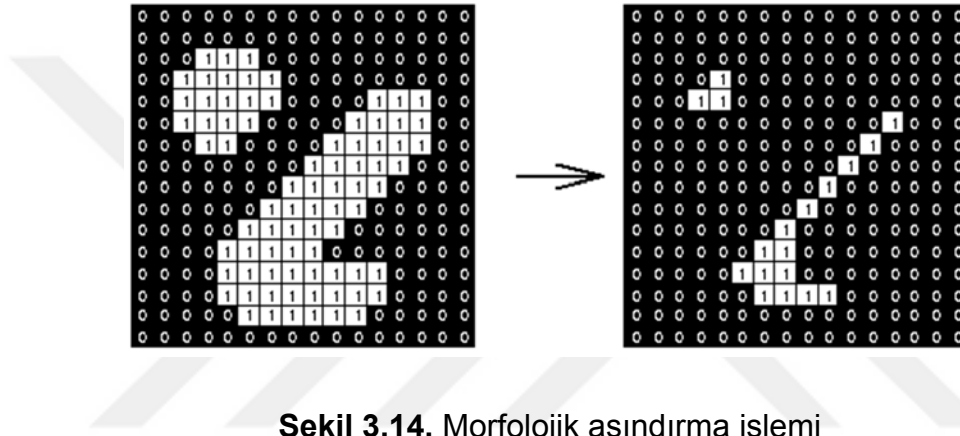
$$X \oplus B = \{p \in Z^2 : p = x + b, x \in X, b \in B\} \quad (22)$$

Genişletme işlemi uygulandıktan sonra aynı yapı elemanı kullanılarak aşındırma işlemi uygulanır. Aşındırma işlemi mantıksal 've' işlemine karşılık gelmektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. İmgede mantıksal 've' işlemi

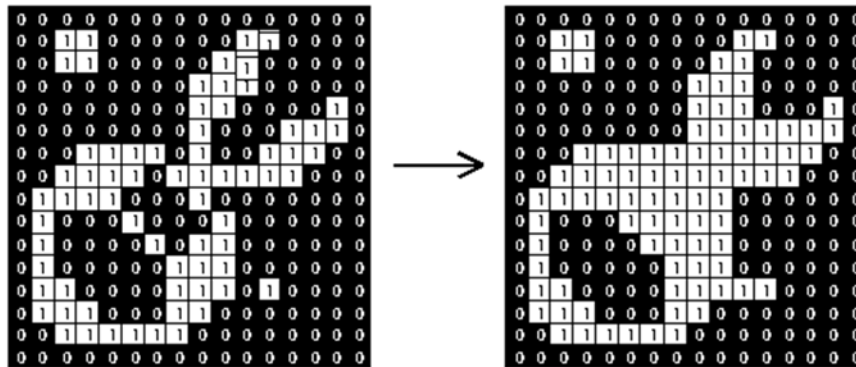
Eşitlik 23'de özetlenen aşındırma işlemi nesnelerin yapıcı küçülmelerini sağlayan mantıksal hesaplamalardır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Morfolojik aşındırma işlemi

$$X \ominus B = \{p \in Z^2 : p + b \in X, \forall b \in B\} \quad (23)$$

Aşındırma işlemi uygulandıktan sonra kapama işlemi tamamlanır. Kapama işlemi kısaca nesnelerin boşluklarının doldurulmasını sağlayan morfolojik bir hesaplamadır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Morfolojik kapama işlemi

Bu mantıksal işlemler kullanılarak, kullanıcının YBÖ indeksini takip etmesi sağlanarak bölütlenmiş imgenin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. YBÖ indeksi en yüksek değeri alana kadar kullanıcı bu işlemleri uygular. Daha sonra morfolojik açma işleminin uygulanması için bu basamak sonlandırılır.

3.5.7.3 Morfolojik açma işlemi

Son adımda morfolojik açma işlemi uygulanmıştır. Morfolojik açma işlemi ise aşındırma ve genişletme işlemlerinin sırası ile uygulanmasından oluşmaktadır (Şekil 3.16). Yapısal anlamda, nesnelerin uzantılarının ve çıkıntılarının temizlenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 3.16. Morfolojik açma işlemi

Bölüm 3.5.7.2’de detaylandırılan aşındırma ve genişletme işlemleri kullanılarak istenmeyen uzantılar temizlenmiştir. Bu temizleme işlemi de yine YBÖ indeksi kullanılarak, kullanıcı benzerlik yüzdesini takip etmekte ve morfolojik işlemleri uygulamaktadır. Tüm bu morfolojik işlemler sonucunda çapları ölçülecek fiber yapılarına ait imgeler elde edilmiştir.

3.5.8 Bölütlenmiş İmgelerin Uzaklık Dönüşüm Metodu ile Analizi

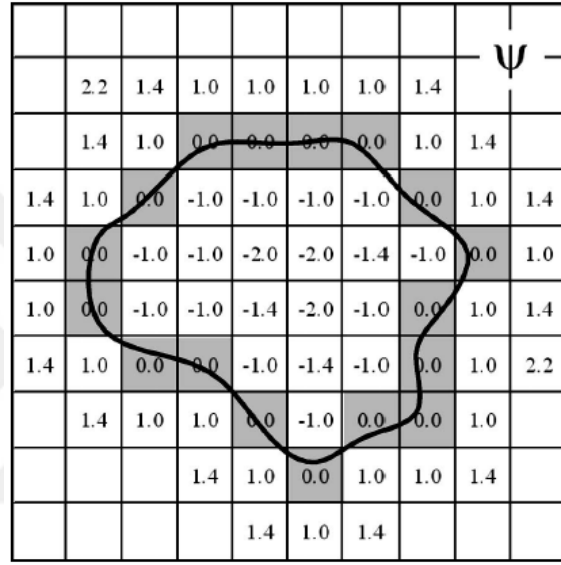
Bölütleme adımı ve morfolojik işlemler sonucunda elde edilen imge kullanılarak, imgedeki fiber yapıların çapları ve fiberler arasında kalan gözenek alan büyüklükleri sayısal olarak incelenmiştir. Bu analiz basamağında fiber çaplarının ve gözenek alanlarının hesaplanması iki ayrı algoritma olarak tasarlanmıştır.

3.5.8.1 Fiber çaplarının hesaplanması

Bölütlenmiş son imgedeki fiber çaplarının hesaplanmasında uzaklık dönüşüm yöntemi kullanılmıştır. Uzaklık haritası ya da uzaklık alanı da denilen bu yaklaşım ile nesneler ya da pikseller arası uzaklık değerleri sayısallaştırılabilmektedir. İkili duruma getirilmiş imgeler üzerinde kullanılan bu yöntemde, hangi piksel değerinin ölçüm için kullanılacağı seçilebilmektedir. Tercih edilen piksel değeri hangisi ise

tercih edilmeyen piksellere olan uzaklıkları farklı ölçütlerle hesaplanabilmektedir. Bu ölçütler Öklid uzaklığı, Öklid benzeri uzaklığı, satranç tahtası uzaklığı ve şehriblokları uzaklığı olabilmektedir.

Örneğin tercih edilen piksel değerini '0' kabul edelim. İkili durumdaki imgede geriye kalan '1' piksellerinin, '0' piksellerine olan Öklid uzaklıkları hesaplanır. Hesaplanan bu uzaklık değerleri yeni bir matriste, '0' pikselleri aynı kalmak şartıyla, '1' piksellerinin yerine yazılır. Elde edilen bu yeni matris, ikili moda dönüştürülmüş imgenin Öklid uzaklığına bağlı uzaklık dönüşüm matrisidir (Şekil 3.17).

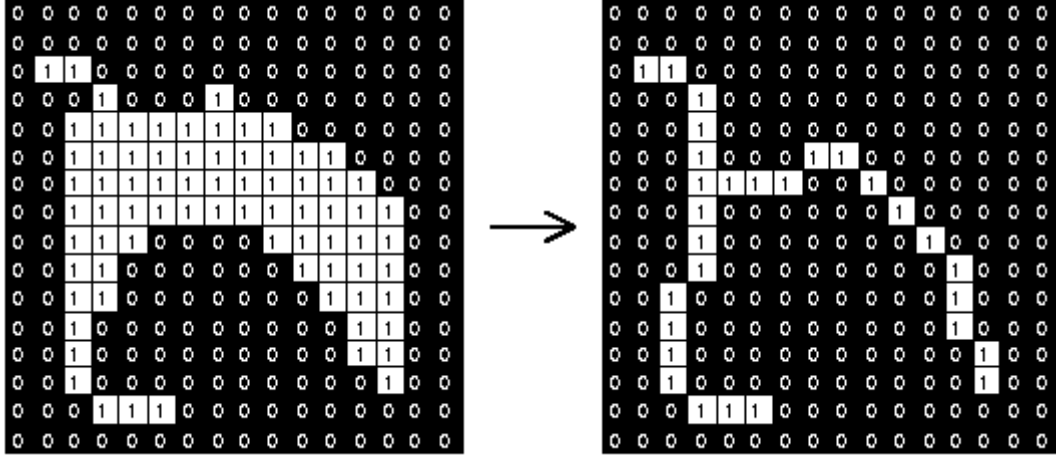


	2.2	1.4	1.0	1.0	1.0	1.0	1.4		Ψ
	1.4	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.4	
1.4	1.0	0.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	0.0	1.0	1.4
1.0	0.0	-1.0	-1.0	-2.0	-2.0	-1.4	-1.0	0.0	1.0
1.0	0.0	-1.0	-1.0	-1.4	-2.0	-1.0	0.0	1.0	1.4
1.4	1.0	0.0	0.0	-1.0	-1.4	-1.0	0.0	1.0	2.2
	1.4	1.0	1.0	0.0	-1.0	0.0	0.0	1.0	
			1.4	1.0	0.0	1.0	1.0	1.4	
				1.4	1.0	1.4			

Şekil 3.17. Uzaklık dönüşüm matrisi [96]

Sunulan tez çalışmasında, ikili moda dönüştürülmüş bölütleme imgesindeki fiber yapıları mantıksal '1' değeri ile ifade edilmiştir. Fiber çaplarının ölçümü için tasarlanan algorithmada ise bu bölütlenmiş imgenin negatifi (tamamlayıcısı) oluşturulmuştur. Negatif imgesinde, fiber yapıları mantıksal '0' değeri ile ifade edilmiştir. Uzaklık dönüşüm matrisi için tercih edilen piksel değeri '0' olarak seçilmiş ve bu '0' değerli piksellerin mantıksal '1' piksellerine olan Öklid uzaklıkları hesaplanmıştır. Daha sonra 'bwmorph' fonksiyonu [97] kullanılarak fiber yapıların iskelet ağaçları çıkartılmıştır (Şekil 3.18). İskelet ağaçlarının oluşturulması ile fiber yapıların merkezini belirleyen piksel haritası elde edilmiştir. Bu harita kullanılarak, orta noktada bulunan piksele karşılık uzaklık dönüşüm matrisindeki değerin iki katı alınmış fiber çapları hesaplanmıştır. Hesaplanan her bir çap değeri bir Excel dosyasına kaydedilerek minimum çap, maksimum çap değeri ve çap aralığı bu

dosyadan belirlenir. Tüm hesaplamaların birimleri piksel olarak kaydedilmiştir. Kullanılan orijinal imgede bulunan ölçek kullanılarak, gerçek fiber değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.18. İskelet ağaçlarının oluşturulması

3.5.8.2 Gözenek alanlarının hesaplanması

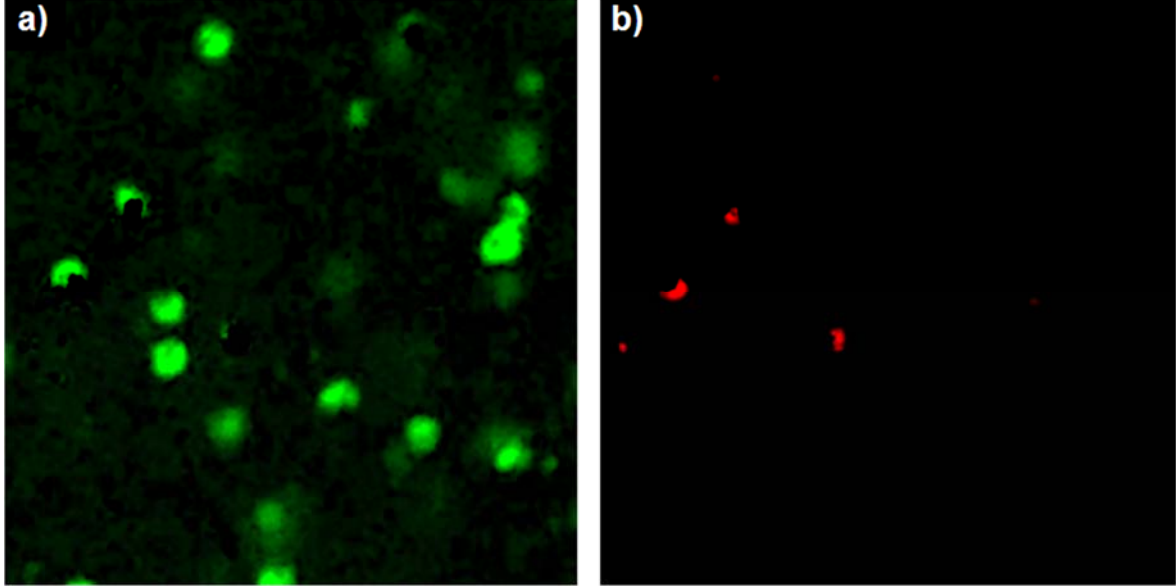
Fiber çap büyüklüklerinin hesaplanmasından sonra bölütlenmiş son imge kullanılarak gözenek alanları ve gözenek alan dağılımları hesaplanmıştır. Tasarlanan hesaplama algoritmasında gözenek öbekleri komşuluk ilişkileri incelenerek numaralandırılmıştır. Numaralandırma sonrası tüm gözenek öbeklerinin boyutları piksel² olarak hesaplanmıştır. Gözenek boyutlarının hesaplanmasından sonra minimum gözenek alanı, maksimum gözenek alanı ve toplam gözenek yüzdesinin bulunduğu bir Excel dosyası oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında, materyal ve yöntem bölümünde bahsedilen işlemlerin sonuçları bu bölümde detaylandırılmıştır. Tez çalışmasının sonuçları iki ayrı bölümde incelenmiştir. İlk bölümde hücre çalışmalarına ait sonuçlar açıklanırken, ikinci bölümde doku iskelesi çalışmalarına ait sonuçlar verilmiştir. Son bölümde ise elde edilen sonuçlar yorumlanmıştır.

4.1 Hücre Çalışmalarına Ait Sonuçlar

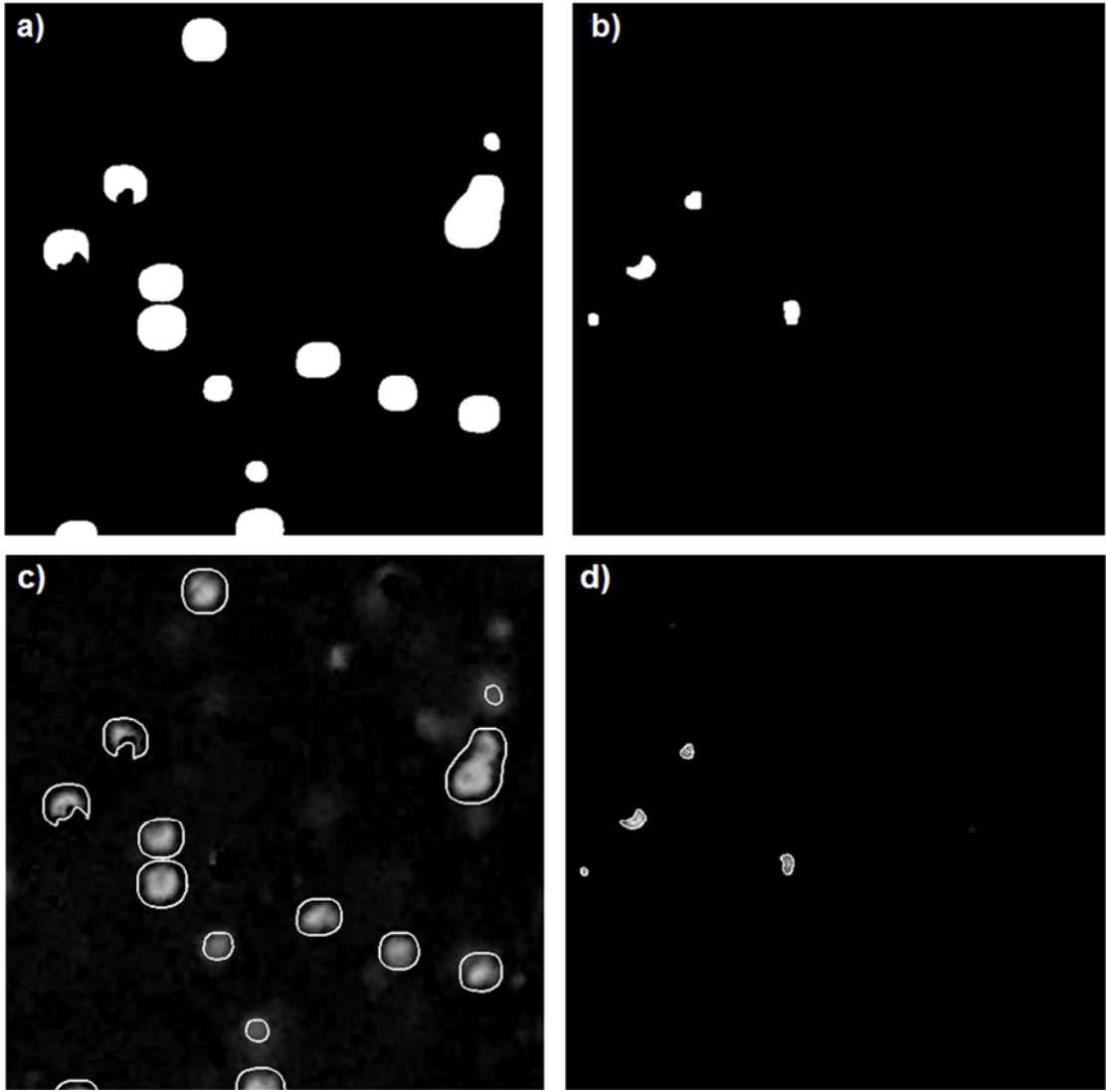
Hücre çalışmalarında kullanılan imgelere ait bir örnek, daha önce Şekil 3.3'te verilmiştir. Hücre alanlarının bölütlenmesine ait çalışmaların ilk adımı olan ön işlemler basamağında RGB imgeler kırmızı, yeşil ve mavi matris katmanlarına ayrıştırılmıştır. Daha sonra kırmızı ve yeşil matris katmanlarına Wiener uyarlamalı gürültü temizleme filtresi uygulanarak Gaussian tipi beyaz gürültü temizlenmiştir. Ön işlemlerin son adımında ise küçük boşlukların doldurulması ve yüksek frekanslı gürültünün temizlenmesi amacıyla Gaussian tipi alçak geçiren filtre uygulanmıştır. Ön işlemler sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre imgelerine ait bir örnek Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Ön işlemler uygulandıktan sonra elde edilen imgeler: a) Canlı hücreler, b) Ölü hücreler

Ön işlemler adımının tamamlamasından sonra canlı ve ölü hücrelerin alan tespitlerinin yapılabilmesi için bölütleme algoritmaları uygulanmıştır. Bölüm 3.4.2'de

detaylandırılmış olan bölütleme işlemleri canlı ve ölü hücre imgeleri için iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre imgelerinde, çapraz ilinti fonksiyonu ve normalizasyon işlemine bağlı eşikleme uygulanmıştır. Ölü hücre imgelerinde ise eşikleme noktası değerleri uyarlamalı olarak yeni bir algoritma ile tespit edilerek eşikleme uygulanmıştır. Canlı ve ölü hücre imgelerinin eşikleme işlemleri sonucunda elde edilen imgelere ait örnek Şekil 4.2.a ve 4.2.b'de görülmektedir. Eşikleme işlemleri tamamlandıktan sonra hücre sınırlarının görülebilmesi için kenar tespit algoritmaları ile hücre alanları orijinal imge üzerinde görüntülenmiştir (Şekil 4.2.c-d).



Şekil 4.2. Eşikleme ve kenar tespiti işlemleri sonucunda elde edilen imgeler: a-c) Canlı hücreler, b-d) Ölü hücreler

4.1.1 Algoritma ve Analistlere Ait Sonuçların Karşılaştırılması

Bölütleme işlemlerinin tamamlanmasından sonra, canlı ve ölü hücrelere ait alanlar, piksel² değerler üzerinden tüm imgedeki yüzdesi (%) ifade edilecek şekilde hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonrasında 35 imgelik veri setine ait tüm yüzdelere kaydedilmiştir. Algoritma analizlerinin tamamlanması ile dört ayrı analistin analizleri gerçekleştirilmiştir. ImageJ kullanılarak gerçekleştirilen bu analizlerde her analist kendi ölçümünü ayrı ayrı kaydetmiş ve yüzde alanları hesaplamışlardır. Analistlerin sonuçları kullanılarak her bir imgedeki ölçümlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu istatistiksel analiz sonrasında analistler arasındaki ölçüm farklılıkları belirlenmiş ve otomatikleştirilmiş yaklaşıma ait sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Algoritma ve analistlerin sonuçları ile istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Çizelgede yer alan değişkenler sırasıyla; A1=Analist 1, A2=Analist 2, A3=Analist 3, A4=Analist 4, AO=Analist Ortalaması, ASS=Analist Standart Sapması, AS=Algoritma Sonuçları, VK=Varyasyon Katsayısı Yüzdesi, HD=Hücre Durumu, CHİ=Canlı Hücre İmgesi, ÖHİ=Ölü Hücre İmgesi, olarak ifade edilmektedir.

Çizelge 4.1. İmge veri seti analiz sonuçları

İmge No.	HD	%A1	%A2	%A3	%A4	%AO	ASS	%VK	%AS
1	CHİ	3,228	4,277	4,034	5,863	4,351	0,956	21,97	4,740
	ÖHİ	0,205	0,246	0,318	0,420	0,297	0,081	27,40	0,394
2	CHİ	3,335	3,613	3,387	5,332	3,917	0,824	21,03	4,156
	ÖHİ	0,277	0,756	0,491	0,041	0,391	0,264	67,47	0,301
3	CHİ	3,922	6,554	6,76	13,971	7,802	3,733	47,85	6,336
	ÖHİ	0,254	0,331	0,572	0,439	0,399	0,120	29,96	0,219
4	CHİ	5,037	3,648	4,189	5,668	4,635	0,775	16,72	4,936
	ÖHİ	0,343	0,227	0,673	0,230	0,368	0,182	49,47	0,142
5	CHİ	4,438	7,670	6,146	4,531	5,696	1,327	23,29	5,883
	ÖHİ	0,202	0,658	0,522	0,124	0,376	0,221	58,64	0,122

Çizelge 4.1. İmge veri seti analiz sonuçları (Devam)

6	CHİ	5,649	6,351	8,107	11,235	7,835	2,157	27,53	7,201
	ÖHİ	0,538	0,658	1,457	0,311	0,741	0,432	58,25	0,620
7	CHİ	2,234	3,837	4,592	12,415	5,770	3,930	68,12	6,896
	ÖHİ	0,105	0,114	0,251	1,175	0,411	0,445	108,13	0,432
8	CHİ	6,028	7,669	10,801	8,848	8,337	1,740	20,87	6,767
	ÖHİ	0,357	0,249	1,213	0,066	0,471	0,441	93,51	0,306
9	CHİ	3,804	3,858	8,435	12,584	7,170	3,647	50,87	8,238
	ÖHİ	0,021	0,060	0,659	0,878	0,404	0,372	92,06	0,137
10	CHİ	5,028	6,489	10,361	7,683	7,390	1,956	26,47	7,770
	ÖHİ	0,5	0,328	0,827	0,061	0,429	0,278	64,78	0,288
11	CHİ	2,402	3,273	2,811	11,208	4,924	3,641	73,96	6,051
	ÖHİ	0,167	0,163	0,277	0,838	0,361	0,279	77,23	0,581
12	CHİ	1,238	1,566	2,033	3,561	2,100	0,890	42,39	3,340
	ÖHİ	0,083	0,166	0,158	0,143	0,138	0,033	23,65	0,059
13	CHİ	1,543	2,740	2,871	2,030	2,296	0,540	23,51	3,347
	ÖHİ	0,233	0,193	0,348	0,108	0,221	0,086	39,10	0,166
14	CHİ	2,453	3,526	3,064	3,358	3,100	0,409	13,18	4,362
	ÖHİ	0,501	0,878	0,381	0,188	0,487	0,252	51,68	0,215
15	CHİ	1,155	1,212	0,848	1,546	1,190	0,248	20,81	1,614
	ÖHİ	0,099	0,217	0,206	0,300	0,206	0,071	34,76	0,094
16	CHİ	1,165	2,697	3,173	3,540	2,644	0,905	34,21	2,354
	ÖHİ	0,373	0,147	0,391	0,513	0,356	0,132	37,12	0,429
17	CHİ	3,814	3,090	4,776	5,230	4,228	0,832	19,69	5,024
	ÖHİ	0,145	0,401	0,386	0,235	0,292	0,107	36,59	0,259

Çizelge 4.1. İmge veri seti analiz sonuçları (Devam)

18	CHİ	4,202	4,817	6,591	6,726	5,584	1,097	19,65	5,957
	ÖHİ	0,109	0,063	0,232	0,323	0,182	0,102	56,29	0,044
19	CHİ	3,685	3,729	4,874	3,324	3,903	0,582	14,92	4,533
	ÖHİ	0,217	0,225	0,839	0,921	0,551	0,331	60,09	0,832
20	CHİ	4,128	3,031	5,111	6,279	4,637	1,200	25,88	4,962
	ÖHİ	0,105	0,225	0,383	0,264	0,244	0,099	40,63	0,134
21	CHİ	1,948	4,002	3,126	5,632	3,677	1,344	36,54	3,915
	ÖHİ	0,115	0,100	0,334	0,236	0,196	0,095	48,62	0,322
22	CHİ	3,028	4,981	2,981	5,863	4,213	1,249	29,63	4,740
	ÖHİ	0,251	0,202	0,423	0,516	0,348	0,127	36,51	0,394
23	CHİ	1,162	1,212	2,903	2,236	1,878	0,731	38,90	2,532
	ÖHİ	0,122	0,571	0,302	0,782	0,444	0,252	56,75	0,179
24	CHİ	10,666	10,997	12,548	16,502	12,678	2,319	18,29	10,279
	ÖHİ	0,2	0,252	0,2	0,221	0,218	0,021	9,75	0,091
25	CHİ	2,048	4,351	5,755	12,731	6,221	3,985	64,047	7,711
	ÖHİ	0,203	0,145	0,203	0,476	0,257	0,129	50,166	0,000
26	CHİ	6,657	5,187	12,197	7,388	7,857	2,628	33,446	6,282
	ÖHİ	1,545	1,142	2,279	2,252	1,804	0,483	26,743	0,058
27	CHİ	4,236	4,021	7,349	10,574	6,545	2,673	40,843	7,320
	ÖHİ	0,964	0,140	3,933	0,000	1,259	1,587	126,029	0,657
28	CHİ	3,598	2,651	4,960	9,390	5,150	2,582	50,140	6,453
	ÖHİ	0,833	0,894	2,993	1,557	1,569	0,870	55,417	0,504
29	CHİ	4,980	2,412	7,827	7,308	5,632	2,146	38,105	5,546
	ÖHİ	0,539	0,104	4,008	0,695	1,337	1,557	116,525	2,230

Çizelge 4.1. İmge veri seti analiz sonuçları (Devam)

30	CHİ	1,576	1,529	6,760	6,340	4,051	2,503	61,789	6,530
	ÖHİ	0,555	0,471	1,495	0,245	0,691	0,478	69,066	2,234
31	CHİ	1,220	0,570	7,190	5,046	3,507	2,729	77,826	6,527
	ÖHİ	0,109	0,375	0,435	0,183	0,276	0,134	48,558	0,018
32	CHİ	2,137	3,310	11,083	2,444	4,744	3,685	77,688	4,727
	ÖHİ	0,103	0,145	0,843	0,587	0,420	0,309	73,751	0,000
33	CHİ	0,816	0,626	3,326	9,023	3,448	3,390	98,342	5,751
	ÖHİ	0,333	0,086	0,527	0,156	0,275	0,171	62,055	0,911
34	CHİ	0,581	0,478	4,302	3,563	2,231	1,722	77,177	3,484
	ÖHİ	0,034	0,031	0,109	0,229	0,101	0,080	79,672	0,511
35	CHİ	1,922	2,021	7,878	2,500	3,580	2,491	69,573	2,471
	ÖHİ	0,153	0,196	1,500	0,372	0,555	0,552	99,345	0,651

İstatistiksel analizler sonucunda elde edilen varyasyon katsayılarının değişim aralığı ve veri seti içindeki ortalama varyasyon katsayısı hesaplanarak Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

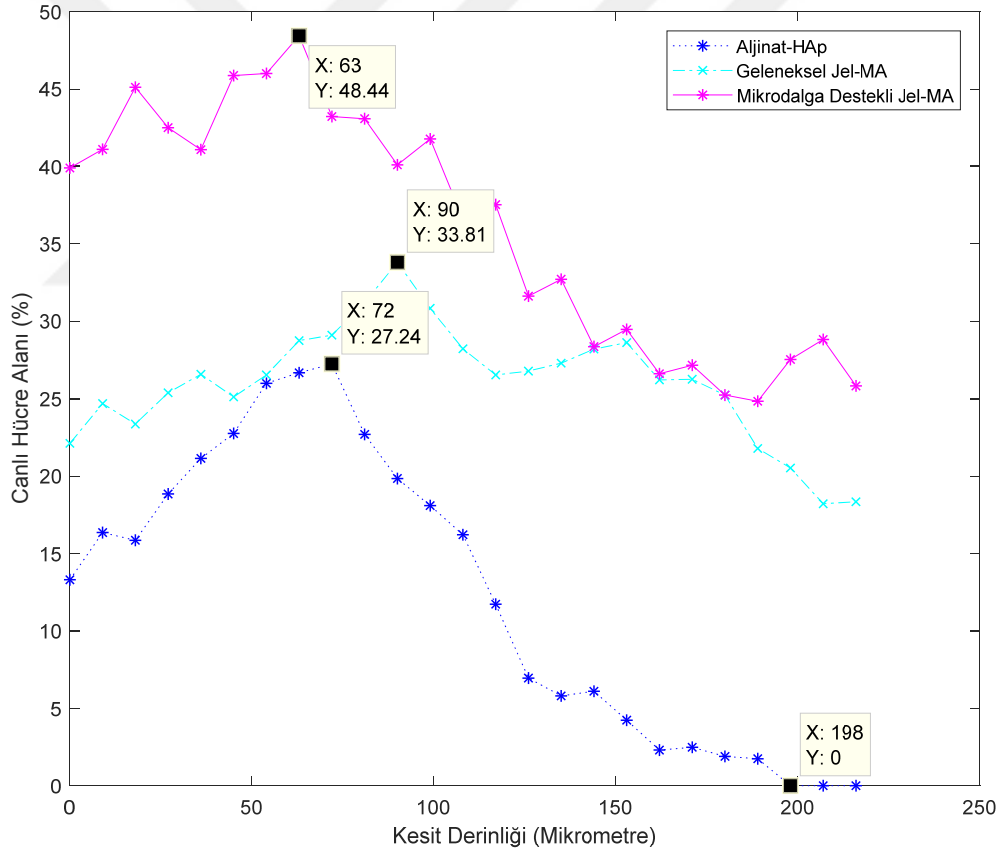
Çizelge 4.2. Analist ölçümlerinin istatistiksel analiz özeti

	Varyasyon Katsayısı Yüzdeleri Aralığı (%)	Varyasyon Katsayısı Yüzdelerinin Ortalaması (%)
Canlı Hücre İmgesi	13,18 – 98,34	40,72
Ölü Hücre İmgesi	9,75 – 126,02	59,02

Çizelge 4.2 incelendiğinde, analistlerin canlı hücre imgelerindeki ölçüm sapmaları %13,18 ile %98,34 arasında değişim gösterirken, ölü hücre imgelerindeki ölçüm sapmaları ise %9,75 ile %126,02 arasında değişim göstermiştir. Bu sapmalara ait ortalama değerler ise canlı hücrelere ait imgelerde %40,72 ve ölü hücrelere ait imgelerde %59,02 olarak hesaplanmıştır.

4.1.2 Doku İskelesinde Derinliğe Bağlı Analiz Sonuçları

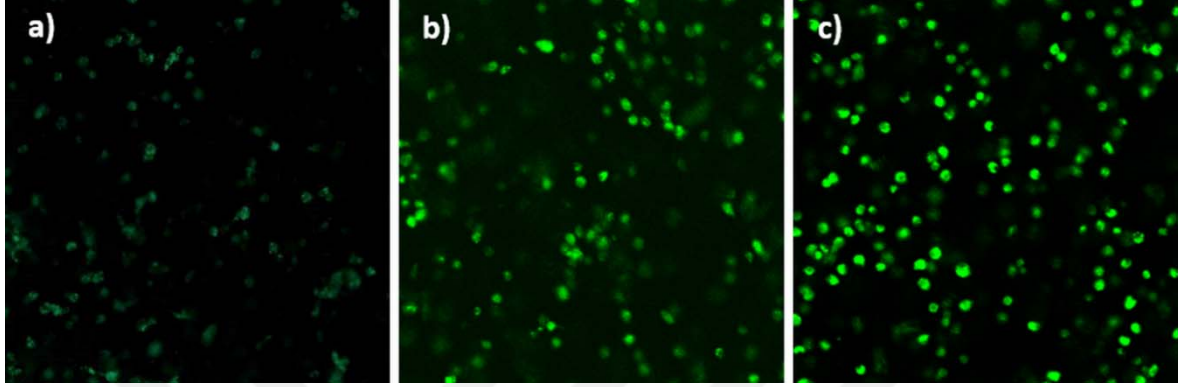
Hücre çalışmalarının son aşamasında, tasarlanan algoritma ile üç farklı doku iskelesine ait imge veri setleri incelenmiştir. İncelemede, doku iskelelerinin derinliğine bağlı hücre canlılıkları karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemi ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.3’de hücre canlılığının derinliğe bağlı fonksiyonu olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.3. Hücre iskelelerindeki canlılığın derinliğe bağlı analizi

Şekil 4.3'teki grafik incelendiğinde, maksimum hücre canlılıkları 63 µm ve 90 µm derinlik aralığında elde edilmiştir. Mikrodalga destekli Jel-MA, aljinat-HAp ve

geleneksel Jel-MA iskeleleri için bu noktalar sırasıyla 63 μm , 72 μm ve 90 μm olarak tespit edilmiştir. Aljinat-HAp doku iskelesinde 72 μm derinliğinden sonra hızla azalan hücre canlılığı, 198 μm derinliğinde sıfır olarak tespit edilmiştir. Yüzdoksansekiz (198) μm derinlikten sonra hücre canlılığı tespit edilmemiştir. Maksimum hücre canlılığının elde edildiği noktalardaki imgeler Şekil 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.4. Maksimum hücre canlılığının elde edildiği üç ayrı doku iskelesi imgesi: a) Aljinat-HAp (72 μm), b) Geleneksel Jel-MA (90 μm), c) Mikrodalga destekli Jel-MA (63 μm)

4.2 Doku İskelesi Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Bu bölümde, nanofiber ve mikro metal çubuk yapılara ait SEM imgelerinin bölütlenmesi için tasarlanan algoritmanın sonuçları detaylandırılmıştır. Bölüm 3.5'te detaylandırılan algoritma basamağının ilk adımında imgeye ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem (gürültü temizleme) sonucunda elde edilen image, üç ayrı bölütleme yöntemi ile bölütlenerek, bölütleme sonucundaki imgeler YBÖ indeksi kullanılarak karşılaştırılmıştır. YBÖ indeks eşliğini (%25) geçen imgelerin en yüksek iki YBÖ indeks değerine sahip olanları birleştirilmiştir. Birleştirme işleminden sonra istenmeyen küçük nesneler YBÖ indeksi kullanılarak temizlenmiştir. Temizleme işleminin tamamlanmasından sonra kullanıcının YBÖ indeksini kullanarak uygulayabildiği morfolojik işlemlerin tamamlanması ile bölütleme işlemleri sonlandırılmıştır. Fiber yapılarının bölütlenmesinden sonra uzaklık dönüşüm metodu kullanılarak çap ve gözenek değerleri analiz edilmiştir. Bölüm 4.2.1'de imgelerin bölütlenmesinde başarılı olmuş yöntemlerin ikili durumlarına ait birer örnek verilmiştir. Bölüm 4.2.2'de geliştirilen algoritmaya ait tüm bölütleme sonuçları ile DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları özetlenmiştir. Bu yaklaşımlara ait bölütleme sonuçları YBÖ indeksi kullanılarak orijinal imgeler ile karşılaştırılmıştır.

Bölüm 4.2.3 ile 4.2.4'te çap ve gözenek analizlerinin sonuçları ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

4.2.1 Algoritmaya Ait Bölütleme Sonuçları

Bölütleme işlemlerinde kullanılan yöntemlerin sonuçlarının detaylandırıldığı bu bölümde bölütleme işlemlerinin farklı durumları incelenmiştir.

4.2.1.1 Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme

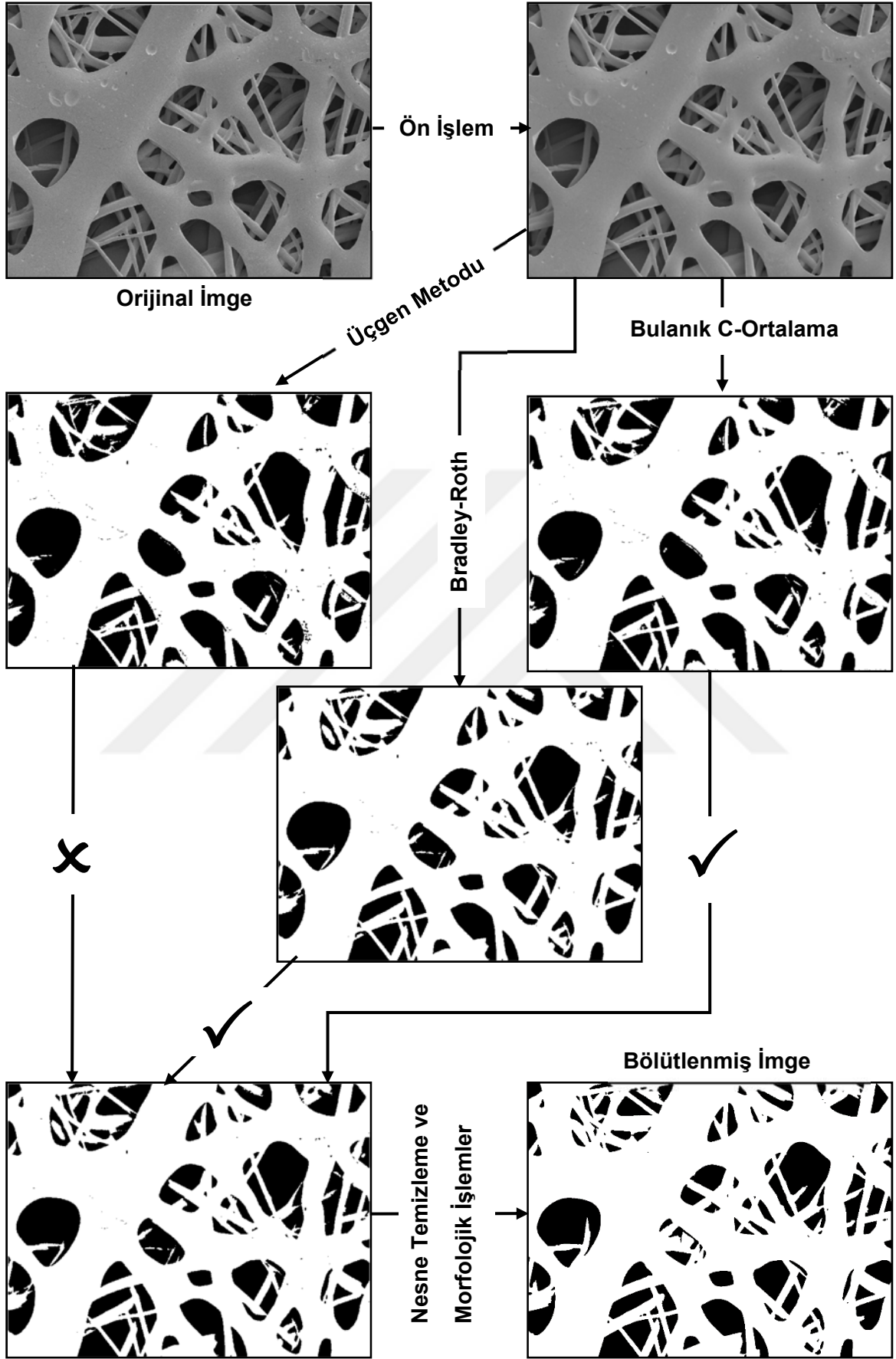
Yöntem seçimlerinde, YBÖ indeksi en büyük iki değere sahip olan Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme yöntemlerinin seçimi ile ilgili bir örnek bu bölümde detaylandırılmıştır. Orijinal imgeden başlayarak bölütlenmiş imgeye kadar tüm basamakların sonuçları Şekil 4.5'te özetlenmiştir.

4.2.1.2 Üçgen metodu ile bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme

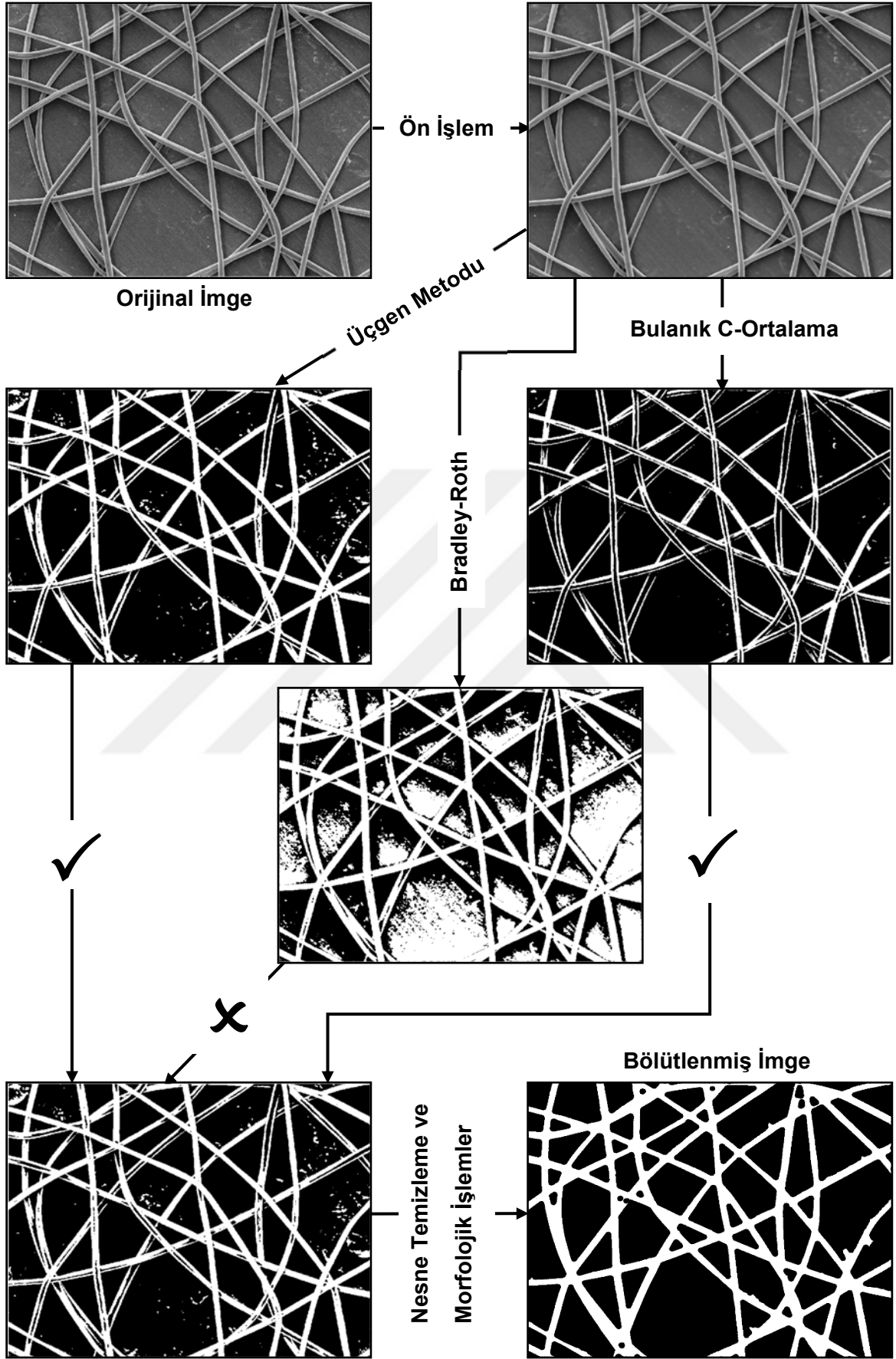
Yöntem seçimlerinde, YBÖ indeksi en büyük iki değere sahip olan üçgen metodu ile bölütleme ve bulanık c-ortalama kümeleme ile bölütleme yöntemlerinin seçimi ile ilgili bir örnek bu bölümde detaylandırılmıştır. Orijinal imgeden başlayarak bölütlenmiş imgeye kadar tüm basamakların sonuçları Şekil 4.6'te özetlenmiştir.

4.2.1.3 Üçgen metodu ile bölütleme ve Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme

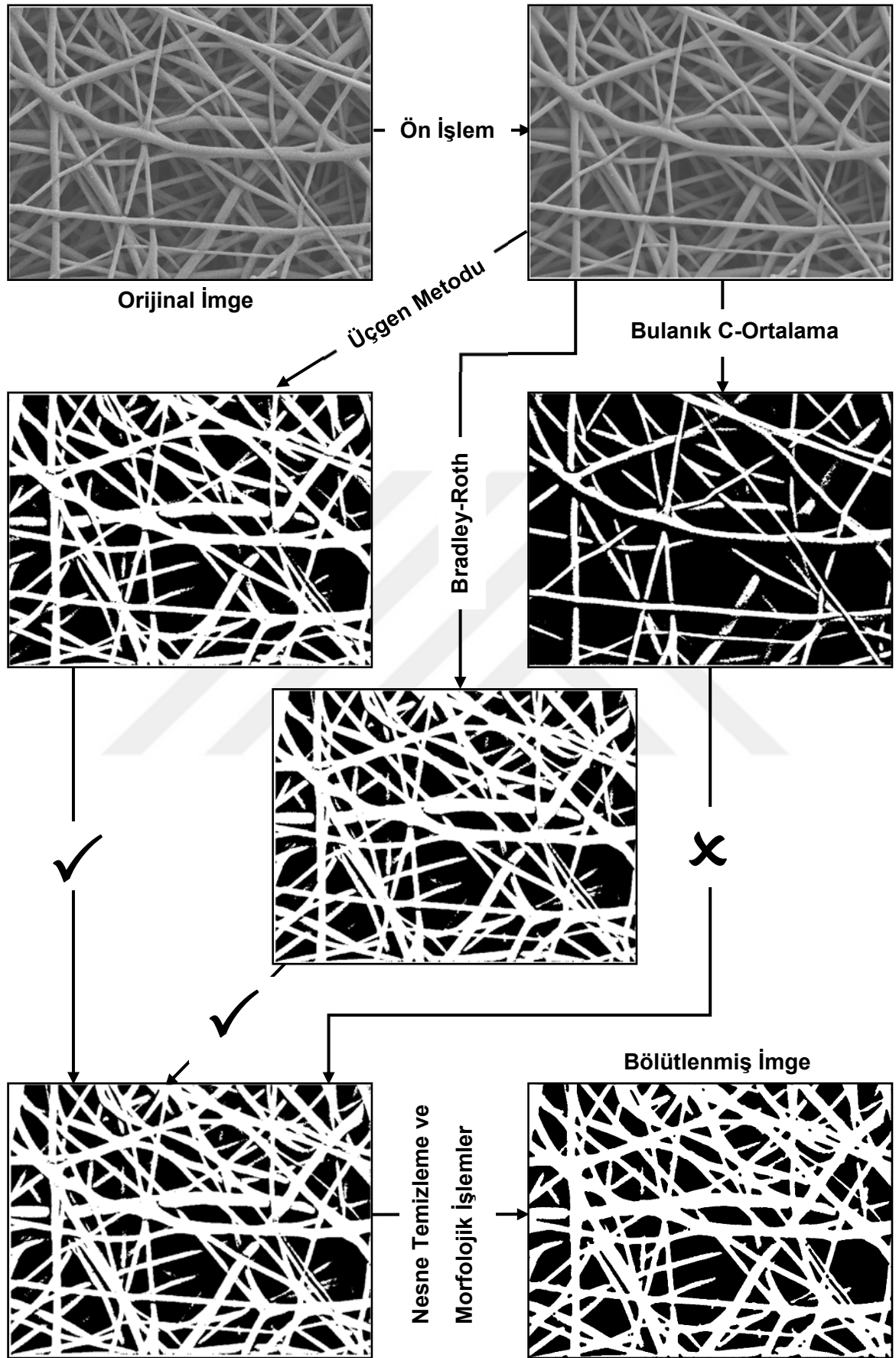
Yöntem seçimlerinde, YBÖ indeksi en büyük iki değere sahip olan üçgen metodu ile bölütleme ve Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme yöntemlerinin seçimi ile ilgili bir örnek bu bölümde detaylandırılmıştır. Orijinal imgeden başlayarak bölütlenmiş imgeye kadar tüm basamakların sonuçları Şekil 4.7'de özetlenmiştir.



Şekil 4.5. Bradley-Roth ve bulanık c-ortalama yöntemlerinin seçimi



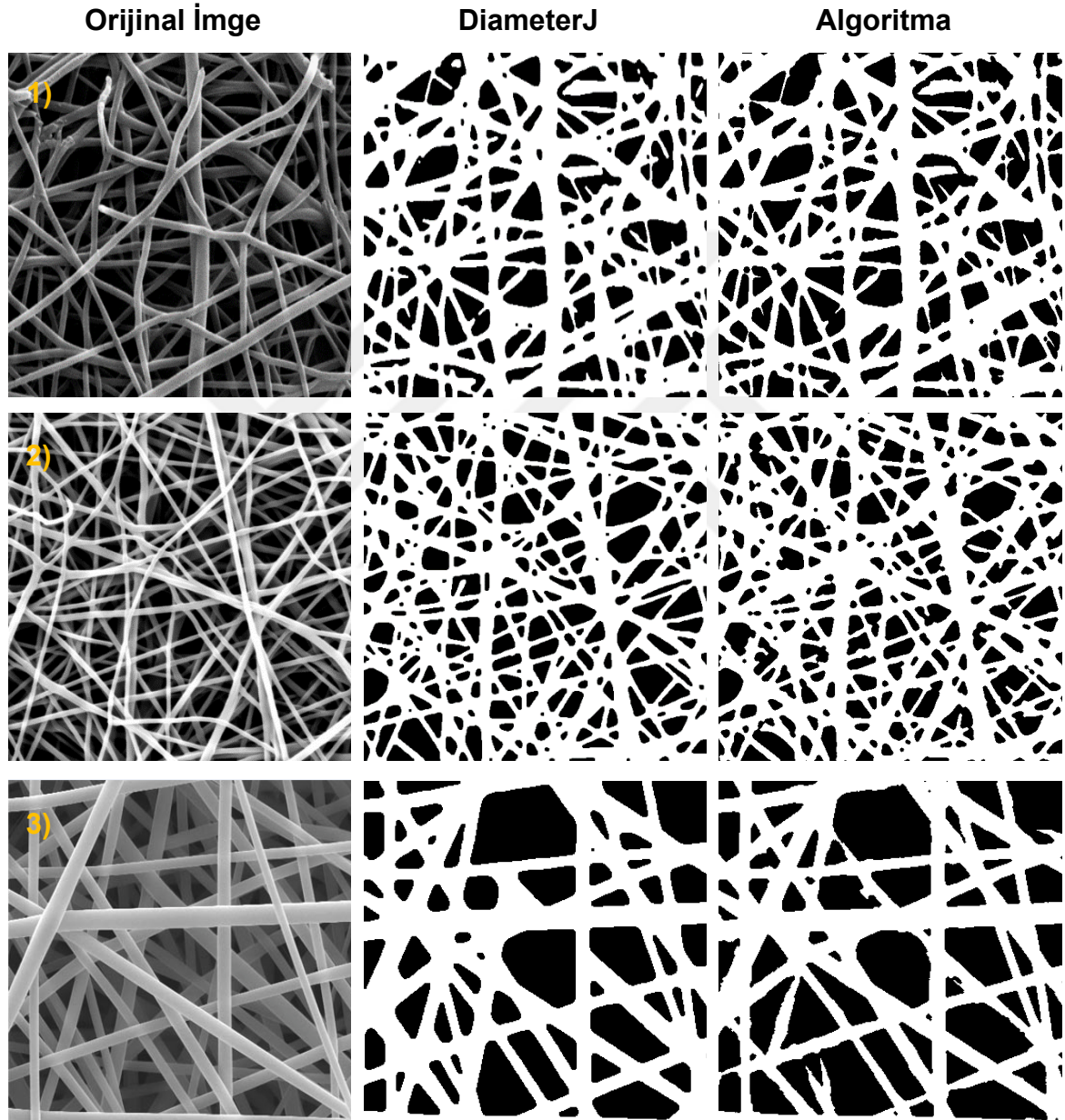
Şekil 4.6. Üçgen ve bulanık c-ortalama yöntemlerinin seçimi



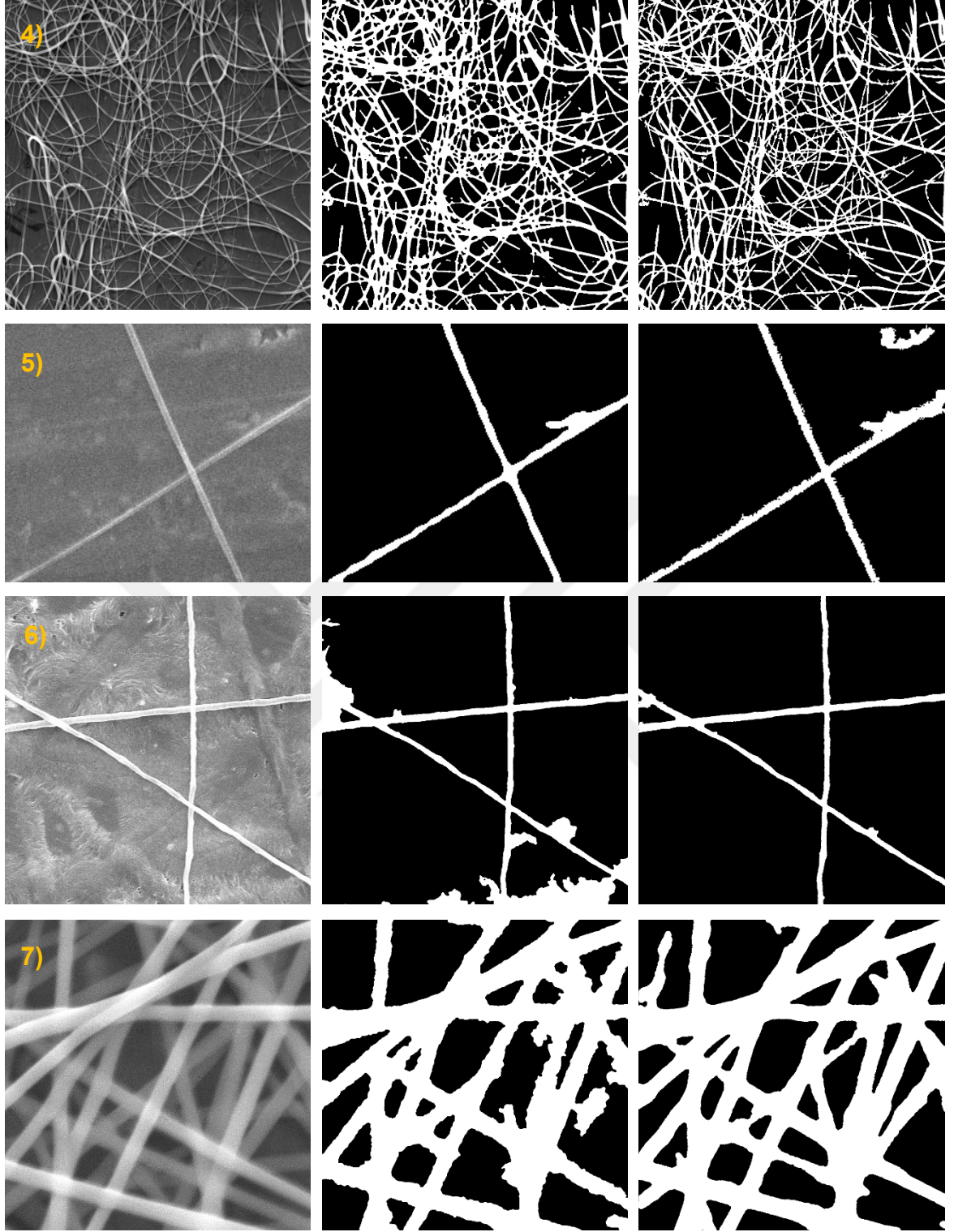
Şekil 4.7. Üçgen ve Bradley-Roth yöntemlerinin seçimi

4.2.2 Algoritma ve DiameterJ Sonuçlarının Karşılaştırılması

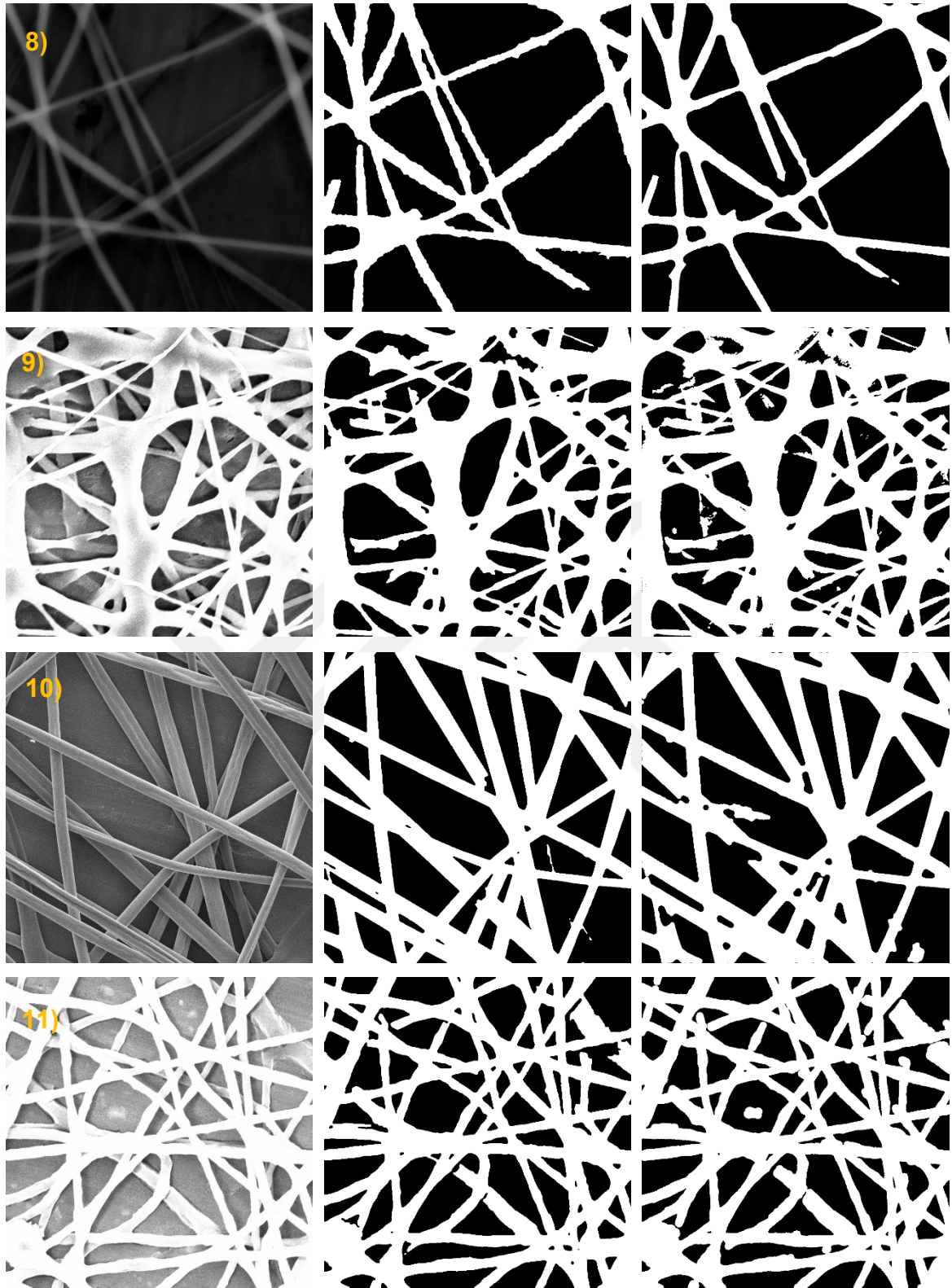
Bölüm 4.2.1’de birer örneği verilen seçim ve bölütleme işlemleri EK 5’te yer alan tüm veri setine uygulanmıştır. Aynı veri seti kullanılarak DiameterJ yazılımı ile bölütleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Orijinal ve yaklaşımlar ile bölütlenmiş imgeler Şekil 4.8’de detaylandırılmıştır.



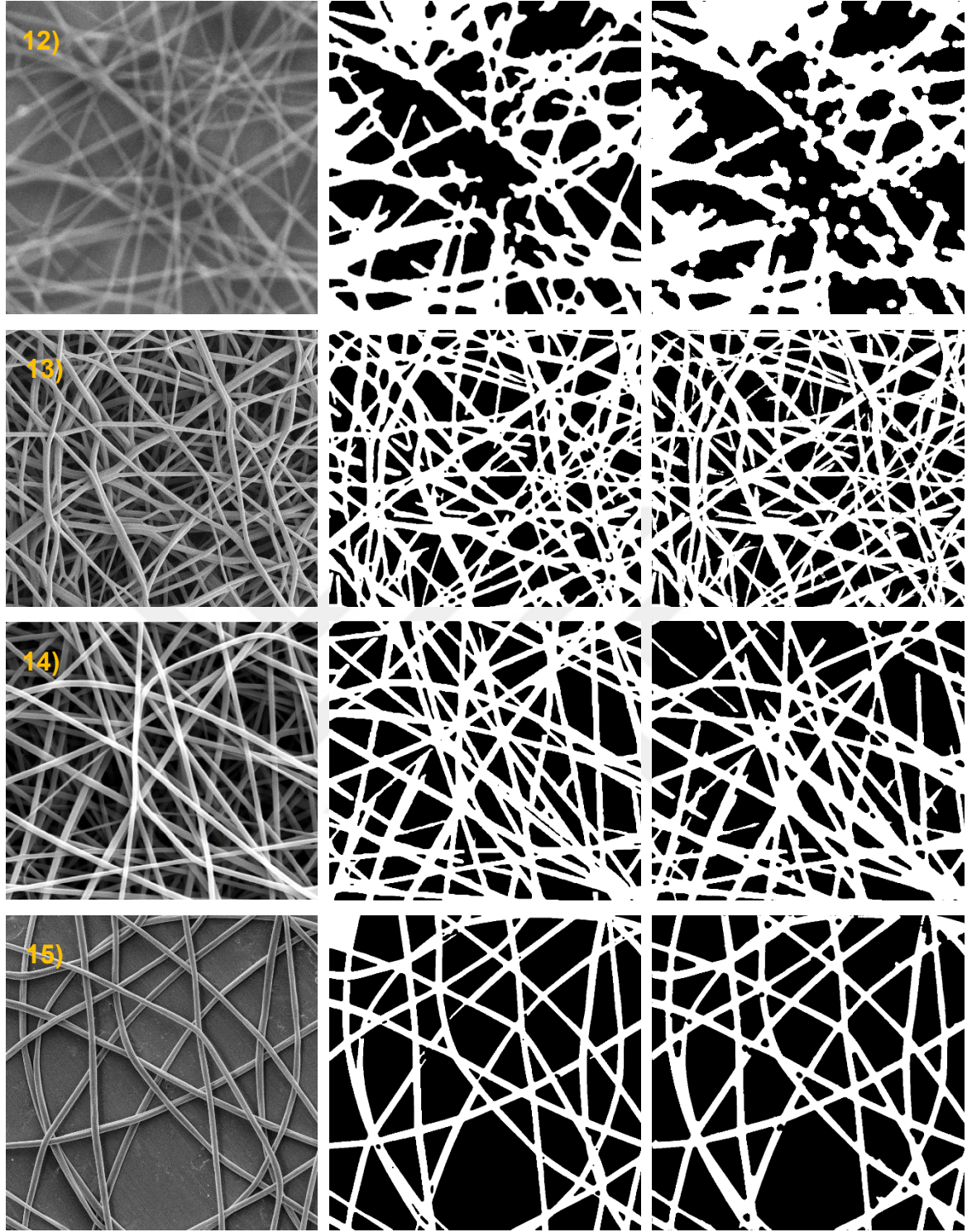
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları



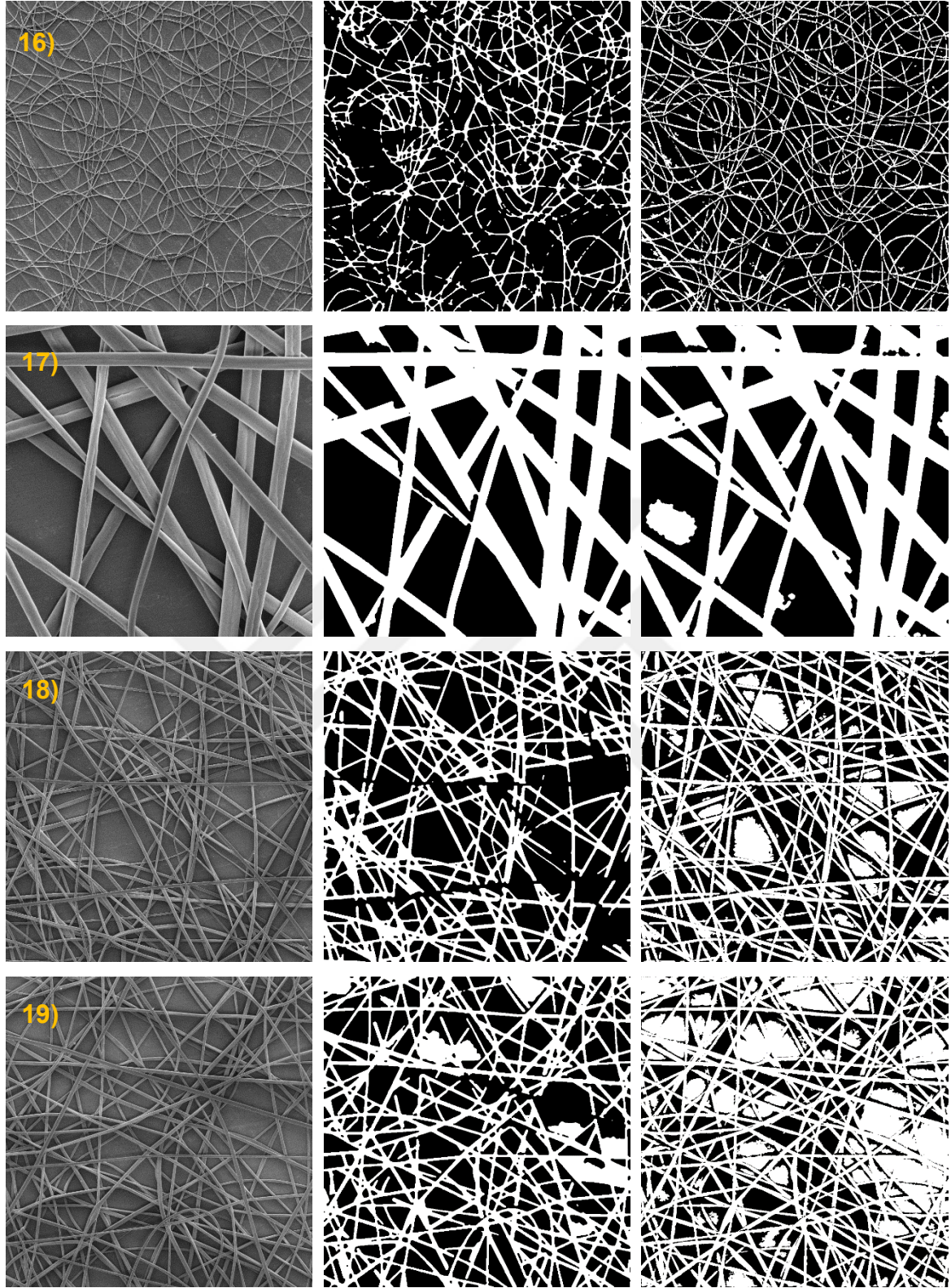
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



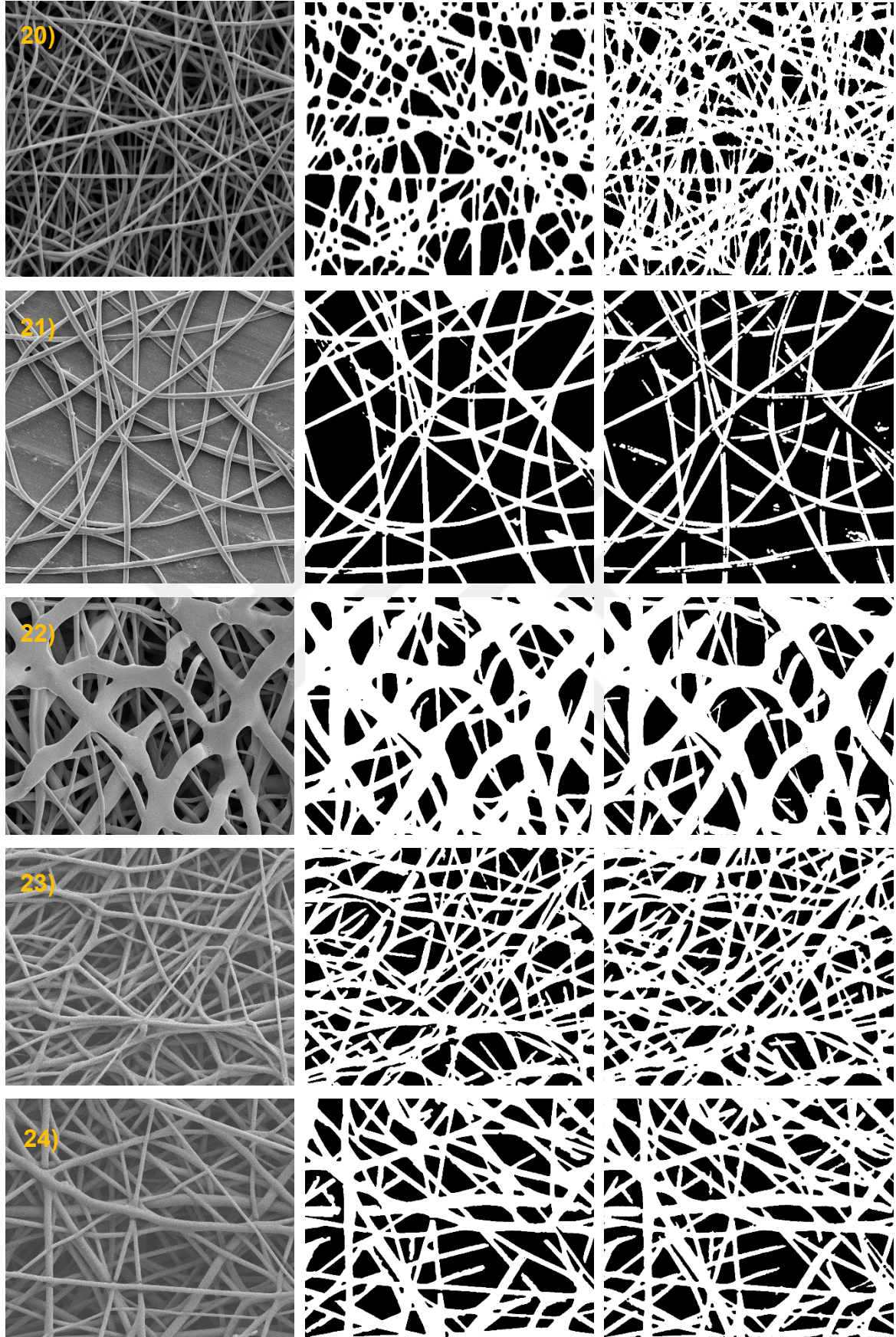
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



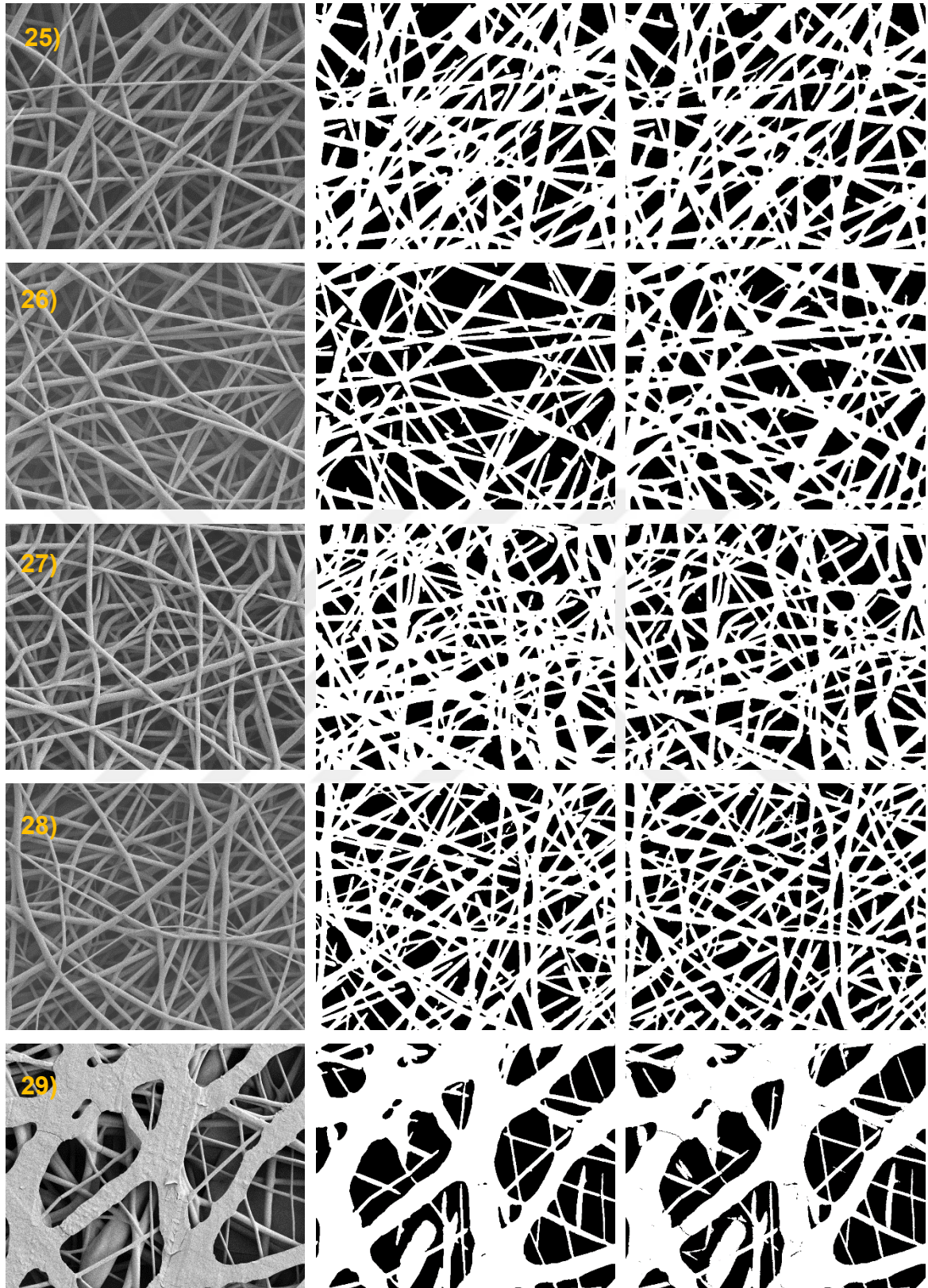
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



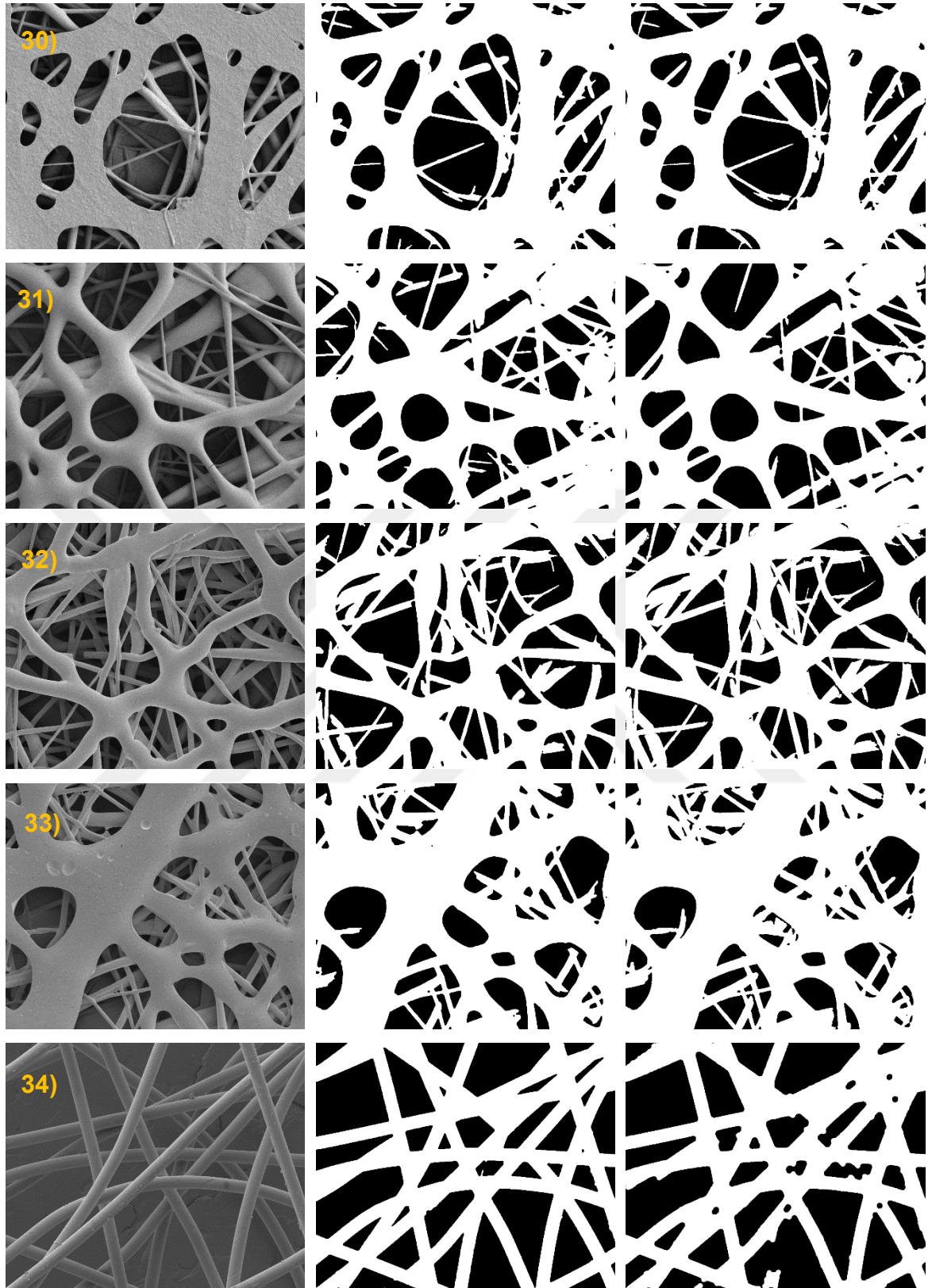
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



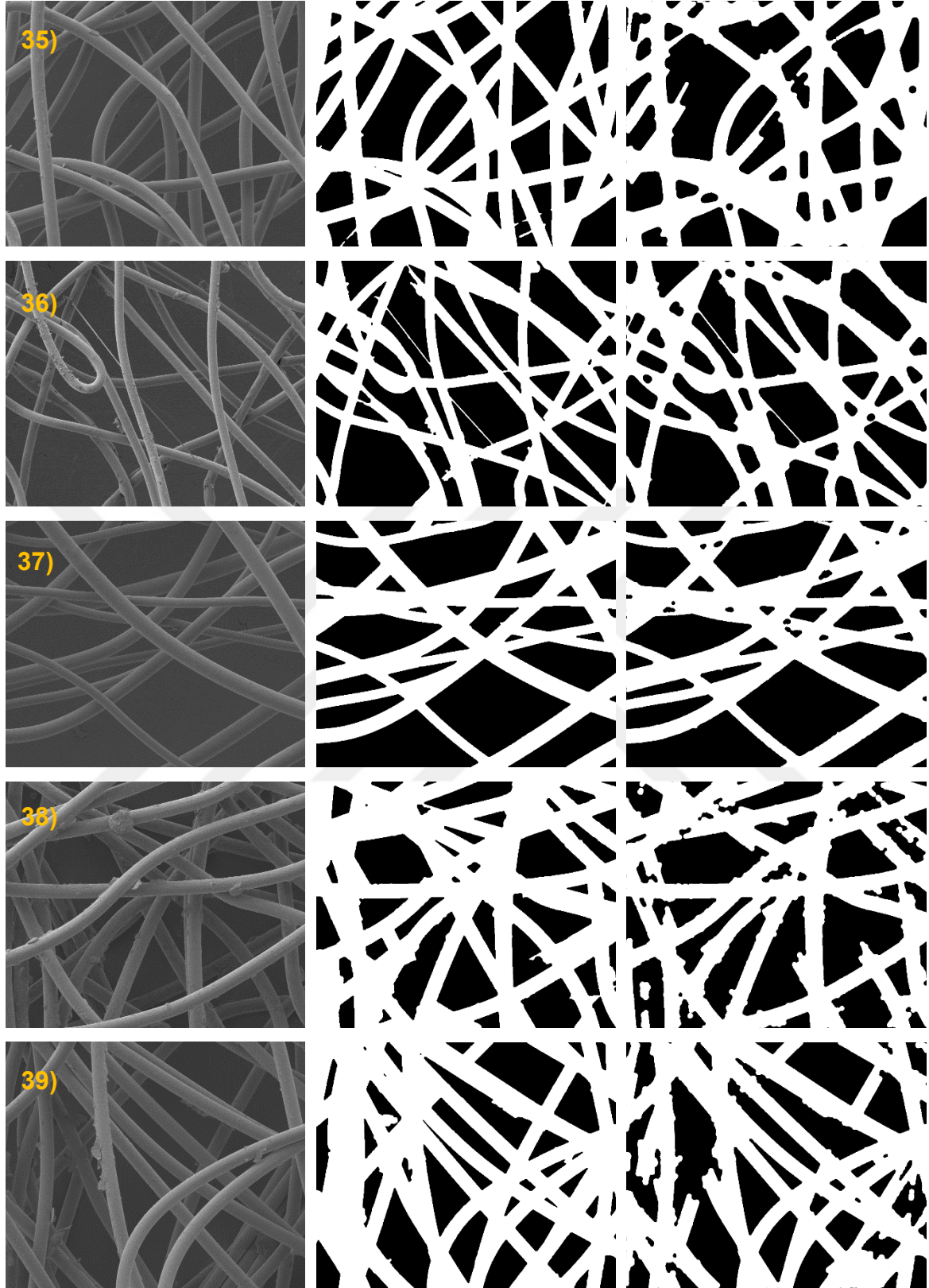
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



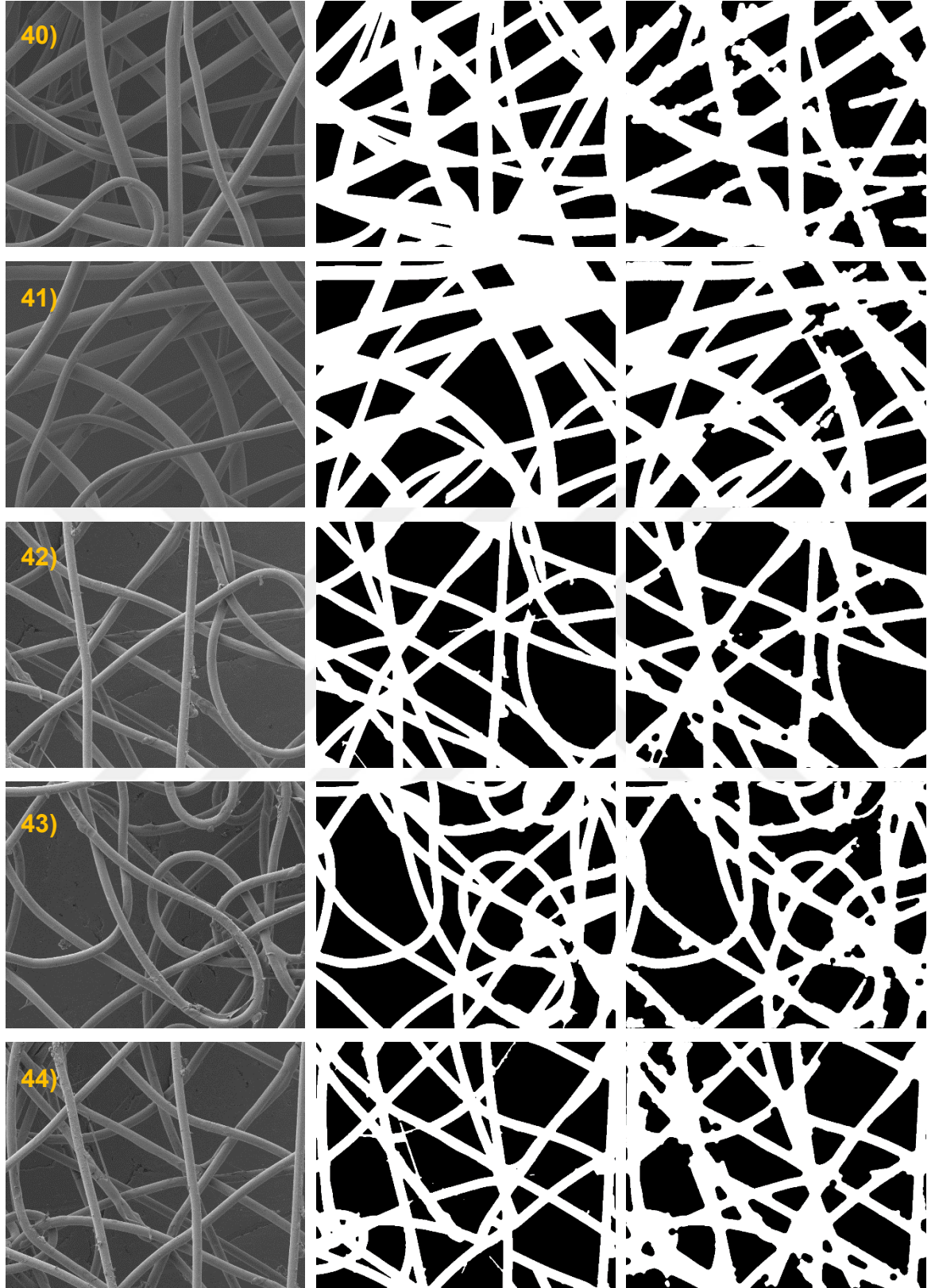
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



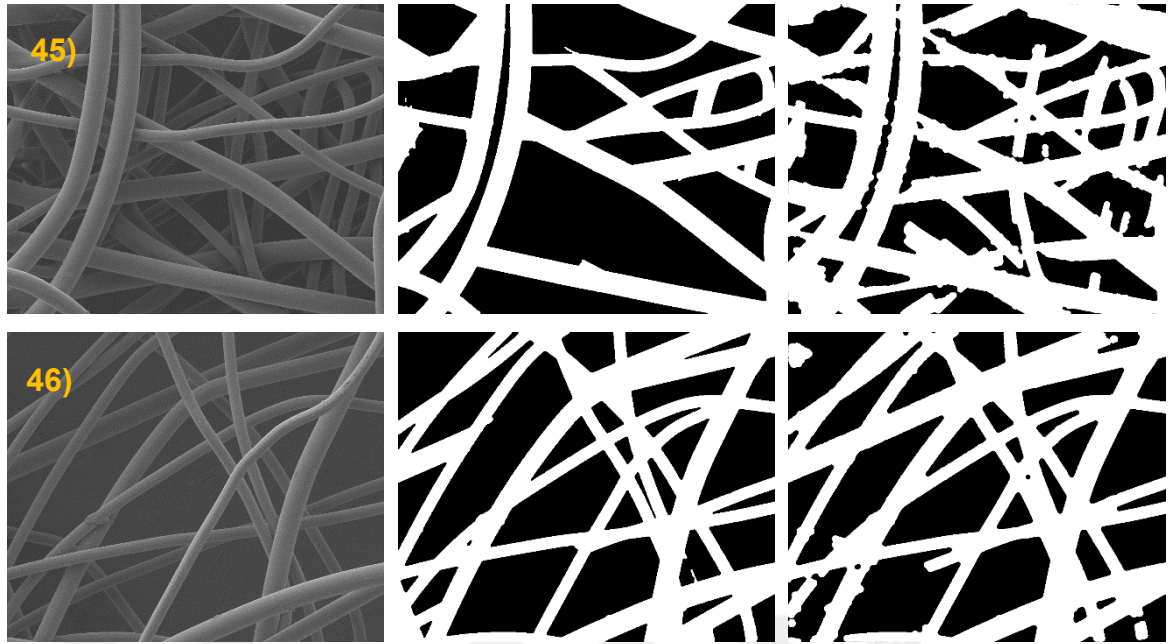
Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)



Şekil 4.8. Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımına ait bölütleme sonuçları
(Devam)

Tasarlanan algoritma ve DiameterJ yazılımı ile bölütleme işlemleri sonucunda elde edilen imgeler YBÖ indeksi kullanılarak orijinal imgeler ile karşılaştırılmıştır. YBÖ indeksine göre 0 ile 1 arasında elde edilen dört anlamlı değerlerle yöntemlerin birbirine olan üstünlüğü değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. YBÖ indeks değerlerine göre yöntemlerin karşılaştırılması

İmge No.	DiameterJ YBÖ İndeksi	Algoritma YBÖ İndeksi	Üstün Yaklaşım
1	0,6845	0,6918	Algoritma
2	0,7171	0,6652	DiameterJ
3	0,8533	0,8953	Algoritma
4	0,6778	0,7319	Algoritma
5	0,9579	0,9387	DiameterJ
6	0,9724	0,9835	Algoritma
7	0,9319	0,9245	DiameterJ
8	0,9155	0,9178	Algoritma
9	0,9188	0,9622	Algoritma

Çizelge 4.3. YBÖ indeks değerlerine göre yöntemlerin karşılaştırılması (Devam)

10	0,9601	0,9508	DiameterJ
11	0,9466	0,9445	DiameterJ
12	0,7231	0,7278	Algoritma
13	0,8158	0,8434	Algoritma
14	0,8628	0,8715	Algoritma
15	0,9212	0,9226	Algoritma
16	0,7475	0,9663	Algoritma
17	0,9605	0,9431	DiameterJ
18	0,7919	0,7470	DiameterJ
19	0,7759	0,7066	DiameterJ
20	0,6407	0,5617	DiameterJ
21	0,9116	0,9302	Algoritma
22	0,9431	0,9709	Algoritma
23	0,8087	0,8113	Algoritma
24	0,6263	0,8564	Algoritma
25	0,6873	0,8311	Algoritma
26	0,4643	0,8412	Algoritma
27	0,6797	0,8217	Algoritma
28	0,7919	0,8118	Algoritma
29	0,9670	0,9676	Algoritma
30	0,9635	0,9678	Algoritma
31	0,9282	0,9304	Algoritma
32	0,9503	0,9754	Algoritma
33	0,9613	0,9578	DiameterJ
34	0,9631	0,9504	DiameterJ
35	0,9549	0,9464	DiameterJ
36	0,9530	0,9369	DiameterJ
37	0,9626	0,9373	DiameterJ
38	0,8389	0,9404	Algoritma
39	0,9666	0,9452	DiameterJ
40	0,8211	0,9514	Algoritma
41	0,8055	0,9407	Algoritma

Çizelge 4.3. YBÖ indeks değerlerine göre yöntemlerin karşılaştırılması (Devam)

42	0,9551	0,9405	DiameterJ
43	0,9502	0,9269	DiameterJ
44	0,9474	0,9414	DiameterJ
45	0,7858	0,9447	Algoritma
46	0,9566	0,9380	DiameterJ

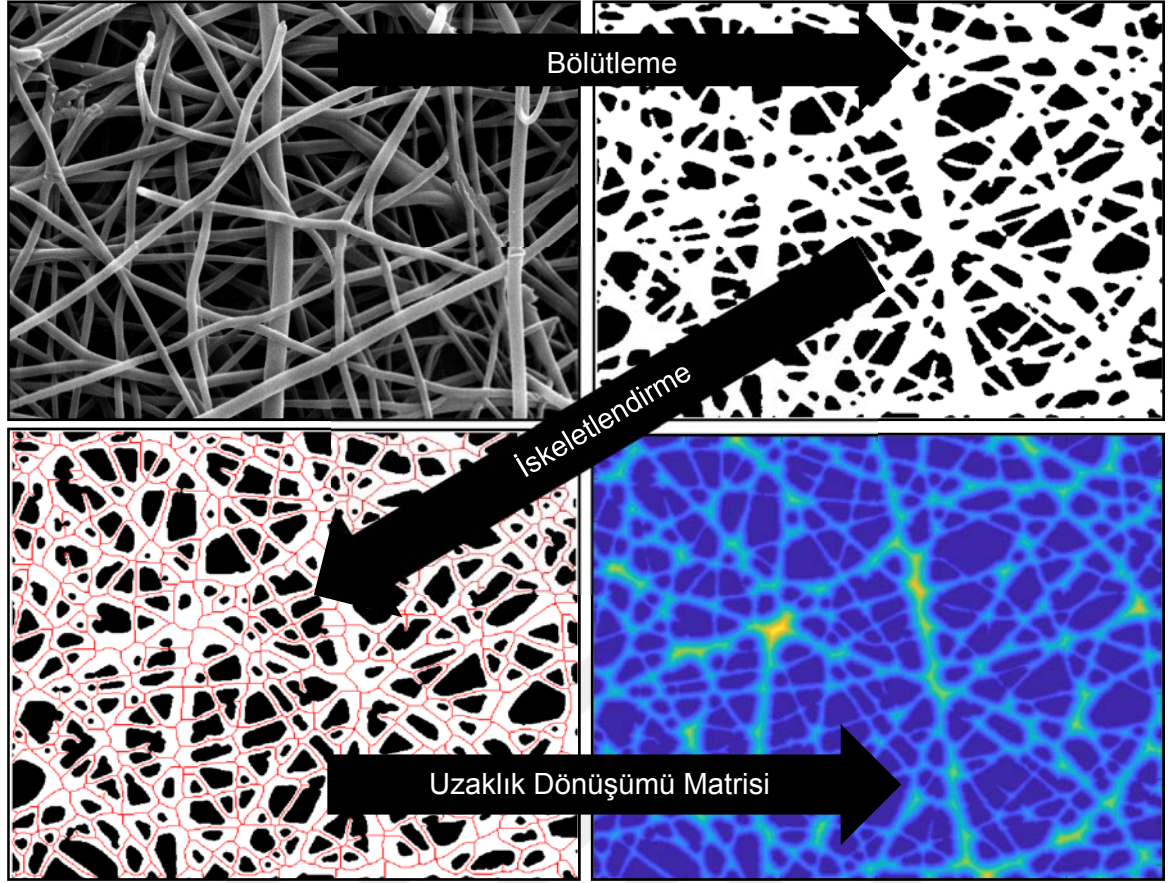
Elde edilen karşılaştırma sonuçlarına göre (Çizelge 4.4), 27 adet imgede tasarlanan algoritmanın indeks değeri daha yüksekken, 19 adet imgede DiameterJ yazılımının indeks değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, YBÖ indeks değerleri DiameterJ yazılımı için 0,4643 ile 0,9724 arasında elde edilirken, tasarlanan algoritma için 0,5617 ile 0,9835 arasında elde edilmiştir. DiameterJ yazılımı ile bölütleme sonucunda, tasarlanan algoritmaya göre YBÖ indeksinde daha düşük sonuç elde edilmiş imgelerdeki indeks farkı 0,0006 ile 0,3769 arasındadır. Tasarlanan algoritma ile bölütleme sonucunda, DiameterJ yazılımına göre YBÖ indeksinde daha düşük sonuç elde edilmiş imgelerdeki indeks farkı ise 0,0021 ile 0,079 arasındadır.

Çizelge 4.4. Yaklaşımların YBÖ indeks değerleri analizi

Yaklaşım	YBÖ İndeks Değer Aralığı	Başarısız İmgelerdeki YBÖ İndeks Farkı Değer Aralığı
Algoritma	0,5617 ile 0,9835	0,0021 ile 0,079
DiameterJ	0,4643 ile 0,9724	0,0006 ile 0,3769

4.2.3 Algoritmaya Ait Çap Analizi Sonuçları

Sunulan tez çalışmasında, Bölüm 3.5.8.1’de detaylandırılan yaklaşım (uzaklık dönüşüm metodu) ile çap değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



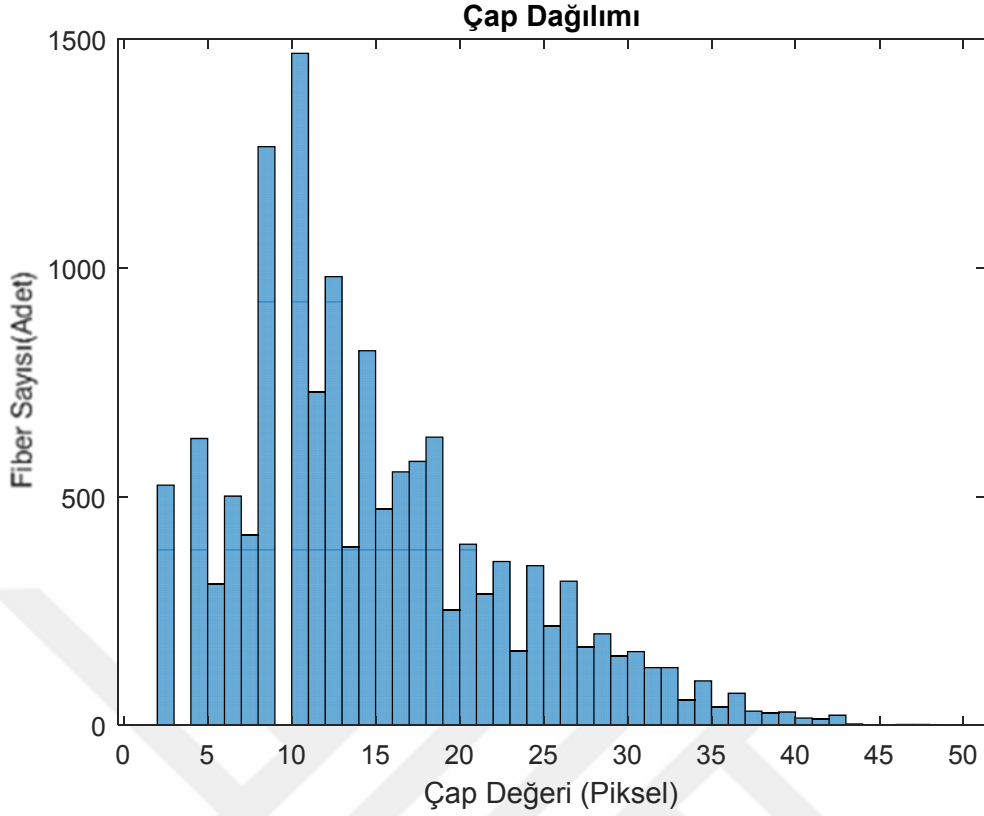
Şekil 4.9. İskeletlendirme ve uzaklık dönüşümü metodu ile çapların hesaplanması

Hesaplamalar sonucunda, minimum ve maksimum çap değerleri ile çap değerlerinin dağılım grafikleri belirlenmiştir. Tasarlanan algoritmada, minimum çap değeri her imge için iki piksellik sonuç üretmektedir. Bu durum, bölütlenmiş fiberlerde sivrilen ve küçülen uçlar sebebi ile oluşmuştur. Minimum çap değerinin doğru belirlenmesi için kullanıcıya manuel bir ölçüm arayüzü ile düzeltme opsiyonu sağlanmıştır. 46 adet imge veri seti için hesaplanan fiber çap aralıkları piksel birimi ile Çizelge 4.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. Minimum ve maksimum çap değerleri

İmge No.	Minimum Çap Değeri (Piksel)	Maksimum Çap Değeri (Piksel)	İmge No.	Minimum Çap Değeri (Piksel)	Maksimum Çap Değeri (Piksel)
1	4,85	48,83	24	11,66	82,29
2	5,74	49,52	25	7,78	76,03
3	7,80	38,21	26	10,12	78,41
4	4,03	24,74	27	8,40	71,81
5	6,33	16,00	28	6,01	56,00
6	19,88	33,53	29	8,14	164,16
7	12,88	153,70	30	8,28	375,37
8	6,52	78,92	31	11,39	163,67
9	13,60	138,85	32	8,35	175,28
10	21,36	106,30	33	15,23	287,47
11	10,97	114,07	34	46,90	147,58
12	6,50	62,64	35	44,41	168,11
13	6,52	40,50	36	34,23	119,08
14	8,03	100,66	37	36,43	142,39
15	15,39	52,15	38	24,03	138,52
16	4,03	14,42	39	27,86	134,95
17	18,39	122,02	40	35,34	182,44
18	4,27	89,20	41	20,00	152,12
19	4,01	80,62	42	32,70	141,68
20	3,17	26,00	43	36,69	116,28
21	8,54	26,91	44	34,69	154,26
22	8,33	160,86	45	33,24	128,56
23	10,37	76,94	46	32,56	118,47

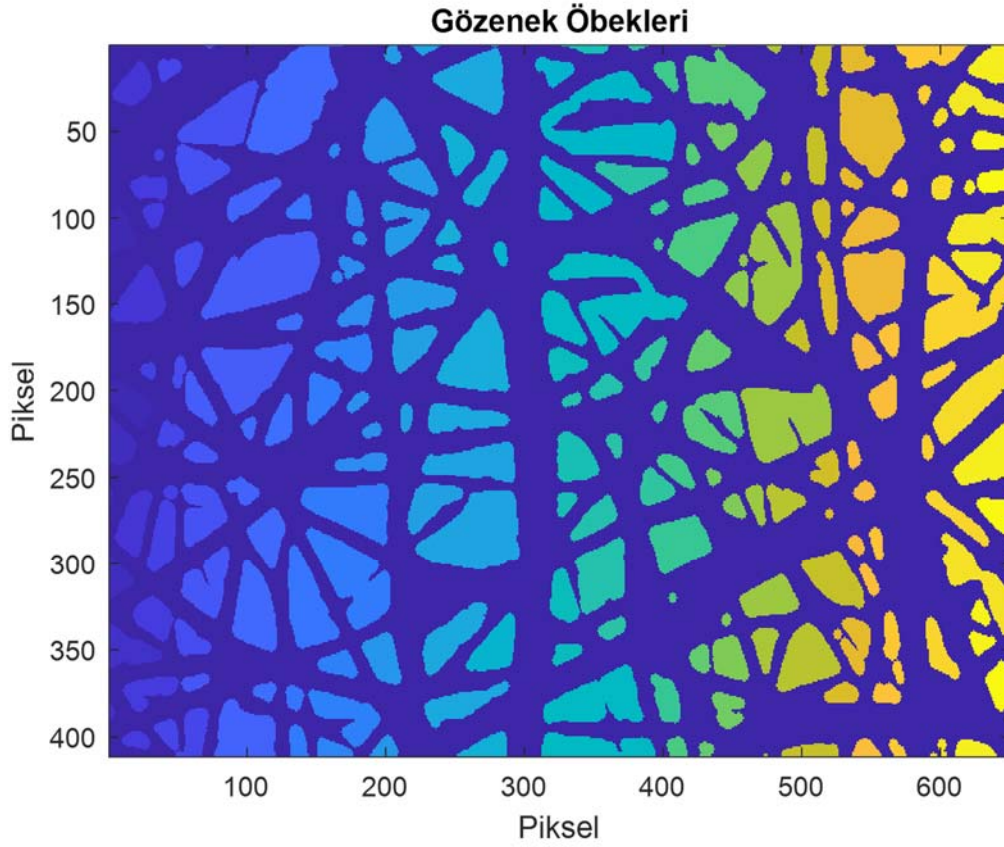
Ayrıca sunulan tez çalışmasında, analizi gerçekleştirilen bölütlenmiş imgenin çap değerlerine ait dağılım grafikleri hesaplanmıştır. Şekil 4.9'daki imgeye ait örnek dağılım grafiği Şekil 4.10'da detaylandırılmıştır. Kırkaltı (46) adet imge veri setine ait çap dağılım grafikleri EK 6'da özetlenmiştir.



Şekil 4.10. Çap değerlerine ait dağılım grafiği

4.2.4 Algoritmaya Ait Gözenek Analizi Sonuçları

Sunulan tez çalışmasında, çap analizleri gerçekleştirildikten sonra son adımda fiberler arasındaki gözenek yapıları piksel² biriminden karakterize edilmiştir. Bu karakterizasyon işlemi Bölüm 3.5.8.2’de detaylandırılan yöntemle gözenek öbeklerinin belirlenmesi komşuluk ilişkileri kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 4.9’daki imgeye ait gözenek karakterizasyon matrisine ait örnek Şekil 4.11’de detaylandırılmıştır. Kırkaltı (46) adet imge veri setine ait gözenek karakterizasyon matrisleri EK 7’de özetlenmiştir.



Şekil 4.11. Komşuluk ilişkilerine bağlı gözenek öbeklerinin belirlenmesi

46 adet imge veri seti için hesaplanan gözenek alan değerleri piksel² birimi ile Çizelge 4.6'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.6. Minimum ve maksimum gözenek alan değerleri

İmge No.	Minimum Gözenek Alanı (Piksel ²)	Maksimum Gözenek Alanı (Piksel ²)	İmge No.	Minimum Gözenek Alanı (Piksel ²)	Maksimum Gözenek Alanı (Piksel ²)
1	271	4624	24	356	40149
2	185	4500	25	353	21375
3	44	6184	26	378	18931
4	757	34344	27	457	15393
5	7184	20780	28	689	13576
6	3823	221020	29	717	44888
7	301	50677	30	375	75280
8	324	119823	31	351	47835

Çizelge 4.6. Minimum ve maksimum gözenek alan değerleri (Devam)

9	271	35618	32	388	43902
10	293	48231	33	374	28038
11	277	32469	34	348	63177
12	68	33293	35	509	84450
13	503	8969	36	455	75050
14	416	56421	37	427	94178
15	313	75414	38	445	57153
16	483	25392	39	585	90520
17	387	47404	40	354	56777
18	288	14007	41	498	33291
19	323	9536	42	359	98181
20	257	3184	43	359	108926
21	289	79244	44	365	67560
22	358	21639	45	444	35913
23	367	16246	46	376	63292

46 adet imge veri seti için hesaplanan gözenek alan yüzdeleri Çizelge 4.7’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7. İmgelerdeki toplam gözenek alan yüzdeleri

İmge No.	Gözenek Alan Yüzdesi (%)	İmge No.	Gözenek Alan Yüzdesi (%)
1	37,75	24	43,62
2	33,96	25	38,83
3	48,85	26	39,80
4	64,96	27	39,64
5	92,18	28	41,62
6	94,19	29	37,10
7	45,61	30	30,31
8	73,83	31	37,12
9	37,05	32	38,84
10	51,08	33	22,41

Çizelge 4.7. İmgelerdeki toplam gözenek alan yüzdeleri (Devam)

11	43,52	34	49,41
12	48,13	35	40,18
13	44,05	36	51,64
14	54,36	37	50,23
15	69,28	38	44,87
16	76,67	39	39,58
17	46,06	40	39,52
18	47,92	41	41,35
19	38,17	42	57,79
20	33,02	43	50,88
21	71,40	44	49,95
22	37,01	45	38,85
23	37,08	46	53,09

4.3 Tartışma

4.3.1 Hücre Çalışmalarına Ait Sonuçların Yorumlanması

Sunulan tez çalışmasının ilk bölümünde, doku iskelelerindeki hücrelerin canlılık özellikleri incelenmiştir. Bu bağlamda, 3B biyoyazıcı ile üretilmiş doku iskelelerindeki hücre canlılığının incelenebilmesine olanak sağlayan otomatikleştirilmiş bir yazılım tasarlanması hedeflenmiştir. Üretilen bu yazılım ile hücre kültür çalışmalarından elde edilen LTKM imgelerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Analizde, renkli LTKM imgeleri, canlı ve ölü hücre imgelerine ayrıştırılmış ve hücre alanları tespit edilmiştir.

Hücre alanlarının doğru tespit edilebilmesi ise bölütleme işlemlerinin başarısı ile doğru orantılıdır. Algoritmaya ait ölçümlerin doğruluğunun tespit edilebilmesi için alanlarında uzmanlaşmış analistlerin görsel incelemeleri ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, dört ayrı analistin ölçümleri kaydedilerek üretilen algoritmaya ait sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca analistlere ait ölçümler de kendi içinde değerlendirilmiştir. Yaklaşımlar karşılaştırıldığında, analistlere ait ölçüm ortalamaları ile algoritmaya ait ölçüm değerlerinin benzeştiği belirlenmiştir. Ancak bu noktada, yöntemsel karşılaştırmalarda kesin bir doğruluktan söz edilememektedir. İmge analizlerinde, ağırlık ya da uzunluk ölçümü gibi altın standart bir doğrunun bulunmaması sebebiyle yaklaşımlar arasındaki karşılaştırmaların da

doğruluğu tartışmalıdır. Öte yandan, yaklaşımlardaki ölçümlerin kendi içindeki tutarlılıkları incelenebilmekte ve sayısallaştırılabilmektedir [33]. Sunulan tez çalışmasında, analist sonuçları incelendiğinde, analistler arasında yüksek oranlarda ölçüm farklılıkları tespit edilmiştir. Bu ölçüm farklılıkları, varyasyon katsayısı olarak adlandırılan bir istatistiksel analizle sayısallaştırılmıştır. Analizler sonucunda, analistler arasındaki ölçüm farklılıkları canlı hücre imgelerinde %13,18 ile %98,34 arasında, ölü hücre imgelerinde ise %9,75 ile %126,02 arasında belirlenmiştir. Ayrıca bu ölçüm farklılıklarına ait değerlerin ortalaması canlı hücre imgelerinde %40,72 ve ölü hücre imgelerinde ise %59,02 olarak hesaplanmıştır.

Tespit edilen bu ölçüm farklılıkları, analizlerin görsel inceleme ile gerçekleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Görsel inceleme, subjektif sonuçlar doğrulamakta ve çalışmanın sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir [34,96]. Bununla birlikte, analist ölçümleri tekrarlanabilir değildir. Bu nedenle, aynı analist birbirinden farklı ölçümler gerçekleştirilebilmekte ve yine aynı analistin ölçümleri arasındaki farklılıklar da analistin uzmanlık derecesi ile doğru orantılıdır. Bu farklılıkların kaynağı, insan gözü algısının birbiri ile aynı olmaması ile açıklanabilir. İnsan gözünün subjektif analizinin kaynağı ise görsel algının, beyinde farklı yorumlanabilmesinden kaynaklanmaktadır [99]. Dolayısıyla bu subjektif değerlendirme çalışmalarda doğru olmayan sonuçlar üreterek, çalışmaları yanlış yönlendirebilmektedir. İnsan algısının yarattığı bu subjektifliği ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen otomatikleştirilmiş yazılımlar ise daha çok tercih edilir olmuştur. Bu durumun gelişmesindeki önemli etkenlerden biri, analist etkisinden bağımsız olması ile tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesidir. Bir diğer önemli etken ise, analistlerin analiz sürelerine göre aynı ölçümleri çok daha kısa sürelerde gerçekleştirebilmeleridir.

Tasarlanan algoritmanın etkinliği tespit edildikten sonra, üç ayrı doku iskelesine ait imge veri setleri analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda elde edilen ölçümlerde, en yüksek canlılığa sahip doku iskelesi mikrodalga destekli jel-MA olarak tespit edilmiştir. En düşük canlılığa sahip doku iskelesi ise aljinat-HAp yapısına aittir. Üç doku iskelesinin de ortak özelliği, hücre canlılığı en yüksek değere ulaştıktan sonra hücre canlılığının derinlik arttıkça azalmasıdır. Bu durum difüzyon fiziğinin doğal bir sonucudur. Ancak difüzyonu artıran fiziksel yapısı ile jel-MA doku iskelelerinde hücre canlılığı derinlikten daha az etkilenmiştir. Aljinat-HAp doku iskelesinde ise

fiziksel yapısı itibariyle hücre canlılığının difüzyon etkisiyle hızla azaldığı gözlemlenmiştir. Yüzdoksansekiz (198) µm derinlikten sonra ise hücresel aktiviteye rastlanmamıştır.

4.3.2 Doku İskelesi Çalışmalarına Ait Sonuçların Yorumlanması

Sunulan tez çalışmasının ikinci bölümünde, doku iskelelerine ait yapısal özelliklerin incelenmesi amacıyla yeni bir yazılım tasarlanmıştır. Bu yazılımda, literatürde bölütleme yöntemi olarak kullanılan üç farklı yöntemin uyarlamalı analiz gerçekleştirebildiği bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bulanık c-ortalama kümeleme, Bradley-Roth uyarlamalı bölütleme ve üçgen metodu ile bölütleme yöntemlerinin kullanıldığı uyarlamalı bu yaklaşımda, imgelere ait parlaklık ve karşıtlık problemlerinden en az etkilenmesi hedeflenmiştir. Bu sebeple üç farklı bölütleme yaklaşımı olan kümeleme, yerel eşikleme ve histograma bağlı eşikleme gibi tekniklerin birer uygulaması olan bu yöntemler tercih edilmiştir. Yöntemlerin bölütleme başarısı ise YBÖ indeksi olarak adlandırılan bir analiz ve karakterizasyon yöntemi ile sayısallaştırılmıştır. Bu sayısallaştırma işlemi kullanılarak bölütlenmiş imgelerin seçimi gerçekleştirilmiştir. Bölütleme işlemleri tamamlandıktan sonra, literatürde yer alan DiameterJ yazılımı ile tasarlanan algoritmanın sonuçları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmanın, DiameterJ yazılımı ile gerçekleştirilmesindeki temel motivasyon hem erişilebilir bir yazılım olması hem de literatürde yer alan çalışmalardaki sonuçların YBÖ indeksi ile incelenememesi gibi nedenlerdir.

Bu karşılaştırmada kullanılması amacıyla, 46 adet siyah-beyaz fiber imgesini içeren bir veri seti oluşturulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, 46 adet imgenin 27 tanesinin bölütlenmesinde geliştirilen algoritma daha başarılı sonuçlar vermiştir. Diğer 19 adet imgede ise, DiameterJ yazılımı ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İki yaklaşımın da başarısızlıklarının analizinde, YBÖ indeks farkları incelenmiştir. Geliştirilen algoritma ile elde edilen sonuçlarda başarısız imgelerin, başarılı DiameterJ imgeleri ile aralarındaki YBÖ indeksi farkı 0,0021 ile 0,079 aralığında elde edilmiştir. Buna karşılık, tam tersi durum için ise, bu fark 0,0006 ile 0,3769 aralığında elde edilmiştir.

Algoritmanın, DiameterJ yazılımına karşı daha başarılı sonuçlar vermesi ve YBÖ indeksi değeri düşük imgelerine ait YBÖ indeksi farkının daha az olması, yaklaşımın uyarlamalı olmasıyla açıklanabilir. Analizlerde kullanılan bölütleme yöntemlerine ait parametreler, orijinal imgeye bağlı kalınarak belirlenmektedir. Dolayısıyla, bu

durumda orijinal imgeye özgün sonuçlar üretilmektedir. Bununla birlikte, parlaklık ve karşıtlık özellikleri ile doğrudan ilgili olan başarı yüzdeleri incelendiğinde, bu özelliklerden en az etkilenen yaklaşımın geliştirilen algoritma olduğu tespit edilmiştir. YBÖ indeks değeri daha düşük hesaplanan imgeler, YBÖ indeksi yüzde değer olarak incelendiğinde geliştirilen algoritma en yüksek %7,9'luk bir hata payına sahipken, bu oran DiameterJ yazılımında %37,69'lara kadar çıkabilmektedir.

Başarım değerlendirmesi tamamlandıktan sonra, bölütlenmiş imgelerde fiziksel özelliklerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve her bir doku iskelesine ait fiber yapı özellikleri (çap aralığı ile çap dağılımı, minimum ve maksimum çap değeri) ile gözenek yapı özellikleri (minimum maksimum gözenek boyutu ve toplam gözenek yüzdesi) tespit edilmiştir.



5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, doku mühendisliğinde malzemeye ve hücresel özelliklere ait imgeler görüntü işleme teknikleri ile incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Tez çalışmasının ilk bölümünde, doku iskelesindeki hücresel canlılığın derinliğe bağlı olarak karakterize edildiği bir yazılım tasarlanmış ve yazılımın sonuçları analist incelemeleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise, doku iskelesini oluşturan fiber yapıları ve gözenekleri karakterize edebilen bir yazılım tasarlanmıştır. Bu yazılımın sonuçları, DiameterJ yazılımı ile karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında elde edilen veriler aşağıda özetlenmiştir.

- Hücre canlılığının incelenmesi için geliştirilecek algoritmanın test edilmesi için 35 imgelik veri seti oluşturulmuştur.
- Algoritmanın geliştirilmesinden sonra yazılımın sonuçları analist ölçümleri ile karşılaştırılmıştır.
- Karşılaştırmalar sonucunda analistlerin ölçümlerinin ortalaması ile algoritma sonuçlarının birbirine yakınsadığı belirlenmiştir.
- Analist ölçümlerinin sapma değerleri (varyasyon katsayısı), canlı hücre imgelerinde %13,18 ile %98,34 ve ölü hücre imgelerinde ise %9,75 ile %126,02 arasında değiştiği tespit edilmiştir.
- Geliştirilen algoritma ile üç ayrı doku iskelesindeki hücre canlılığı incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda maksimum hücre canlılıkları mikrodalga destekli Jel-MA, aljinat-HAp ve geleneksel Jel-MA iskeleleri için sırasıyla 63 μm , 72 μm ve 90 μm derinliklerinde tespit edilmiştir.
- Üç ayrı doku iskelesinde de maksimum canlılık değerinin elde edildiği derinlikten sonra hücre canlılığının difüzyona bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.
- Hücresel aktivitenin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla doku iskelelerine ait fiziksel özelliklerin analizini gerçekleştirebilen otomatikleştirilmiş bir yazılım geliştirilmiştir. Bu yazılımın test edilebilmesi için 46 imgelik bir veri seti oluşturulmuştur.
- Bu yazılım doku iskelelerine ait SEM imgelerinde parlaklık ve karşıtlık değerlerinden en az etkilenecek uyarlamalı bir yaklaşım olarak geliştirilmiştir.

- Bu yaklaşımda, üç ayrı bölütleme yönteminin ortak analiz gerçekleştirdiği ve YBÖ indeks değerleri ile uyarlamalı seçimle bölütleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Kırkaltı (46) imgelik veri setinin bölütleme işlemlerinin tamamlanmasının ardından DiameterJ yazılımı ile aynı veri seti analiz edilmiştir.
- İki yaklaşımın bölütleme sonuçları YBÖ indeksi kullanılarak karşılaştırıldığında, geliştirilen algoritmanın 27 imgede, DiameterJ yazılımının 19 imgede en yüksek YBÖ indeks değerine sahip olduğu belirlenmiştir.
- Yaklaşımların başarısız sonuçları incelendiğinde ise DiameterJ yazılımının hatalı bölütlenmiş imgelerine ait YBÖ indeks değerlerinin tasarlanan algoritmaya oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir.
- DiameterJ yazılımına ait başarısız imgelerin YBÖ indeksi ile tasarlanan algoritmaya ait başarılı imgeler arasındaki YBÖ indeksi farkı 0,0006 ile 0,3769 aralığında elde edilmiştir. Tam tersi durum için ise bu fark 0,0021 ile 0,079 aralığında elde edilmiştir.
- Bölütleme işlemleri sonrasında, bu imgeler kullanılarak fiberlere ait özellikler (çap aralığı ile çap dağılımı, minimum ve maksimum çap değeri) ile gözenek yapı özellikleri (minimum, maksimum gözenek boyutu ve toplam gözenek yüzdesi) tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar ve tamamlanan analizler sonrasında gelecekteki çalışmalar için belirlenen hedefler aşağıda özetlenmiştir.

- Hücre çalışmalarında yer alan yaklaşım karşılaştırmalarında yer alan analist sayısının artırılarak, karşılaştırmaya ait güvenilirliğin artırılması hedeflenmiştir.
- Yine hücre çalışmalarında, doku iskelesinde derinliğe bağlı hücre canlılığının analizi için doku iskelesi örnekleri artırılarak, doku iskelelerindeki hücre canlılık örneklerinin detaylandırılması hedeflenmiştir.
- Doku iskelesi çalışmalarında fiber yapıların bölütlenmesinde kullanılan yöntemlerin YBÖ indeksi ile kontrol edilmeyen parametrelerine yönelik optimizasyon çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir.
- Yine bölütleme işlemleri için kullanılan yöntem sayısının artırılarak uyarlamalı yaklaşımın iyileştirilmesi hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] R. E. H. Hummel, *Understanding Materials Science Second Edition*. 2004.
- [2] J. A. Mathews, "The Steel Age—1876 to 1926," *Ind. Eng. Chem.*, vol. 18, no. 9, pp. 913–914, 1926.
- [3] I. F. P. Energies, M. Paristech, M. Math, P. Ligm, and E. P. France, "Image Processing for Materials Characterization: Issues , Challenges and Opportunities," pp. 4862–4866, 2014.
- [4] N. Pallua and C. V. Suschek, *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*, 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- [5] H. Wobma and G. Vunjak-Novakovic, "Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 101–113, 2016.
- [6] D. Howard, L. D. Buttery, K. M. Shakesheff, and S. J. Roberts, "Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds," *J. Anat.*, vol. 213, no. 1, pp. 66–72, 2008.
- [7] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [8] M. G. Mitchell, *Applications of 3D Printing in Cell Biology*. 2016.
- [9] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, and D. H. Kim, "3D bioprinting for engineering complex tissues," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 4, pp. 422–434, 2016.
- [10] Y. Li and T. Bou-Akl, "Electrospinning in Tissue Engineering," in *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*, 1st ed., S. Haider and A. Haider, Eds. InTech, 2016, pp. 117–139.
- [11] S. Khorshidi *et al.*, "A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 10, no. 9, pp. 715–738, Sep. 2016.
- [12] N. H. A. Ngadiman, M. Y. Noordin, A. Idris, and D. Kurniawan, "A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions," *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.*, vol. 231, no. 7, pp. 597–616, 2017.

- [13] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, "Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1197–1211, 2006.
- [14] R. S. Barhate and S. Ramakrishna, "Nanofibrous filtering media: Filtration problems and solutions from tiny materials," *J. Memb. Sci.*, vol. 296, no. 1–2, pp. 1–8, 2007.
- [15] Q. Zhang, J. Welch, H. Park, C. Y. Wu, W. Sigmund, and J. C. M. Marijnissen, "Improvement in nanofiber filtration by multiple thin layers of nanofiber mats," *J. Aerosol Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 230–236, 2010.
- [16] D. Li, M. W. Frey, and A. J. Baeumner, "Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies," *J. Memb. Sci.*, vol. 279, no. 1–2, pp. 354–363, 2006.
- [17] Y. J. Shin, M. Wang, and J. Kameoka, "Electrospun Nanofiber Biosensor for Measuring Glucose Concentration," *J. Photopolym. Sci. Technol.*, vol. 22, no. 2, pp. 235–237, 2009.
- [18] M. M. Demir *et al.*, "Palladium Nanoparticles by Electrospinning from Poly(acrylonitrile-co-acrylic acid)-PdCl₂ Solutions. Relations between Preparation Conditions, Particle Size, and Catalytic Activity," *Macromolecules*, vol. 37, no. 5, pp. 1787–1792, 2004.
- [19] R. Ramírez-Agudelo *et al.*, "Hybrid nanofibers based on polycaprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 83, no. June 2017, pp. 25–34, 2018.
- [20] M. Park *et al.*, "Environment friendly, transparent nanofiber textiles consolidated with high efficiency PLEDs for wearable electronics," *Org. Electron. physics, Mater. Appl.*, vol. 36, pp. 89–96, 2016.
- [21] S. Wu, P. Liu, Y. Zhang, H. Zhang, and X. Qin, "Flexible and conductive nanofiber-structured single yarn sensor for smart wearable devices," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 252, pp. 697–705, 2017.
- [22] T. Uyar, D. Çökeliler, M. Doğan, I. C. Koçum, O. Karatay, and E. B. Denkbaş, "Electrospun nanofiber reinforcement of dental composites with

- electromagnetic alignment approach,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 762–770, 2016.
- [23] N. P. Rijal, U. Adhikari, S. Khanal, D. Pai, J. Sankar, and N. Bhattarai, “Magnesium oxide-poly(ϵ -caprolactone)-chitosan-based composite nanofiber for tissue engineering applications,” *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.*, vol. 228, no. November 2017, pp. 18–27, 2018.
- [24] M. M. Maciel *et al.*, “Relation between fiber orientation and mechanical properties of nano-engineered poly(vinylidene fluoride) electrospun composite fiber mats,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 139, no. April 2017, pp. 146–154, 2018.
- [25] W. Jiang *et al.*, “Incorporation of aligned PCL-PEG nanofibers into porous chitosan scaffolds improved the orientation of collagen fibers in regenerated periodontium,” *Acta Biomater.*, vol. 25, pp. 240–252, 2015.
- [26] J. Zhong, H. Zhang, J. Yan, and X. Gong, “Effect of nanofiber orientation of electrospun nanofibrous scaffolds on cell growth and elastin expression of muscle cells,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 136, pp. 772–778, 2015.
- [27] A. Fahami and M. Fathi, “Development of cress seed mucilage/PVA nanofibers as a novel carrier for vitamin A delivery,” *Food Hydrocoll.*, 2018.
- [28] J. Zhang *et al.*, “Pore architecture and cell viability on freeze dried 3D recombinant human collagen-peptide (RHC)-chitosan scaffolds,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 174–182, 2015.
- [29] Y. Ko, J. Park, J. Lee, H. Oh, and W. Park, “Growth behavior of endothelial cells according to electrospun poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) fiber diameter as a tissue engineering scaffold,” *Tissue Eng.*, pp. 343–351, 2016.
- [30] S. Fontenete *et al.*, “FISHji: New ImageJ macros for the quantification of fluorescence in epifluorescence images,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 112, pp. 61–69, 2016.
- [31] M. B. Smith, A. Chaigne, and E. K. Paluch, *An active contour ImageJ plugin to monitor daughter cell size in 3D during cytokinesis*, vol. 137. Elsevier Ltd, 2017.
- [32] J. L. Martiel *et al.*, “Measurement of cell traction forces with ImageJ,” *Methods*

Cell Biol., vol. 125, pp. 269–287, 2015.

- [33] G. Narayanan, M. Y. Tekbudak, Y. Caydamli, J. Dong, and W. E. Krause, “Accuracy of electrospun fiber diameters: The importance of sampling and person-to-person variation,” *Polym. Test.*, vol. 61, pp. 240–248, 2017.
- [34] S. Sundararaman *et al.*, “User vs . software-dependent variability of ELISPOT counts obtained from ten different laboratories,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 1, no. Suppl 1, p. 10, 2013.
- [35] E. Berry, *A pratical approach to medical image processing*, 1st ed. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, 2008.
- [36] F. Waidelich, H. Eichfeld, and R. Graumann, “Segmentation of Medical Images Using Fuzzy Technique,” 1st ed., vol. 41, P. S. Szczepaniak, P. J. G. Lisboa, and J. Kacprzyk, Eds. Heidelberg: Physica-Verlag HD, 2000, pp. 394–409.
- [37] P. M. Kulkarni *et al.*, “Quantitative 3-D analysis of GFAP labeled astrocytes from fluorescence confocal images,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 246, pp. 38–51, 2015.
- [38] G. Lin, U. Adiga, K. Olson, J. F. Guzowski, C. A. Barnes, and B. Roysam, “A hybrid 3D watershed algorithm incorporating gradient cues and object models for automatic segmentation of nuclei in confocal image stacks,” *Cytometry*, vol. 56A, no. 1, pp. 23–36, 2003.
- [39] S. Nazlibilek, D. Karacor, T. Ercan, M. H. Sazli, O. Kalender, and Y. Ege, “Automatic segmentation, counting, size determination and classification of white blood cells,” *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 55, pp. 58–65, 2014.
- [40] F. Piccinini, A. Tesei, G. Paganelli, W. Zoli, and A. Bevilacqua, “Improving reliability of live/dead cell counting through automated image mosaicing,” *Comput. Methods Programs Biomed.*, vol. 117, no. 3, pp. 448–463, 2014.
- [41] M. Kanafchian, M. Valizadeh, and A. K. Haghi, “Prediction of nanofiber diameter for improvements in incorporation of multilayer electrospun nanofibers,” *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 3, pp. 751–755, 2011.
- [42] B. Moghaddam, “Application of Image Analysis in the Characterization of Electrospun Nanofibers,” *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, vol. 33, no. 2, pp. 37–

45, 2014.

- [43] F. H. She, K. L. Tung, and L. X. Kong, "Calculation of effective pore diameters in porous filtration membranes with image analysis," *Robot. Comput. Integr. Manuf.*, vol. 24, no. 3, pp. 427–434, 2008.
- [44] M. Ziabari, V. Mottaghitalab, and A. K. Haghi, "Distance transform algorithm for measuring nanofiber diameter," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 4, pp. 905–918, 2008.
- [45] M. Ziabari, V. Mottaghitalab, and A. K. Haghi, "Evaluation of electrospun nanofiber pore structure parameters," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 4, pp. 923–932, 2008.
- [46] B. Pourdeyhimi and H. S. Kim, "Measuring Fiber Orientation in Nonwovens: The Hough Transform," *Text. Res. J.*, vol. 72, no. 9, pp. 803–809, 2002.
- [47] E. Öznergiz, Y. E. Kiyak, M. E. Kamasak, and I. Yildirim, "Automated nanofiber diameter measurement in SEM images using a robust image analysis method," *J. Nanomater.*, vol. 2014, 2014.
- [48] M. Sadrjahani, S. Hoseini, V. Mottaghitalab, and A. K. Haghi, "Development and characterization of highly oriented PAN nanofiber," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 27, no. 04, pp. 583–589, 2010.
- [49] P. Facco, A. Masiero, and A. Beghi, "Advances on multivariate image analysis for product quality monitoring," *J. Process Control*, vol. 23, no. 1, pp. 89–98, 2013.
- [50] N. Dehghan and M. A. Tavanaie, "Nano Fiber Images Thresholding based on Imperial Competitive Algorithm," vol. 99, no. 6, pp. 37–47, 2014.
- [51] R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue Engineering," *Science (80-.)*, vol. 260, no. May, pp. 920–926, 1993.
- [52] "Hücre nedir?," *Genetik Dünyası*, 2016. [Online]. Available: <http://www.genetikdunyasi.com/hucre-nedir/>.
- [53] J. B. Richardson, B. Caterson, E. H. Evans, B. A. Ashton, and S. Roberts, "Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 81, no. 6, pp. 1064–8, 1999.
- [54] L. A. Brittberg M, "Treatment of Deep Cartilage Defects in The Knee

- Autologous Chondrocytes Transplantation,” *NEngl J Med*, vol. 331, no. 14, pp. 889–895, 1994.
- [55] C. A. Hernon *et al.*, “Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient,” *Regen. Med.*, vol. 1, no. 6, pp. 809–821, 2006.
 - [56] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, “Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty,” *Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1241–1246, 2006.
 - [57] T. J. Keane and S. F. Badylak, “Biomaterials for tissue engineering applications,” *Semin. Pediatr. Surg.*, vol. 23, no. 3, pp. 112–118, 2014.
 - [58] E. Eisenbarth, “Biomaterials for tissue engineering,” *Adv. Eng. Mater.*, vol. 9, no. 12, pp. 1051–1060, 2007.
 - [59] E. S. Place, N. D. Evans, and M. M. Stevens, “Complexity in biomaterials for tissue engineering,” *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 6, pp. 457–470, 2009.
 - [60] T. Dvir, B. P. Timko, D. S. Kohane, and R. Langer, “Nanotechnological strategies for engineering complex tissues,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 13–22, 2011.
 - [61] L. G. Griffith and G. Naughton, “Tissue engineering - Current challenges and expanding opportunities,” *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5557, 2002.
 - [62] A. A. Appel, M. A. Anastasio, J. C. Larson, and E. M. Brey, “Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 28, pp. 6615–6630, 2013.
 - [63] X. Cai, Y. S. Zhang, Y. Xia, and L. V. Wang, “Photoacoustic microscopy in tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 16, no. 3, pp. 67–77, 2013.
 - [64] A. Appel, M. A. Anastasio, and E. M. Brey, “Potential for Imaging Engineered Tissues with X-Ray Phase Contrast,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 17, no. 5, pp. 321–330, 2011.
 - [65] M. Mastrogiacomo, M. Ladisa, and R. Cancedda, “Toward the X-Ray Microdiffraction Imaging,” *Tissue Eng.*, vol. 15, no. 4, pp. 423–442, 2009.
 - [66] M. A. Pysz, S. S. Gambhir, and J. K. Willmann, “Molecular imaging: Current status and emerging strategies,” *Clin. Radiol.*, vol. 65, no. 7, pp. 500–516,

2010.

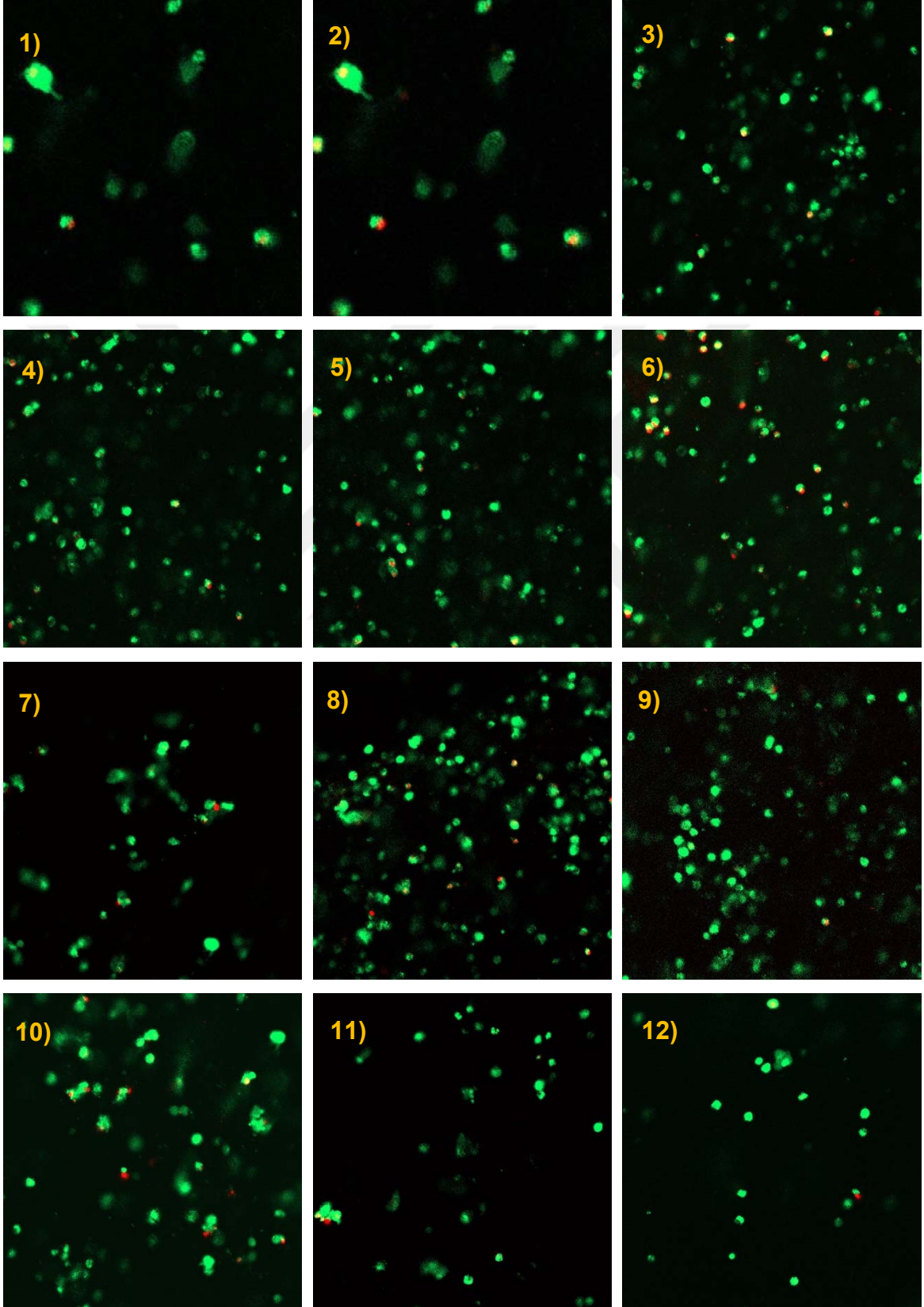
- [67] I. Georgakoudi, W. L. Rice, M. Hronik-Tupaj, and D. L. Kaplan, "Optical Spectroscopy and Imaging for the Noninvasive Evaluation of Engineered Tissues," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 321–340, 2008.
- [68] A. Rahmim and H. Zaidi, "PET versus: Strengths, Limitations and Challenges," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 29, no. 3, p. 193, 2008.
- [69] T. F. Massoud, T. F. Massoud, S. S. Gambhir, and S. S. Gambhir, "Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light," *Genes Dev.*, vol. 17, pp. 545–580, 2003.
- [70] S. Y. Nam, L. M. Ricles, L. J. Suggs, and S. Y. Emelianov, "Imaging Strategies for Tissue Engineering Applications," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 88–102, 2015.
- [71] Y. S. Zhang and J. Yao, "Imaging Biomaterial–Tissue Interactions," *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 4, pp. 403–414, 2018.
- [72] "Confocal Microscopes," *The University of Queensland, Institute for Molecular Bioscience*. [Online]. Available: <https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes>.
- [73] T. T. Demirtaş, G. Kaynak, and M. Gümüşderelioğlu, "Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 49, pp. 713–719, 2015.
- [74] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, and H. Berghmans, "Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 31–38, 2000.
- [75] G. Irmak, T. T. Demirtaş, and M. Gümüşderelioğlu, "Highly-methacrylated gelatin: Microwave-irradiation and bioprinting application for bone tissue engineering (Submitted)," *J. Tissue Eng Regen. Med.*, 2018.
- [76] F. Jin, P. Fieguth, L. Winger, and E. Jernigan, "Adaptive Wiener filtering of noisy images and image sequences," *Proc. 2003 Int. Conf. Image Process. (Cat. No.03CH37429)*, vol. 3, no. 1, pp. 349–352, 2003.

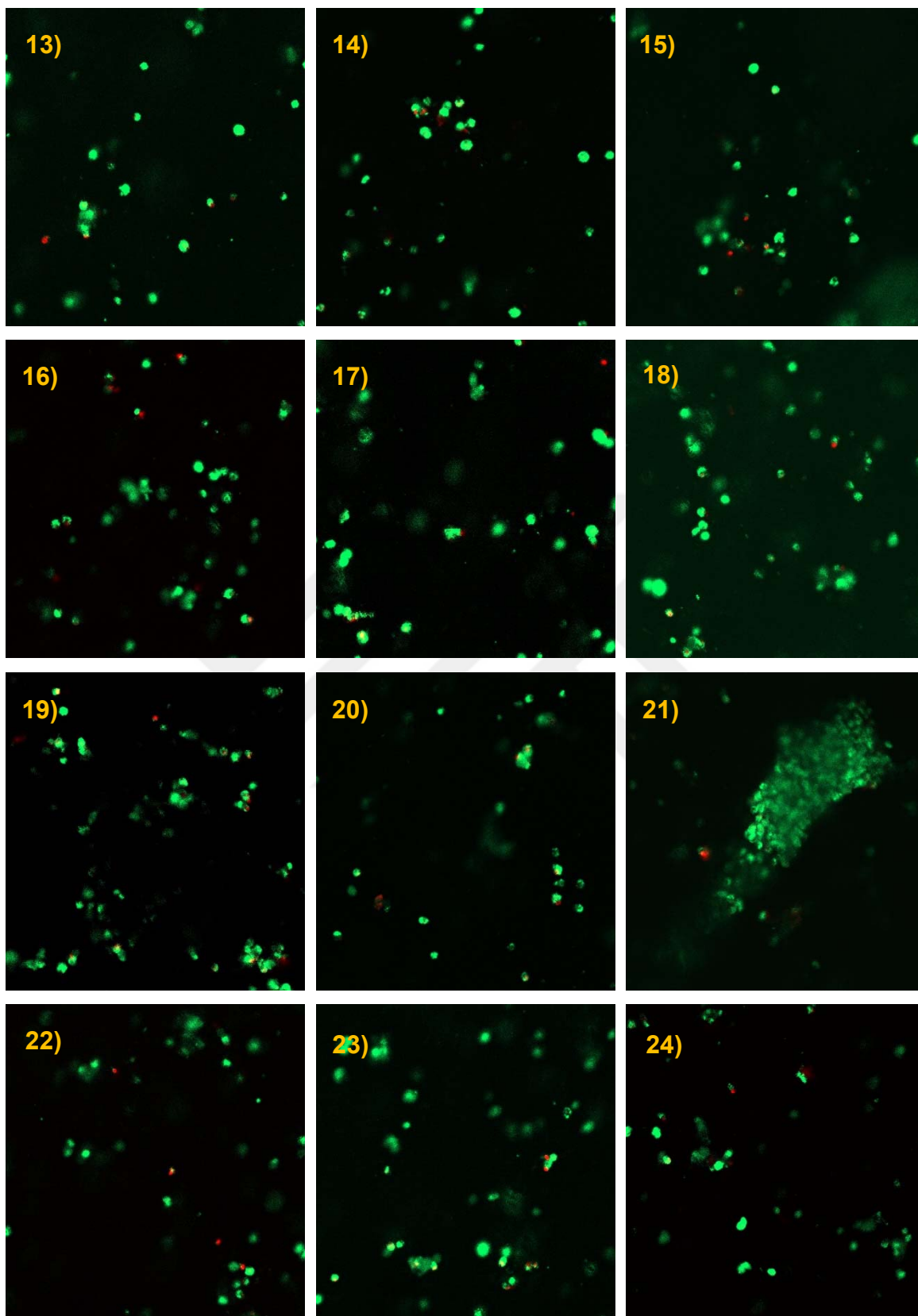
- [77] P. Shukla and A. Boyat, "Image Denoising using Local Adaptive Wiener Filter in Spatial and Temporal Domain," *Int. J. Adv. Res. Electron. Commun. Eng.*, vol. 4, no. 7, pp. 2019–2024, 2015.
- [78] J. Sen Lee, "Digital Image Enhancement and Noise Filtering by Use of Local Statistics," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. PAMI-2, no. 2, pp. 165–168, 1980.
- [79] J. S. Lim, *Two-Dimensional Signal and Image Processing*, 1st ed. Englewood Cliffs, New Jersey: Printice Hall, 1990.
- [80] J. S. Lee, "Refined filtering of image noise using local statistic," *Comput. Graph. image Process.*, vol. 24, pp. 255–269, 1983.
- [81] M. S. Nixon and A. S. Aguado, *Feature Extraction & Image Processing for Computer Vision*, 3rd ed. London: Elsevier Inc., 2012.
- [82] M. P. Wand and C. M. Jones, *Kernel Smoothing*, First Edit. New York: Chapman & Hall, 1995.
- [83] R. Gonzalez, R. Woods, and B. Masters, *Digital Image Processing, Third Edition*, Third Edit. Upper Saddle River, New Jersey, 2007.
- [84] R. Maini and H. Aggarwal, "Study and comparison of various image edge detection techniques," *Int. J. Image Process.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–11, 2009.
- [85] Z. Wang, A. C. Bovik, H. R. Sheikh and E. P. Simoncelli, "Wavelets for Image Image quality assessment: From error visibility to structural similarity," *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 13, no. 4, pp. 600–612, 2004.
- [86] H. Dilmen and M. F. Talu, "Yapısal Özellikleri Kullanan Parçacık Filtresi İle Uzun Süreli Nesne Takibi Haluk," *Gazi Üniversitesi Fen Bilim. Derg. Part C Tasarım ve Teknol.*, vol. 5, no. 1, pp. 107–118, 2017.
- [87] Y. Kaya and L. Kayci, "Kelebek Görüntülerin Sınıflandırılması için Bir İçerik Bazlı Görüntü Erişim Sistemi," pp. 435–440, 2014.
- [88] A. Łoza, L. Mihaylova, D. Bull, and N. Canagarajah, "Structural similarity-based object tracking in multimodality surveillance videos," *Mach. Vis. Appl.*, vol. 20, no. 2, pp. 71–83, 2009.
- [89] F. Gamino-Sánchez *et al.*, "Block-Matching Fuzzy C-Means clustering algorithm for segmentation of color images degraded with Gaussian noise,"

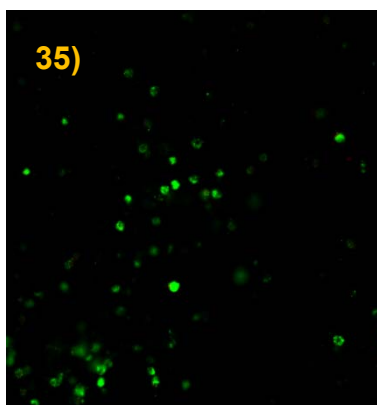
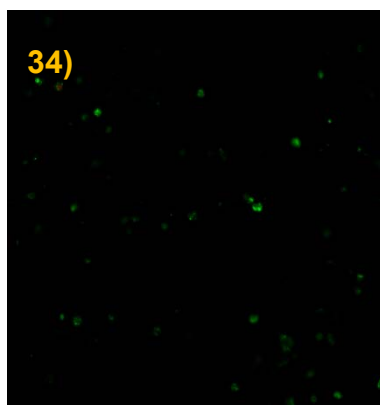
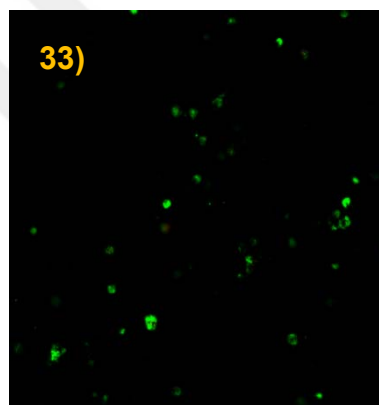
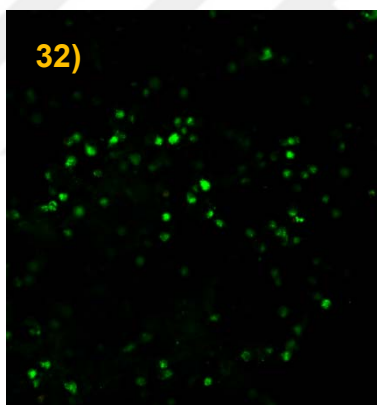
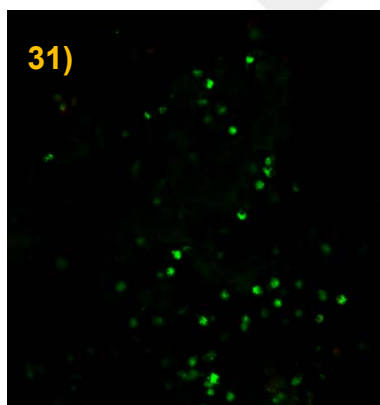
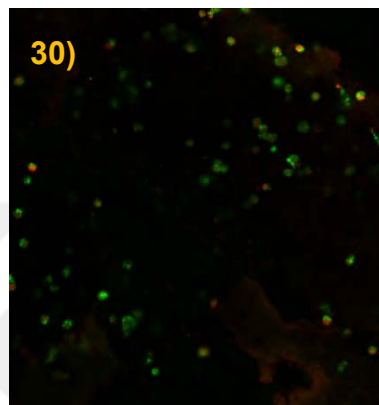
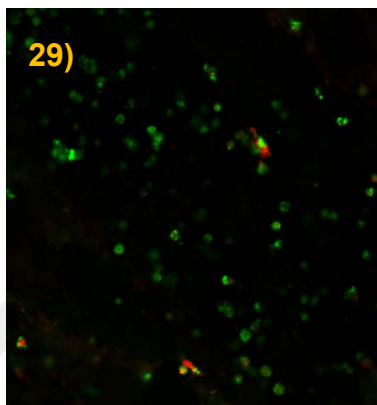
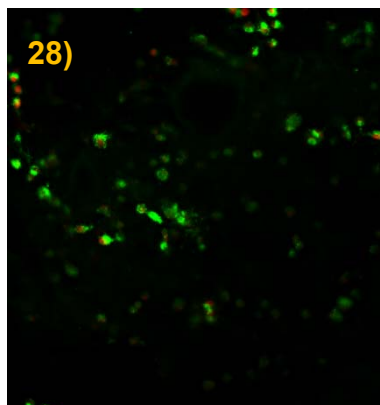
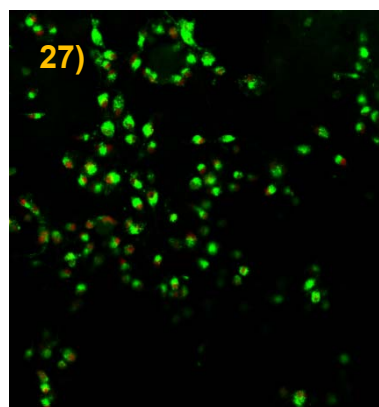
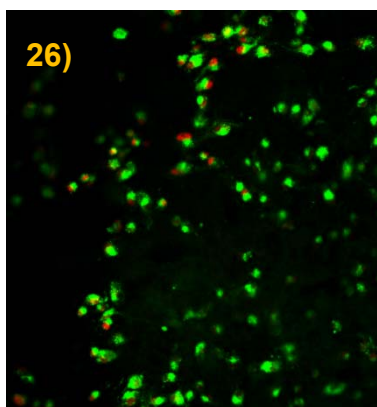
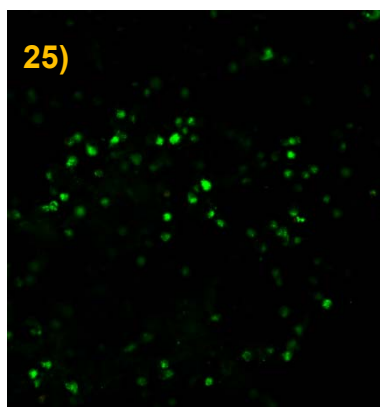
- Eng. Appl. Artif. Intell.*, vol. 73, no. April, pp. 31–49, 2018.
- [90] C. Singh and A. Bala, “A DCT-based local and non-local fuzzy C-means algorithm for segmentation of brain magnetic resonance images,” *Appl. Soft Comput. J.*, vol. 68, pp. 447–457, 2018.
 - [91] J. C. Bezdek, R. Ehrlich, and W. Full, “FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm,” *Comput. Geosci.*, vol. 10, no. 2–3, pp. 191–203, 1984.
 - [92] R. Saini, “Image Segmentation for Uneven Lighting Images based on Initial Window Size Selection,” vol. 156, no. 1, pp. 50–57, 2016.
 - [93] D. Bradley and G. Roth, “Adaptive Thresholding using the Integral Image,” *J. Graph. Tools*, vol. 12, no. 2, pp. 13–21, 2007.
 - [94] G. W. Zack, W. E. Rogers, and S. A. Latt, “Automatic Measurement of Sister Chromatid Exchange Frequency,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 25, no. 7, pp. 741–753, 1977.
 - [95] A. Russino, A. Ascrizzi, L. Popova, A. Tonazzini, S. Mancuso, and B. Mazzolai, “A novel tracking tool for the analysis of plant-root tip movements,” *Bioinspiration and Biomimetics*, vol. 8, no. 2, 2013.
 - [96] P. Yan and A. a Kassim, “Medical image segmentation using minimal path deformable models with implicit shape priors,” *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.*, vol. 10, no. 4, pp. 677–84, 2006.
 - [97] L. Lam, S. W. Lee, and C. Y. Suen, “Thinning methodologies - A comprehensive survey,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 14, no. 9. pp. 869–885, 1992.
 - [98] M. Bizrah *et al.*, “A semi-automated technique for labeling and counting of apoptosing retinal cells,” *BMC Bioinformatics*, vol. 15, no. 1, p. 169, 2014.
 - [99] A. C. Schutz, D. I. Braun, and K. R. Gegenfurtner, “Eye movements and perception: A selective review,” *J. Vis.*, vol. 11, no. 5, pp. 9–9, 2011.

EKLER

EK 1: MC3T3-E1 Hücrelerine Ait 35 Adet İmge Veri Seti
İmgeler aljinat ve aljinat-HAp doku iskelelerine aittir.

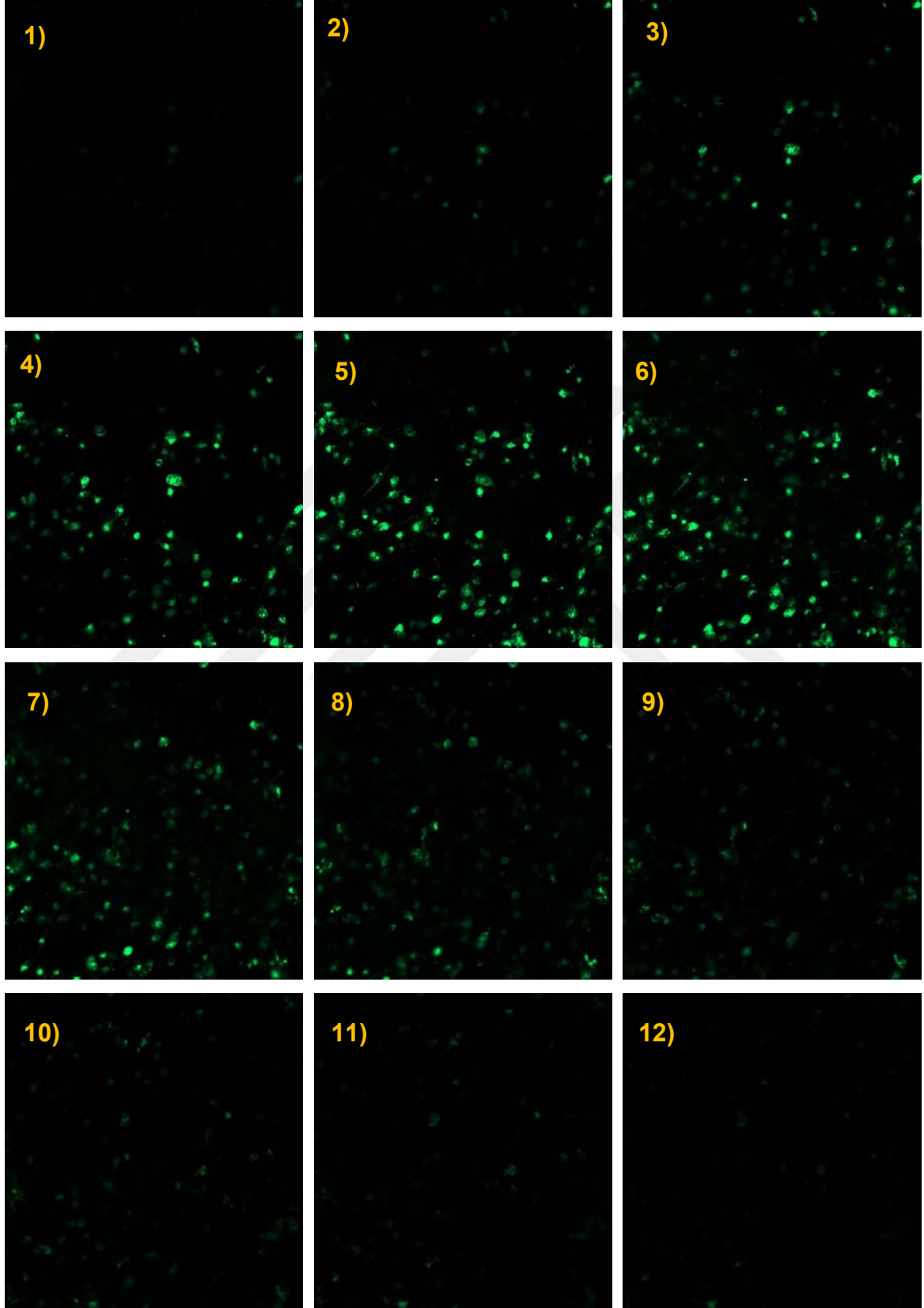




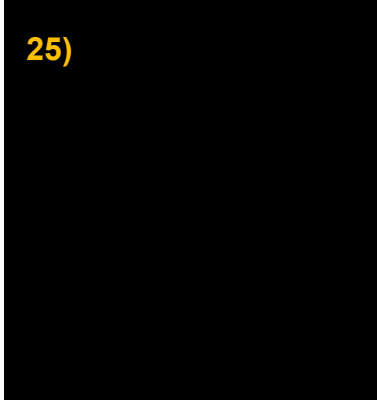


EK 2: Aljinat-HAp Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri

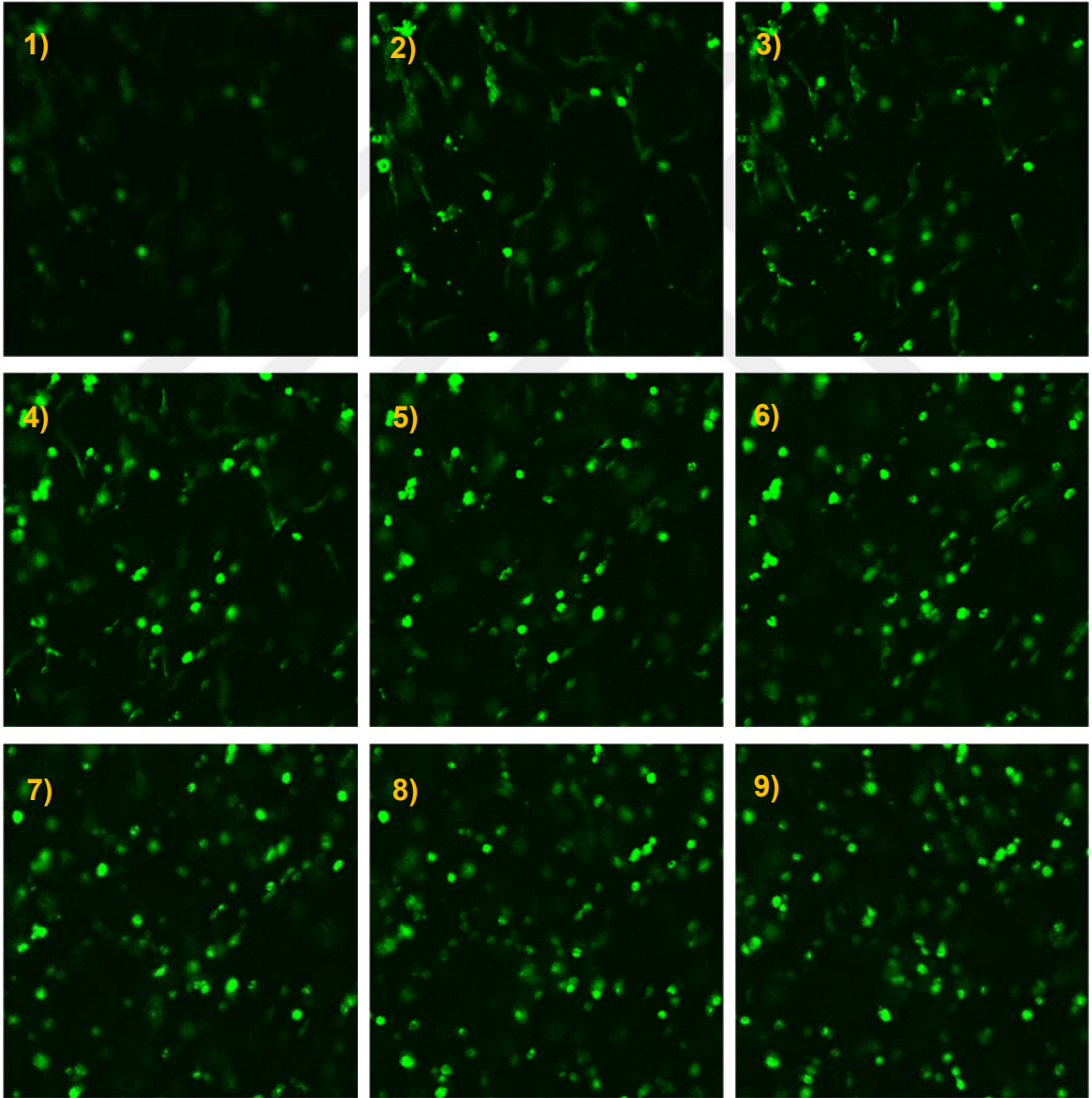
Kesit imgeleri arasındaki derinlik farkı 9 μm 'dir.

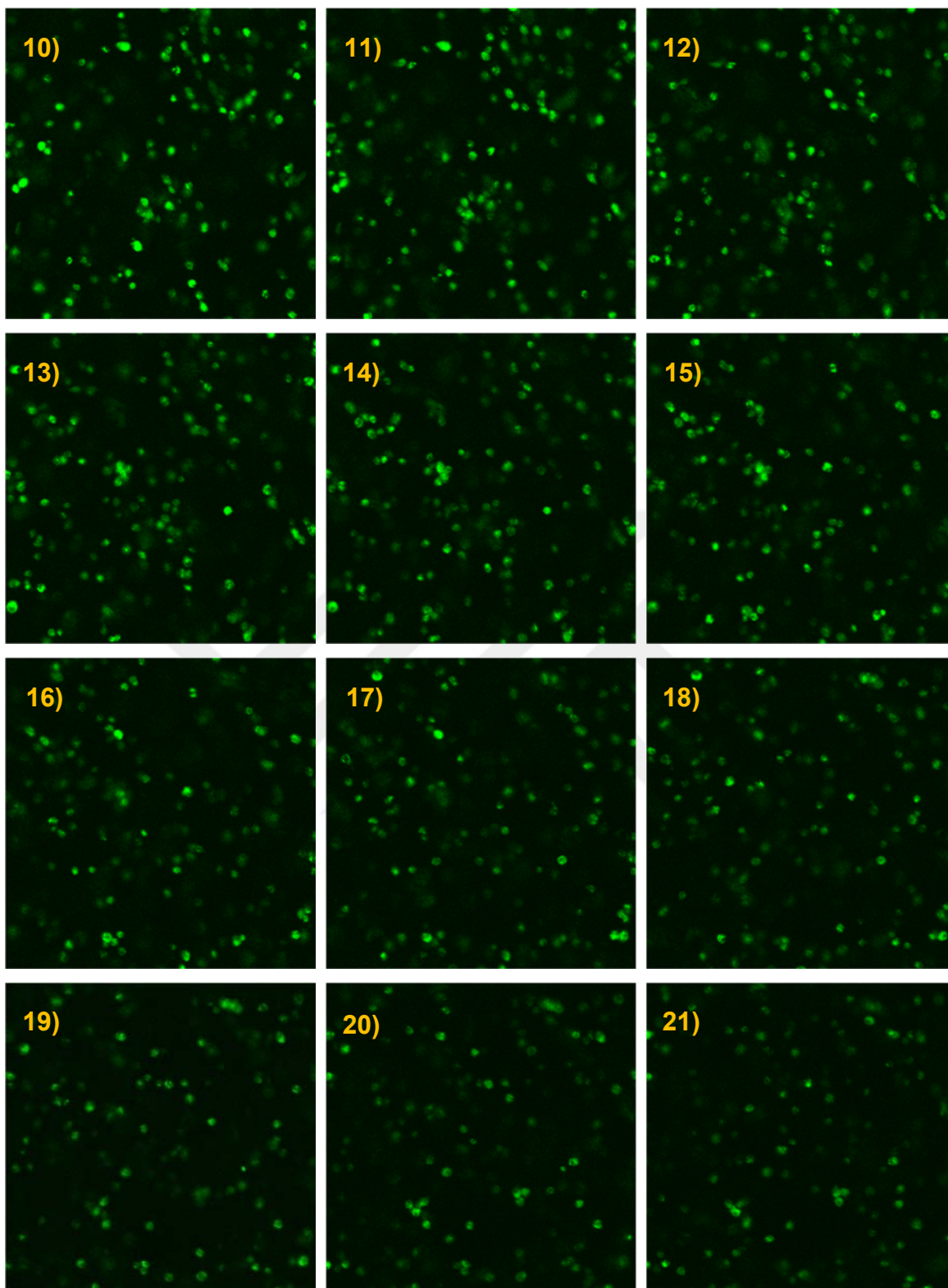


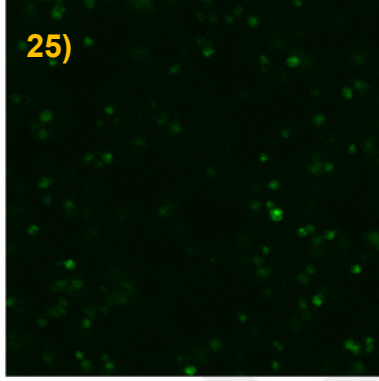
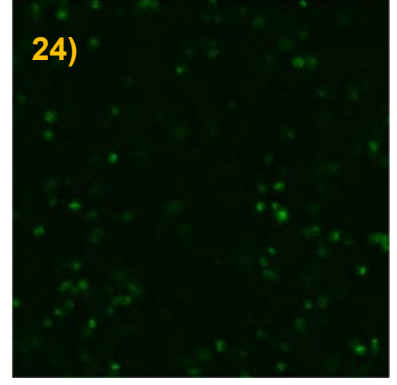
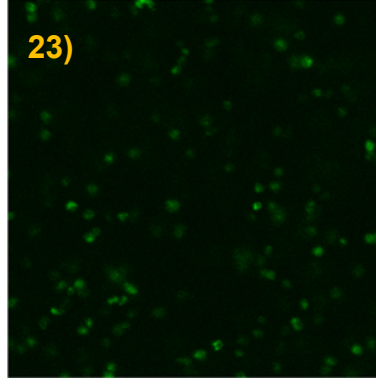
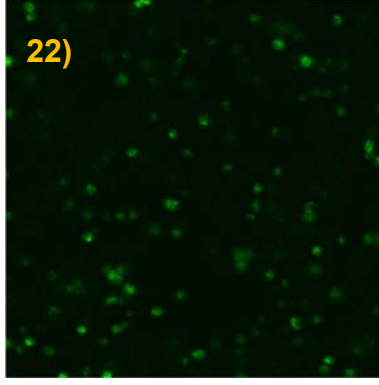
13)	14)	15)
16)	17)	18)
19)	20)	21)
22)	23)	24)



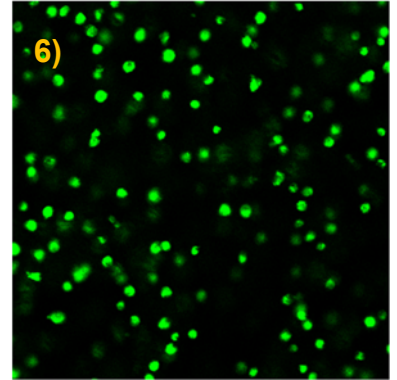
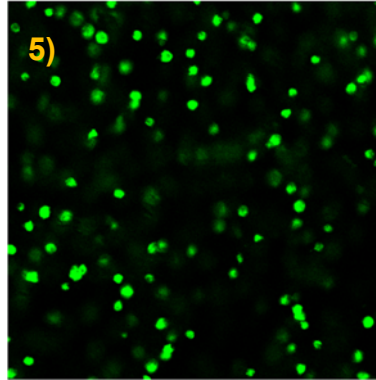
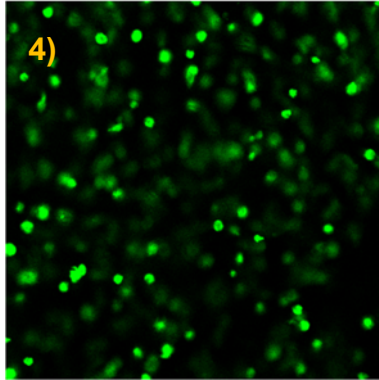
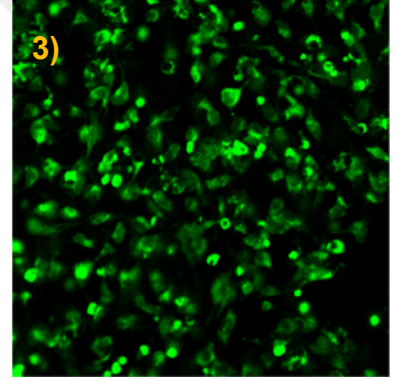
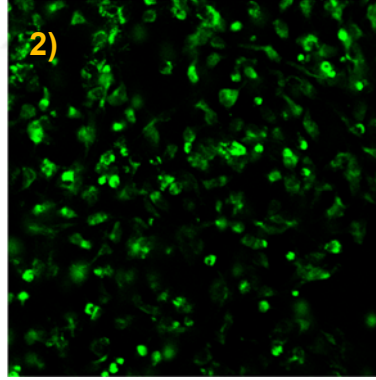
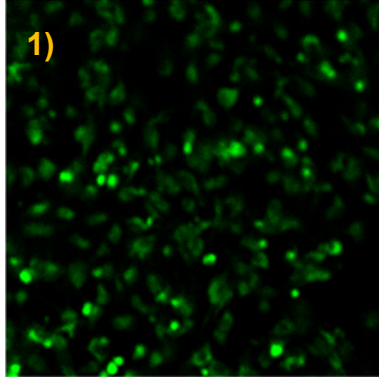
EK 3: Geleneksel Jel-MA Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri
Kesit imgeleri arasındaki derinlik farkı 9 μm 'dir.

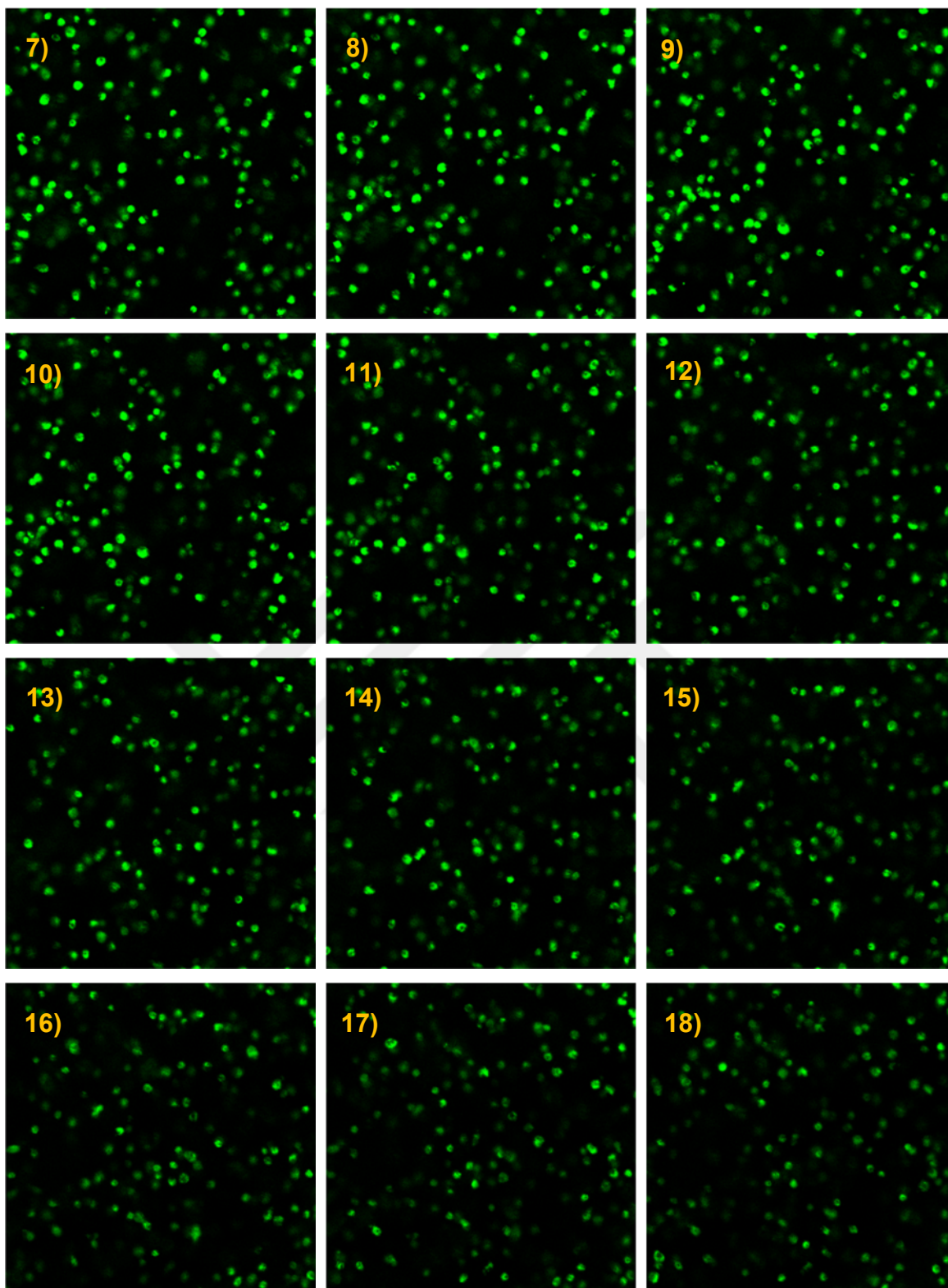


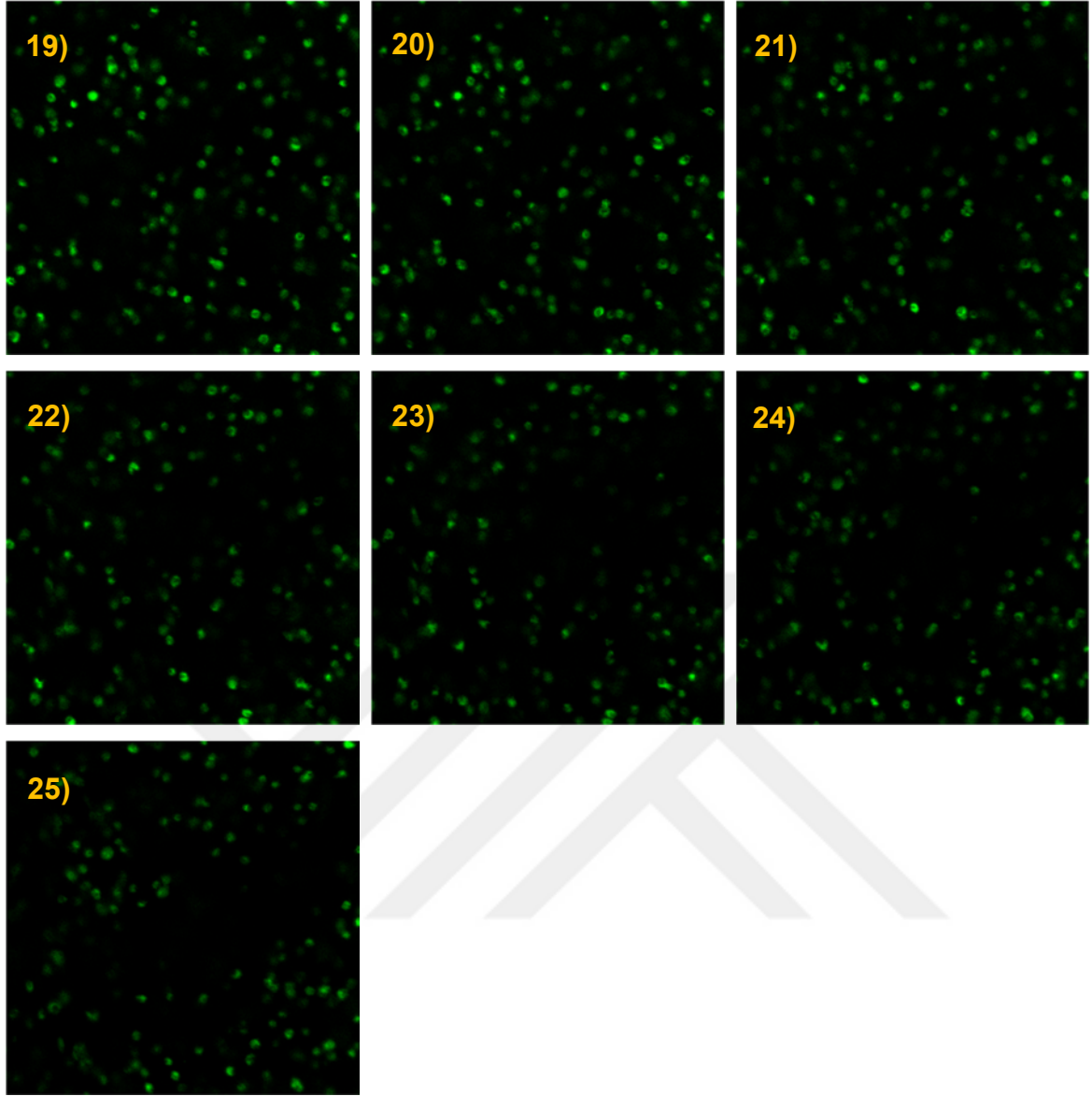




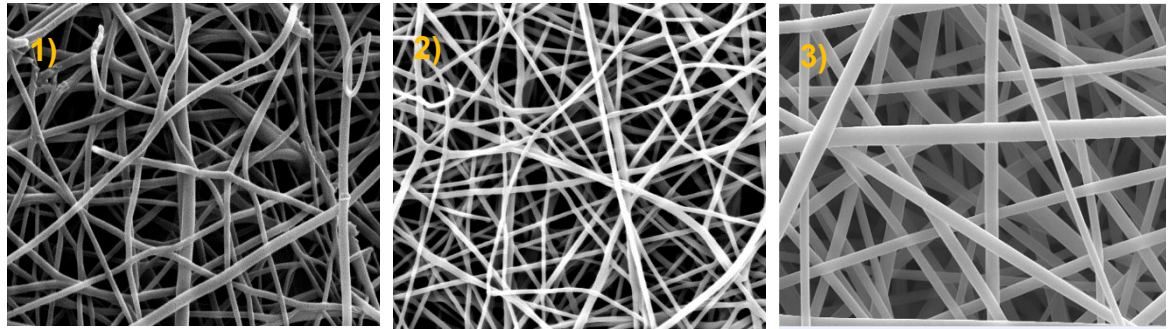
EK 4: Mikrodalga Destekli Jel-MA Doku İskelesine Ait Kesit İmgeleri
Kesit imgeleri arasındaki derinlik farkı 9 μm 'dir.

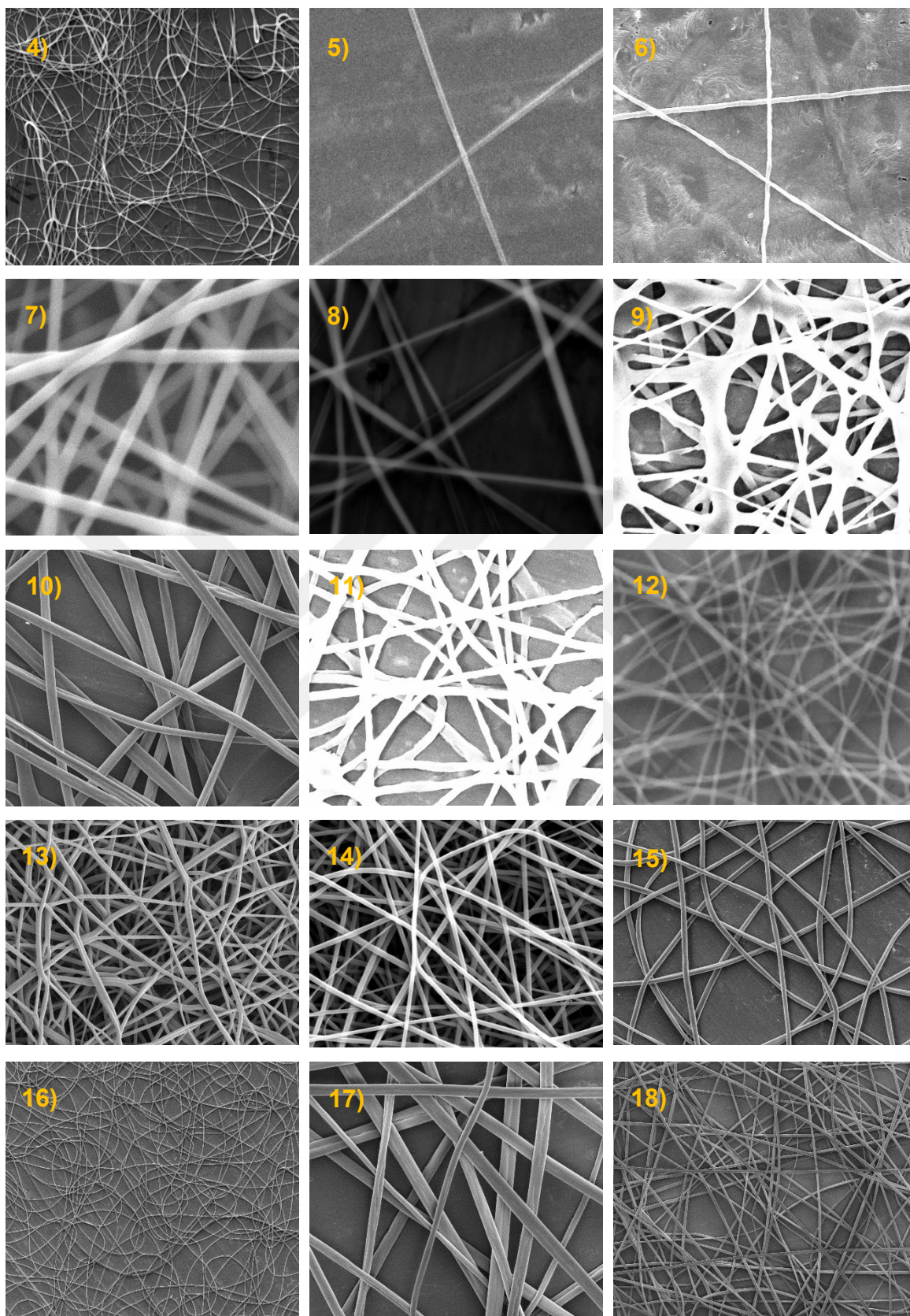


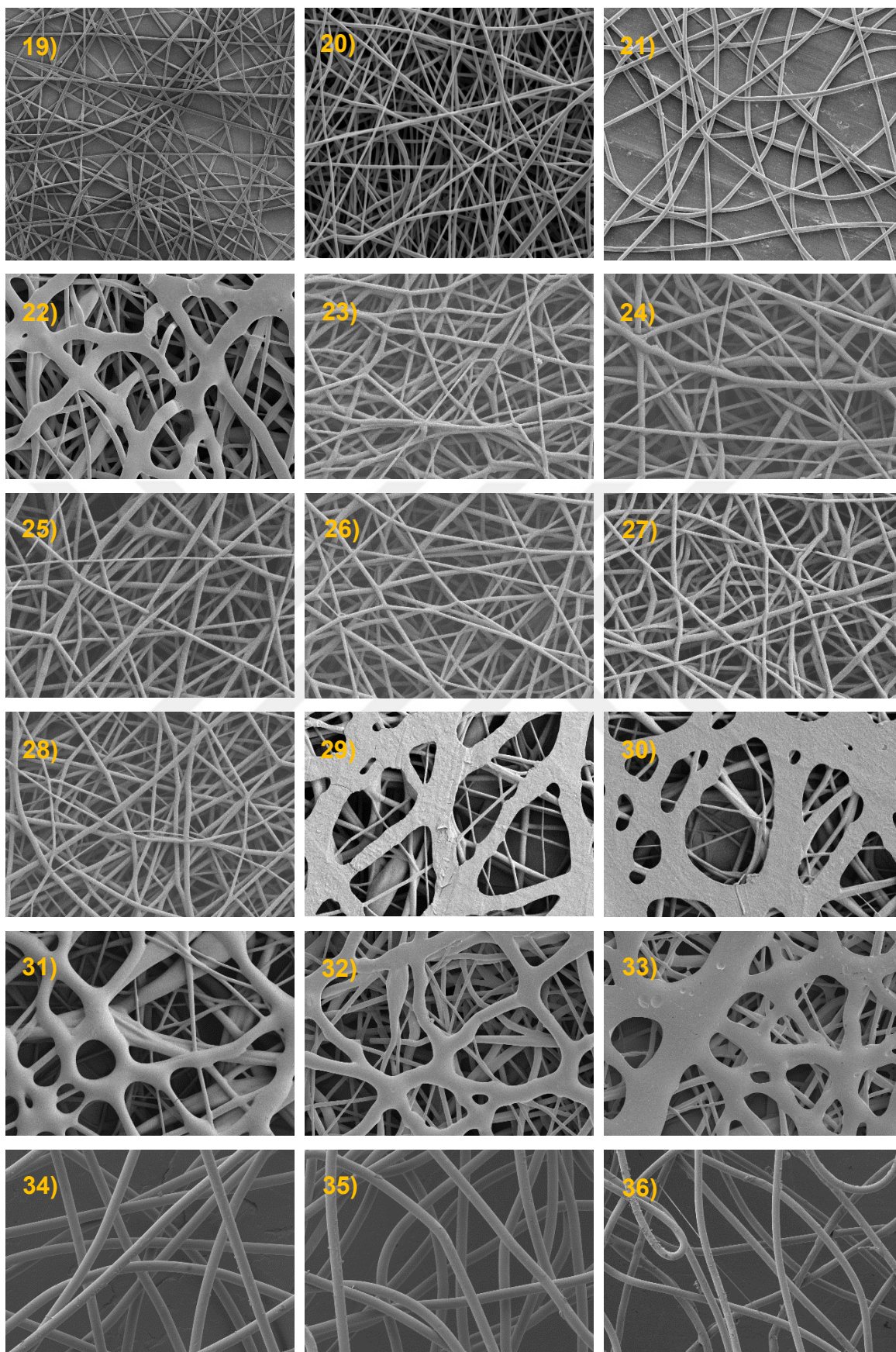


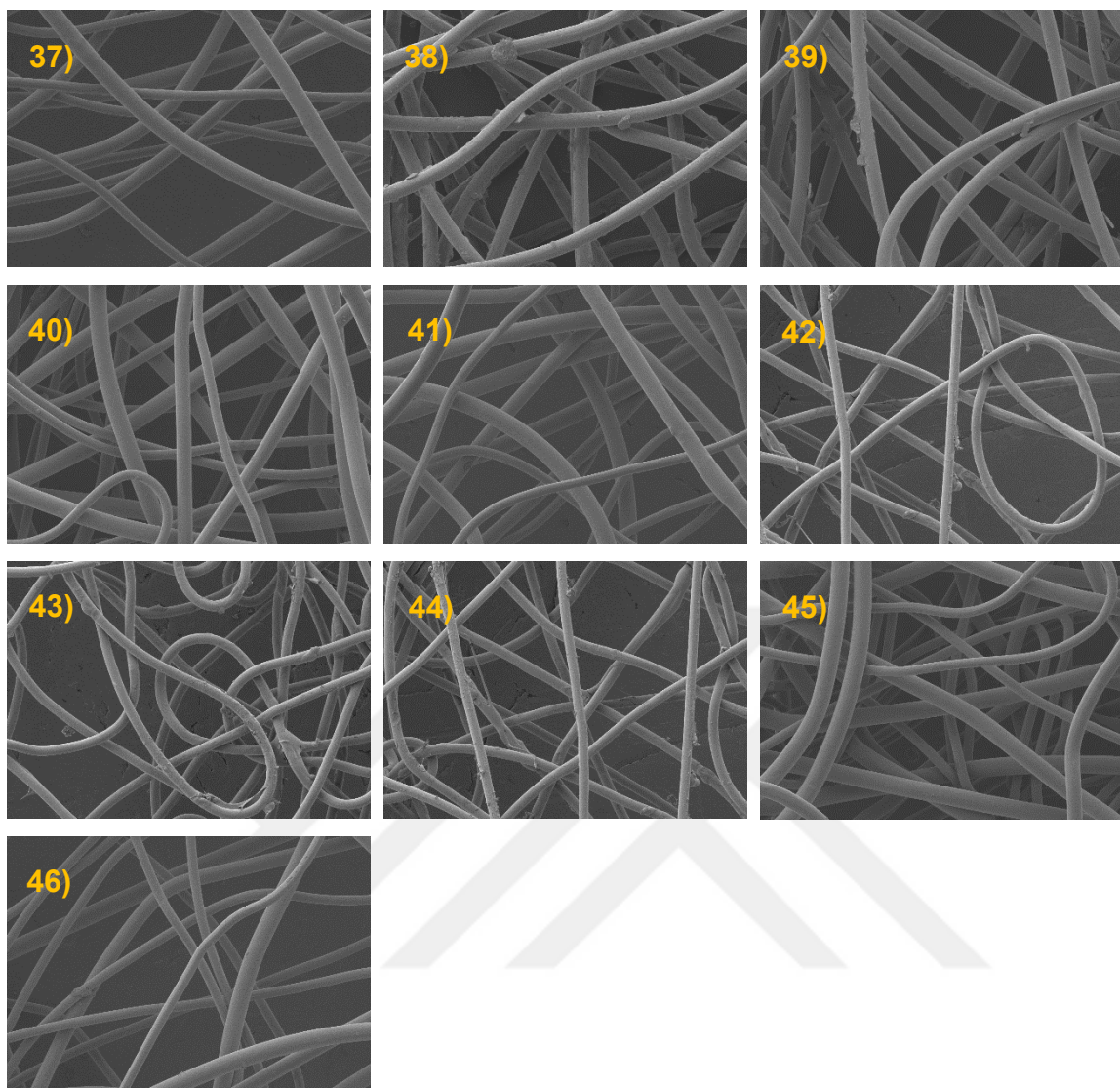


EK 5: Fiber Bazlı Doku İskelelerine Ait 46 Adet İmge Veri Seti



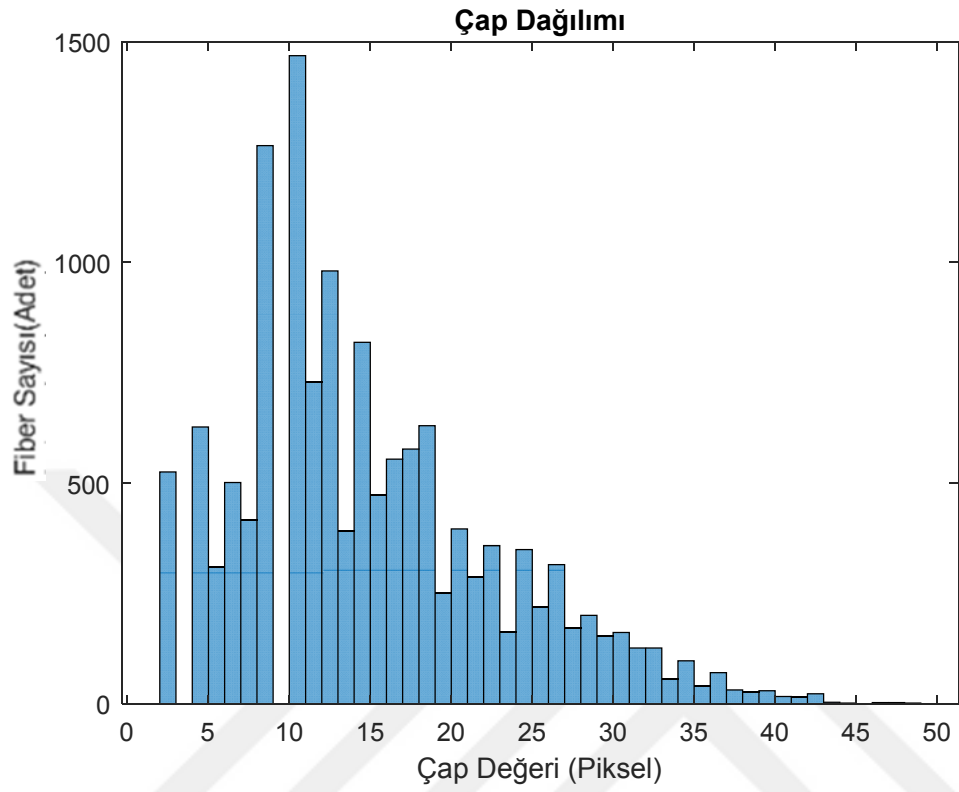




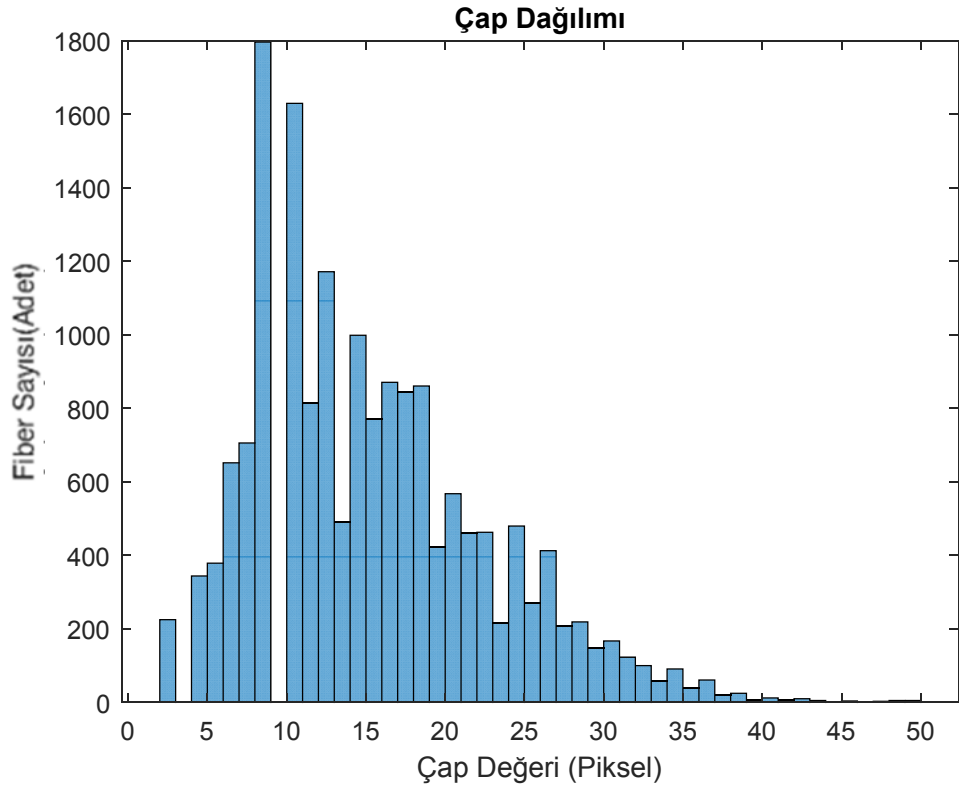


EK 6: 46 Adet Fiber İmge Veri Setine Ait Çap Dağılım Grafikleri

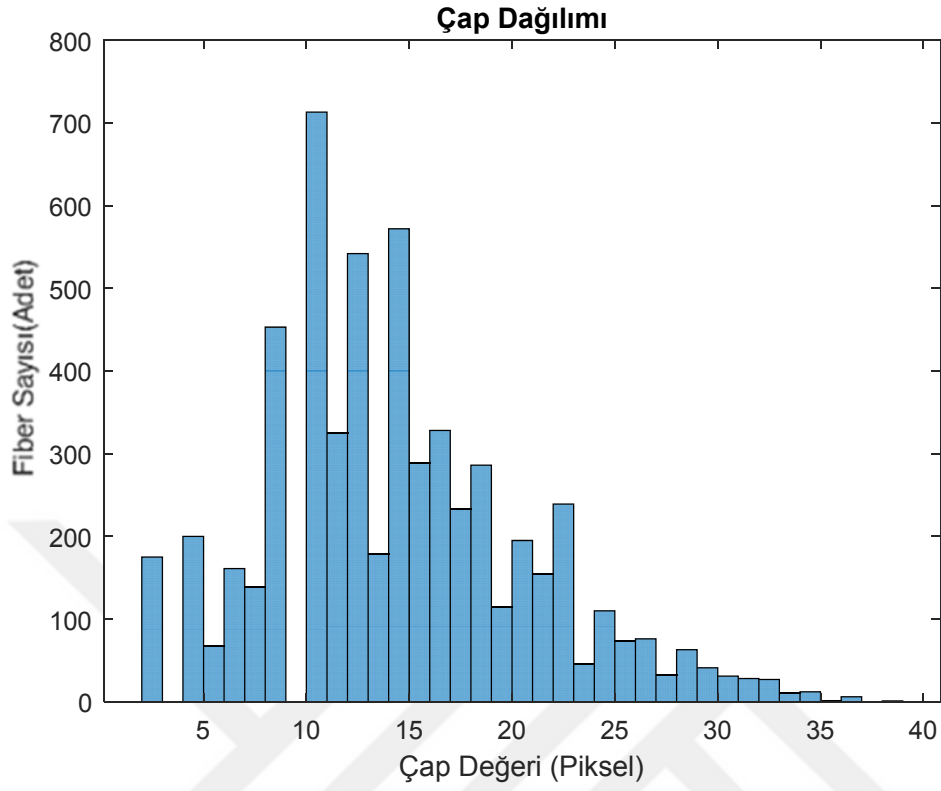
1)



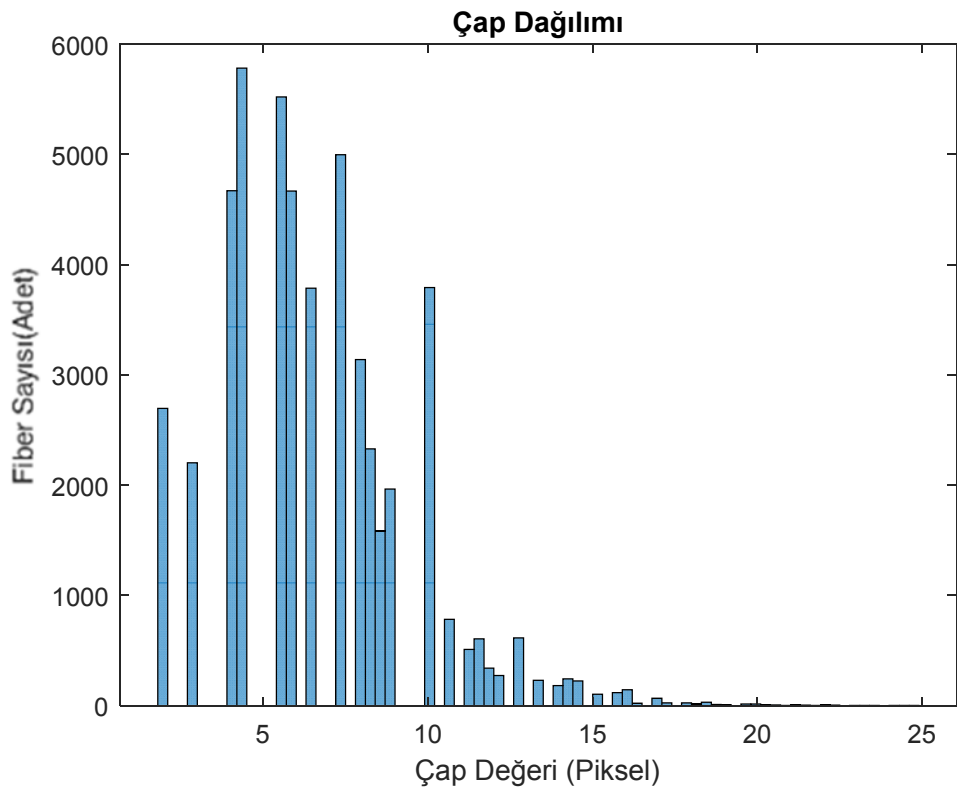
2)



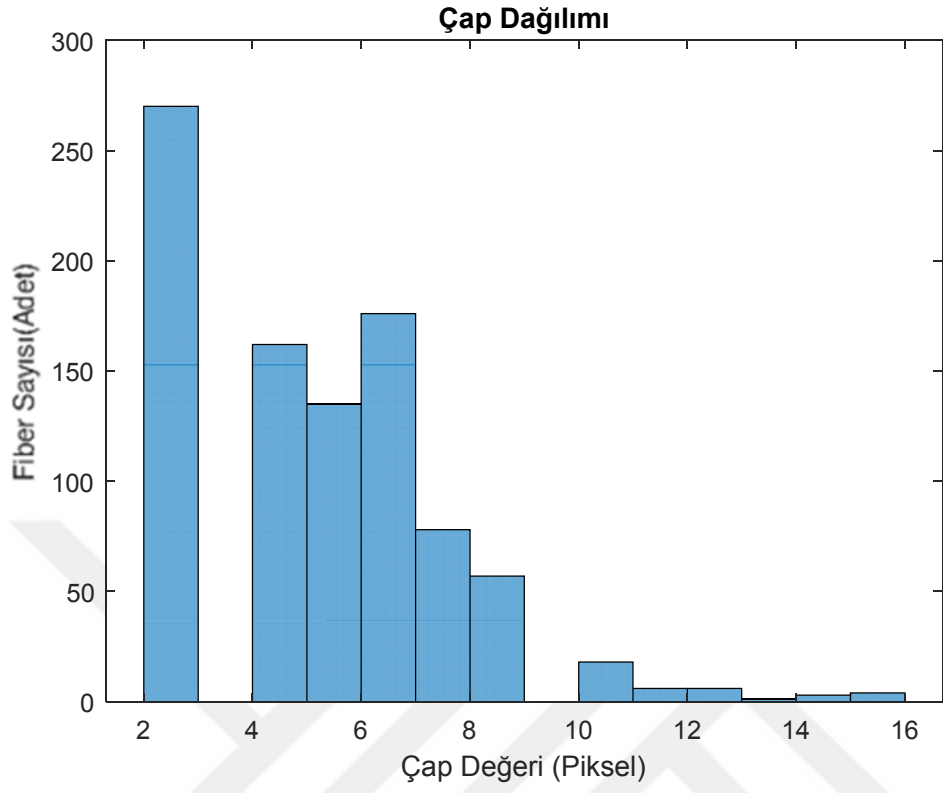
3)



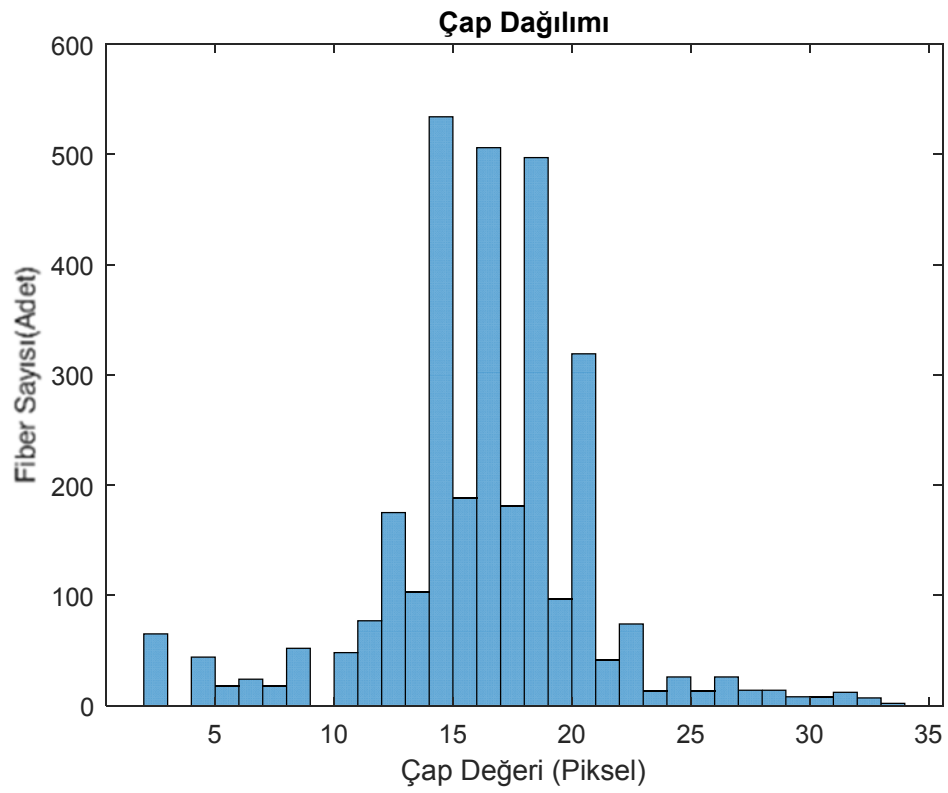
4)



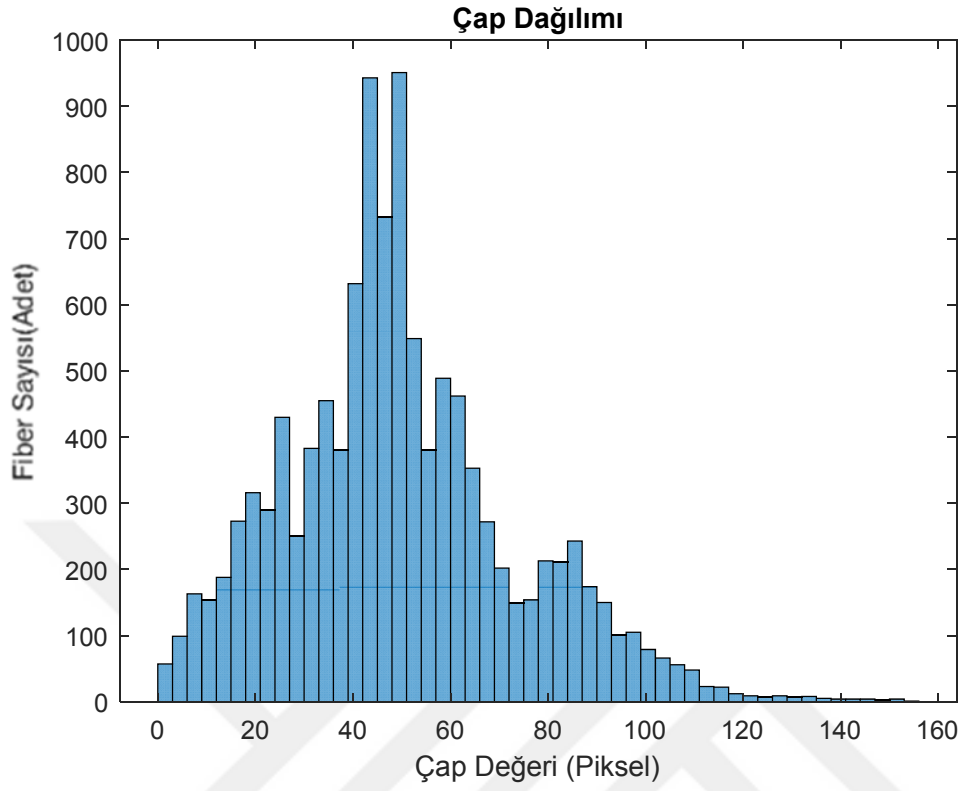
5)



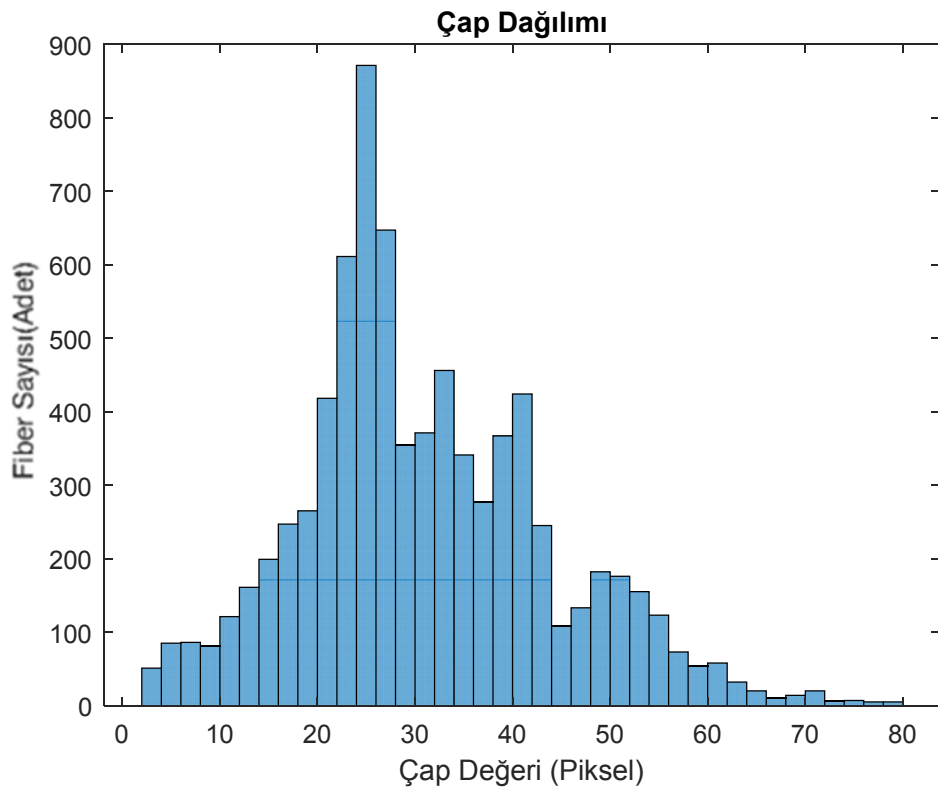
6)



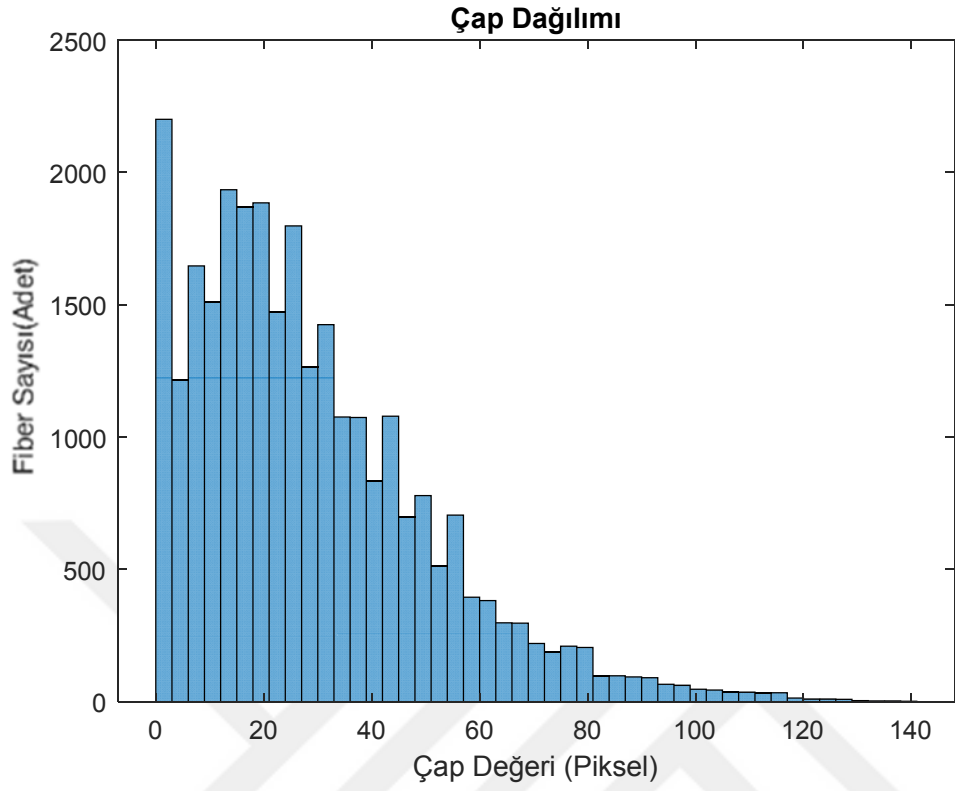
7)



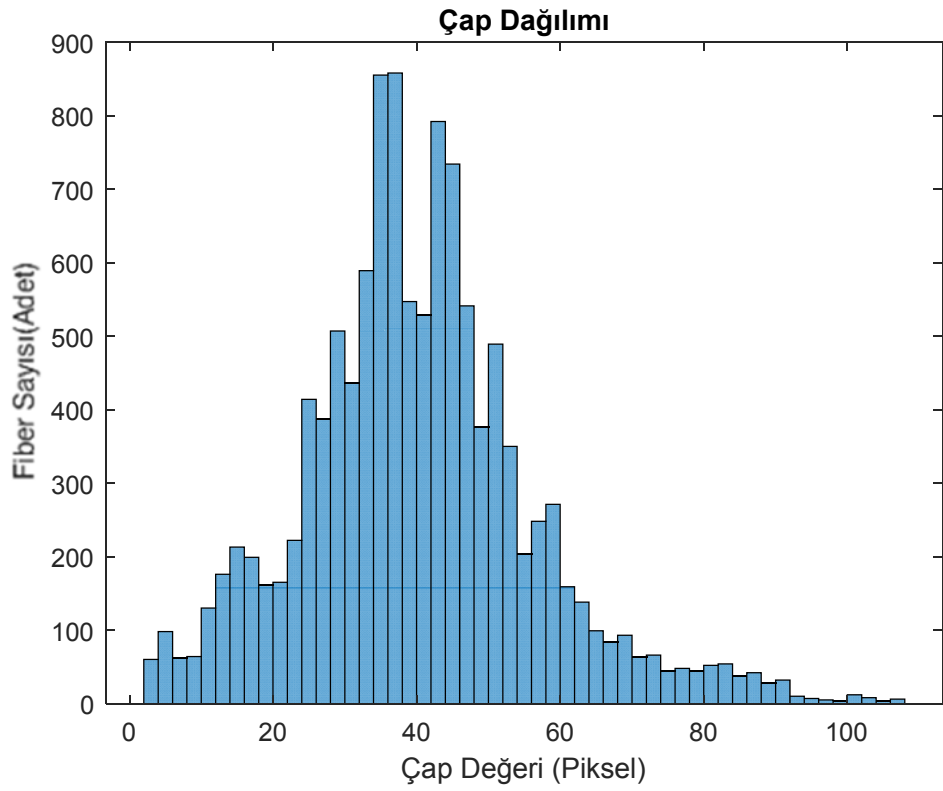
8)



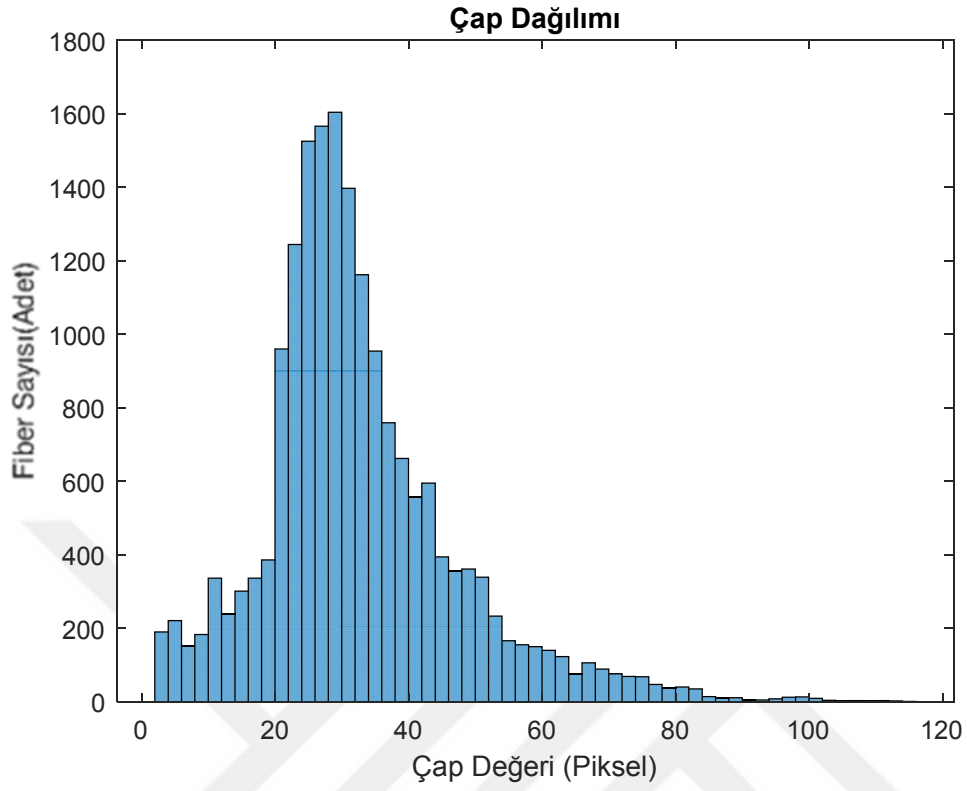
9)



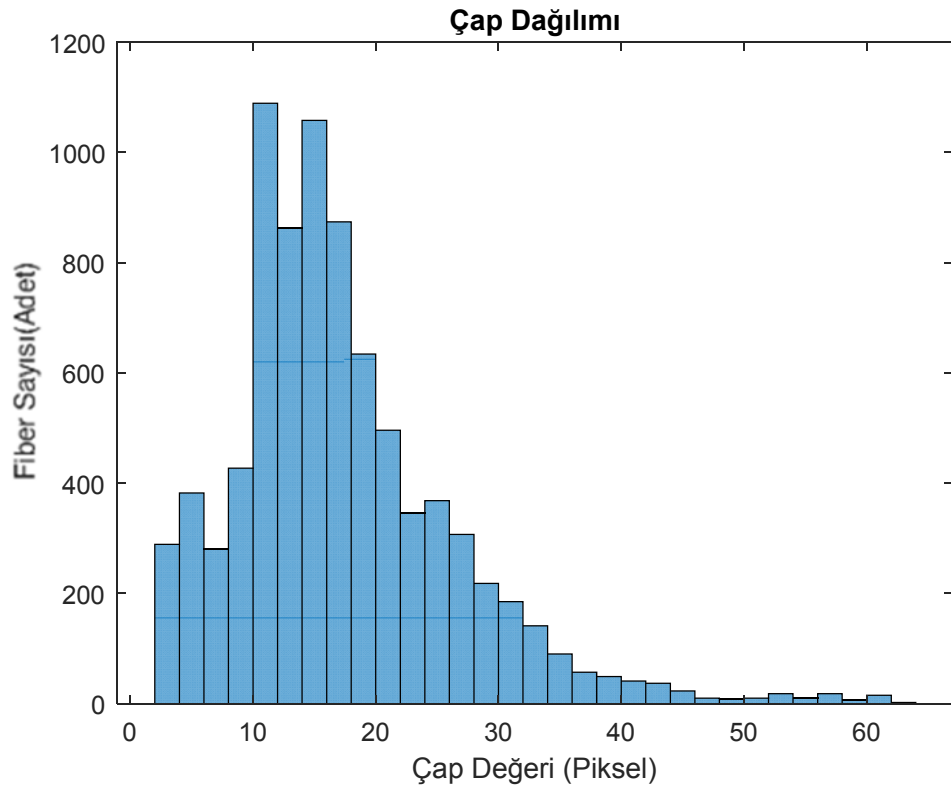
10)



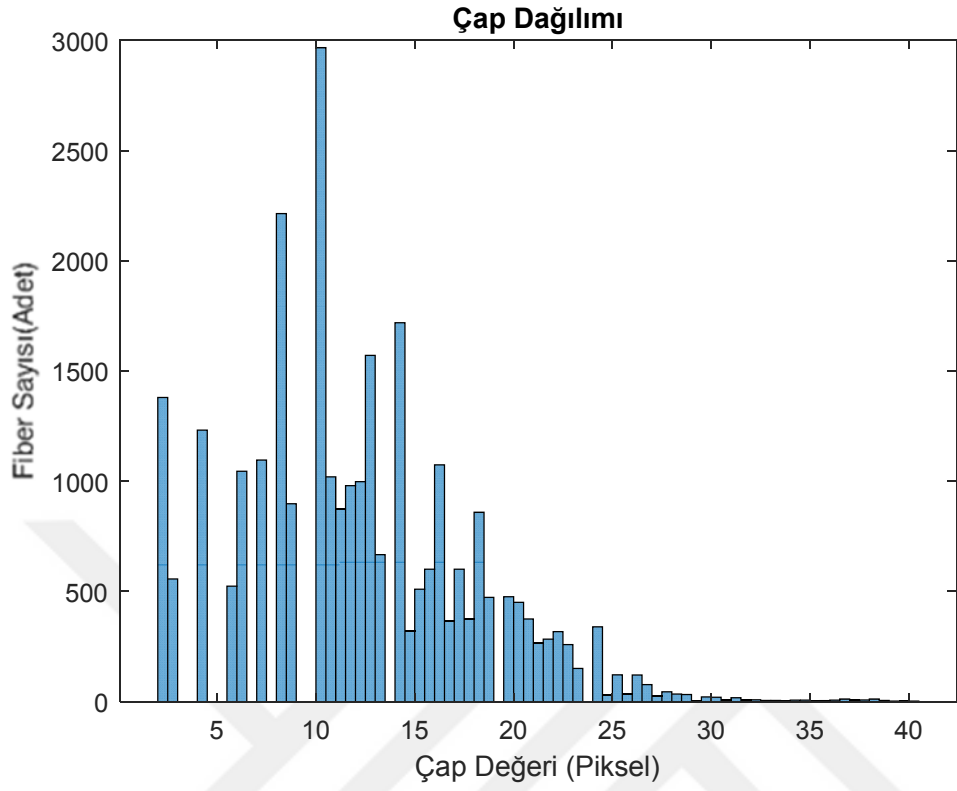
11)



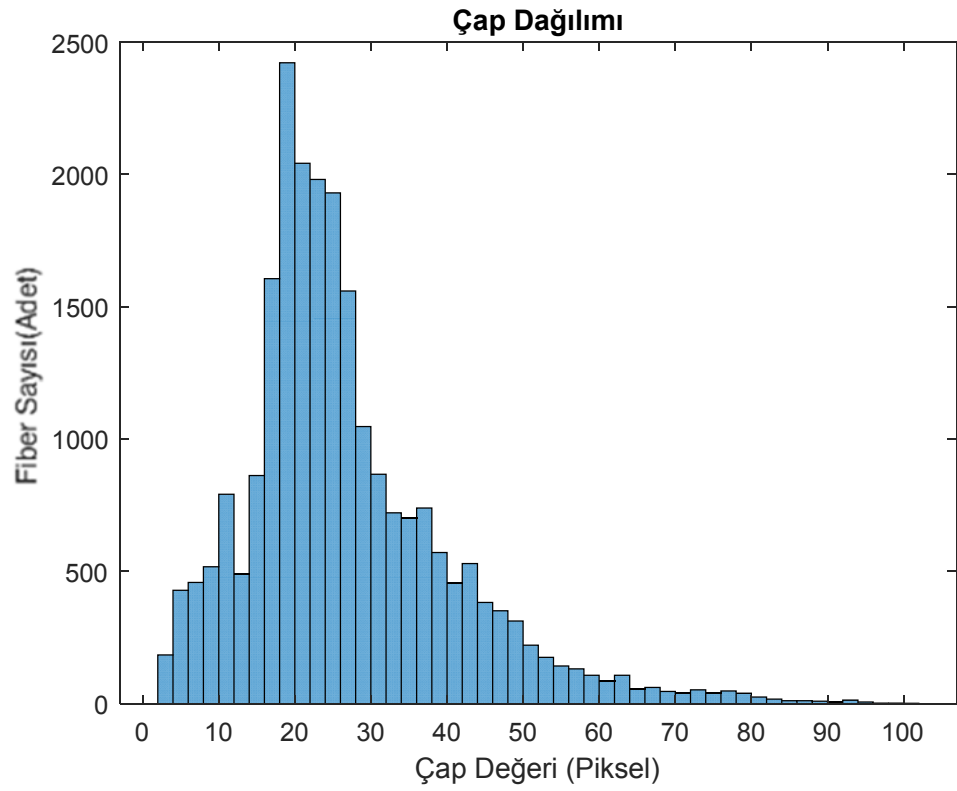
12)



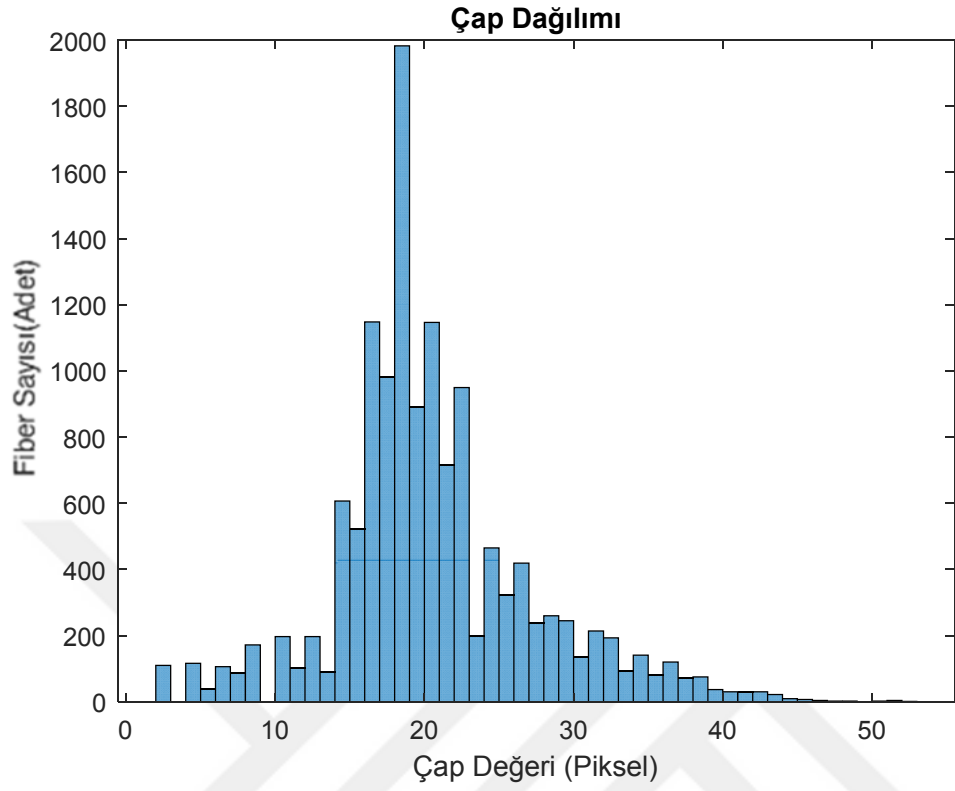
13)



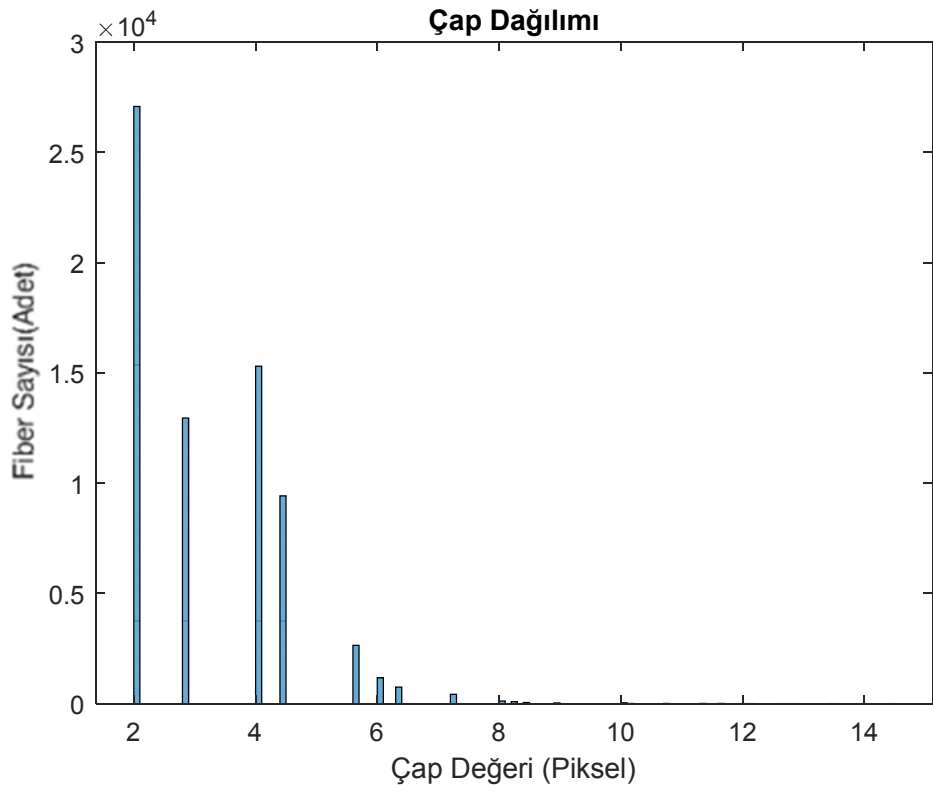
14)



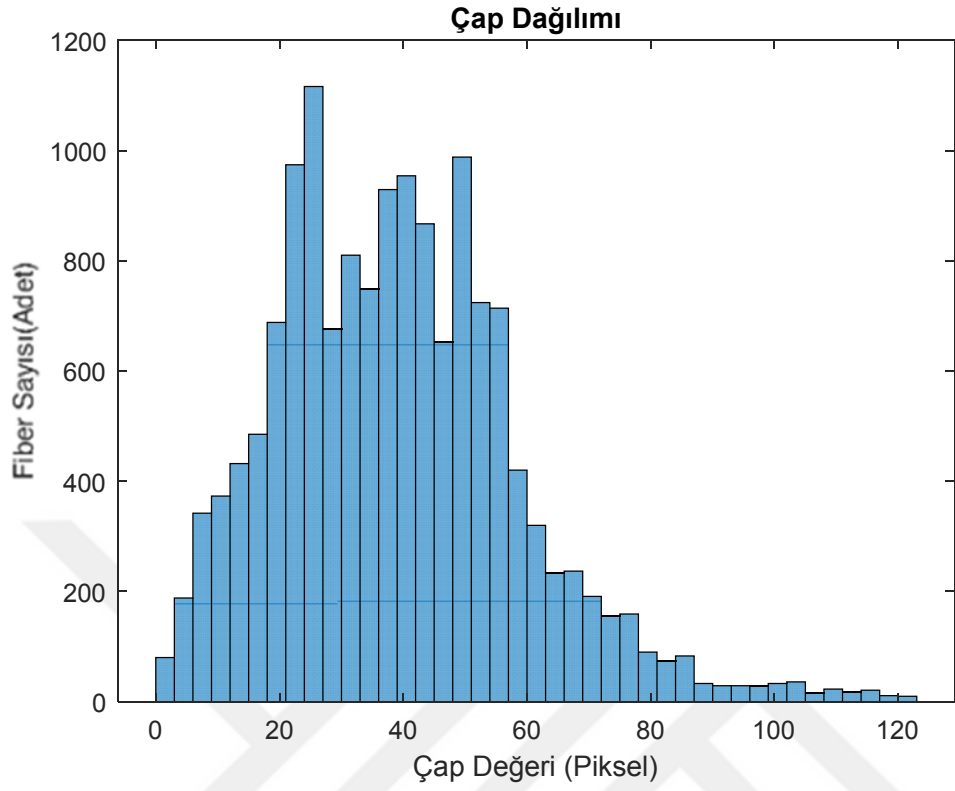
15)



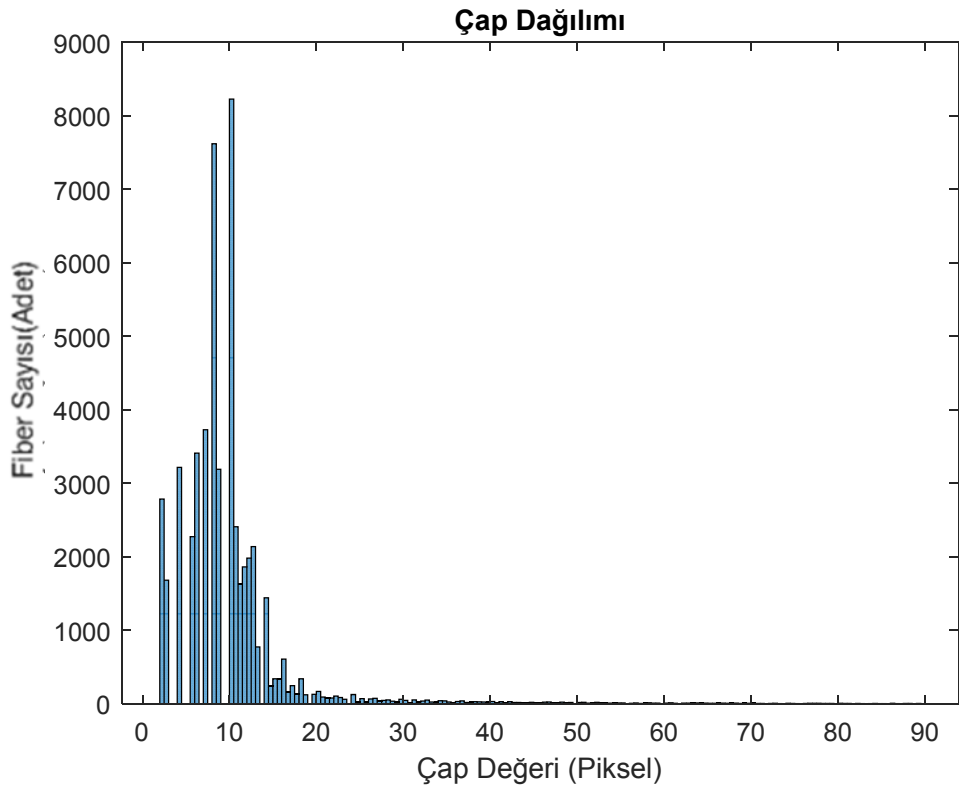
16)



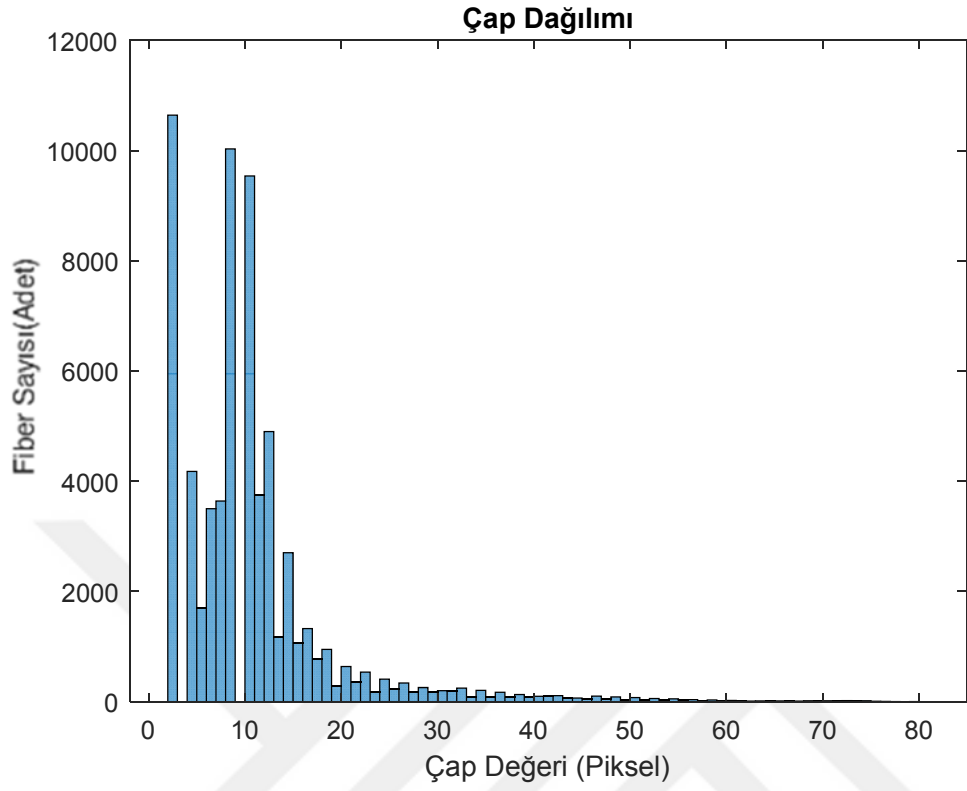
17)



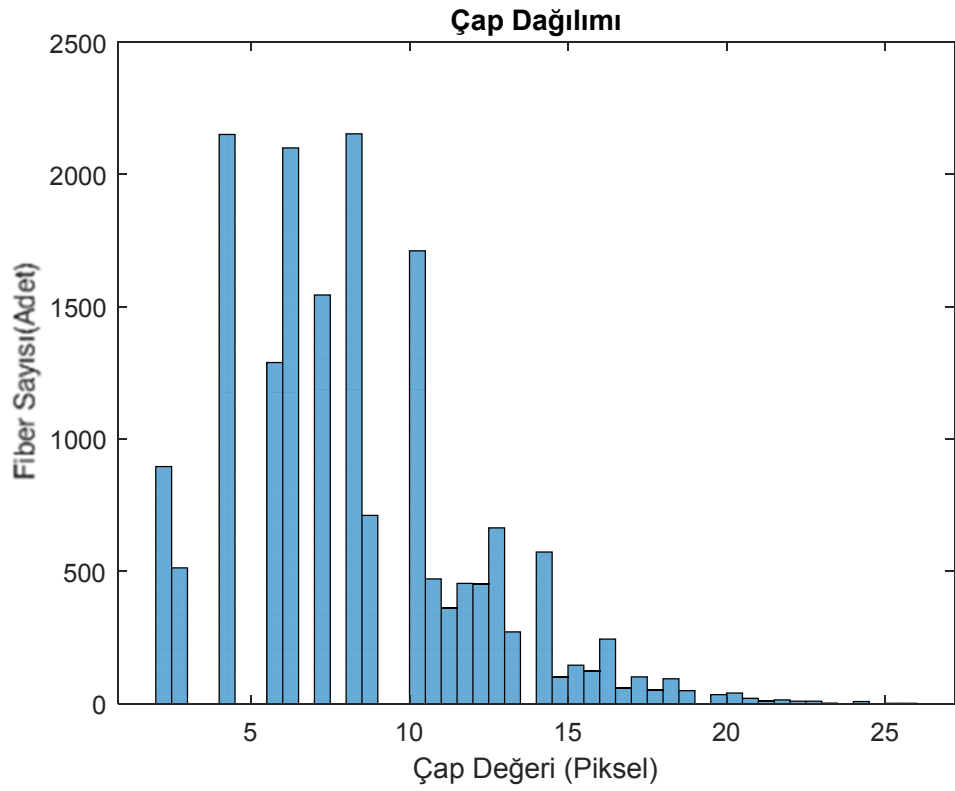
18)



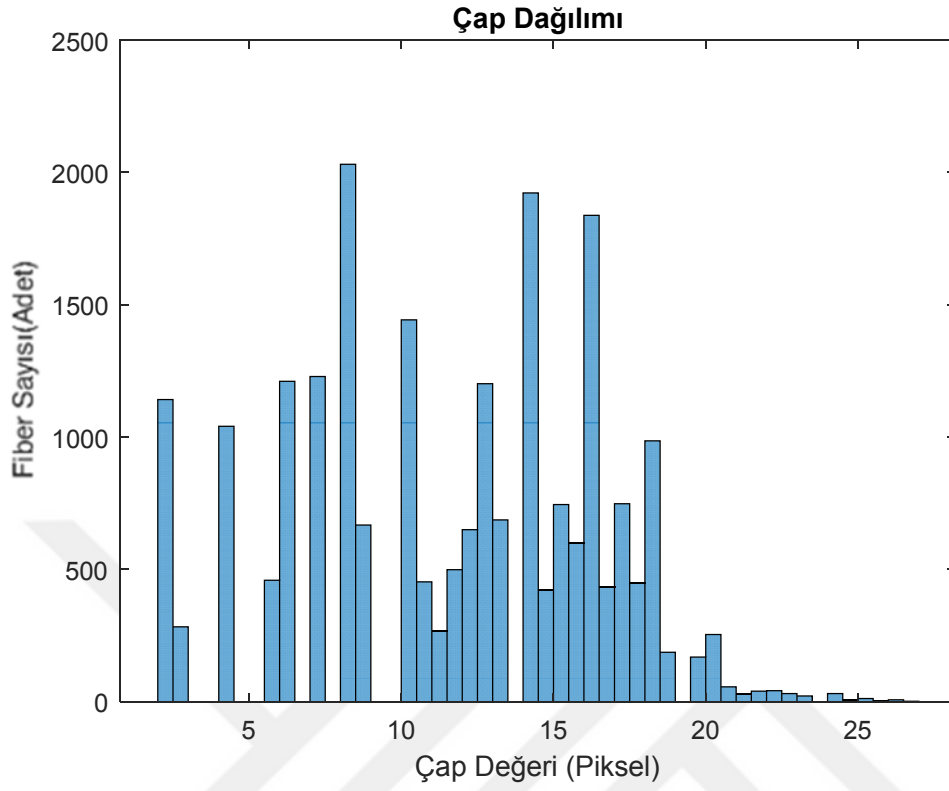
19)



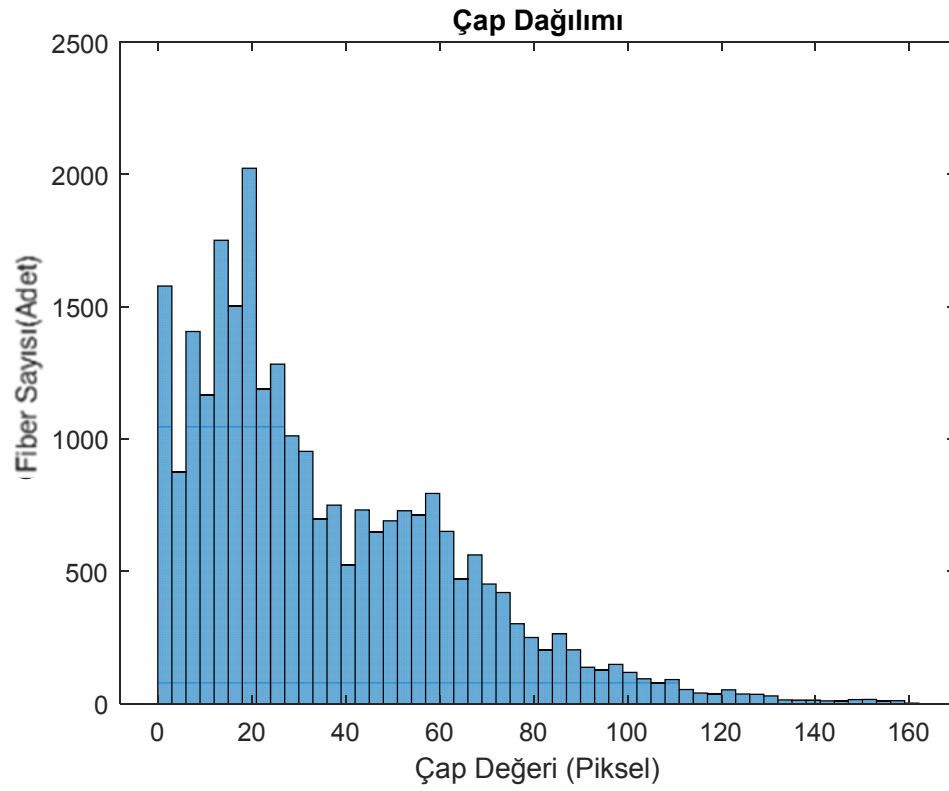
20)



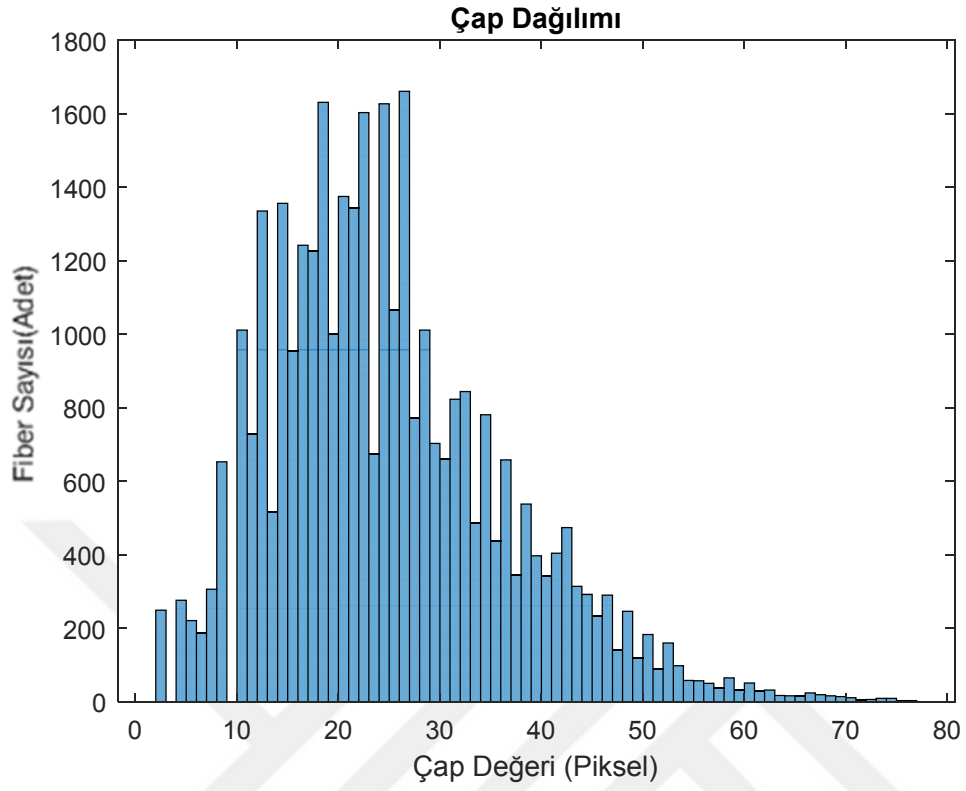
21)



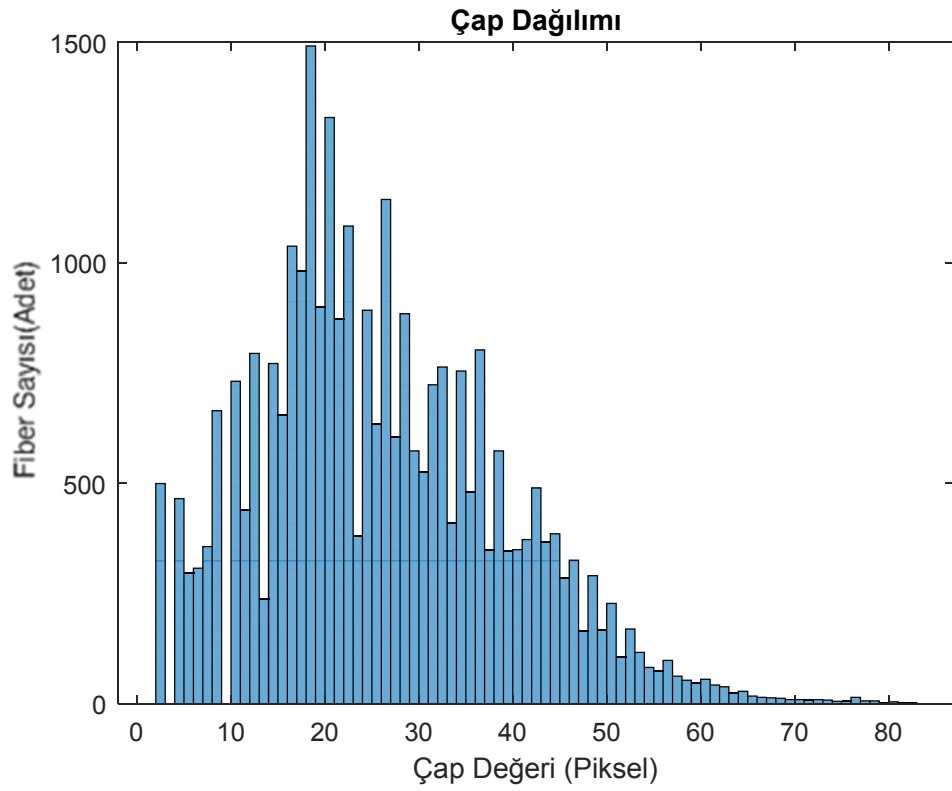
22)



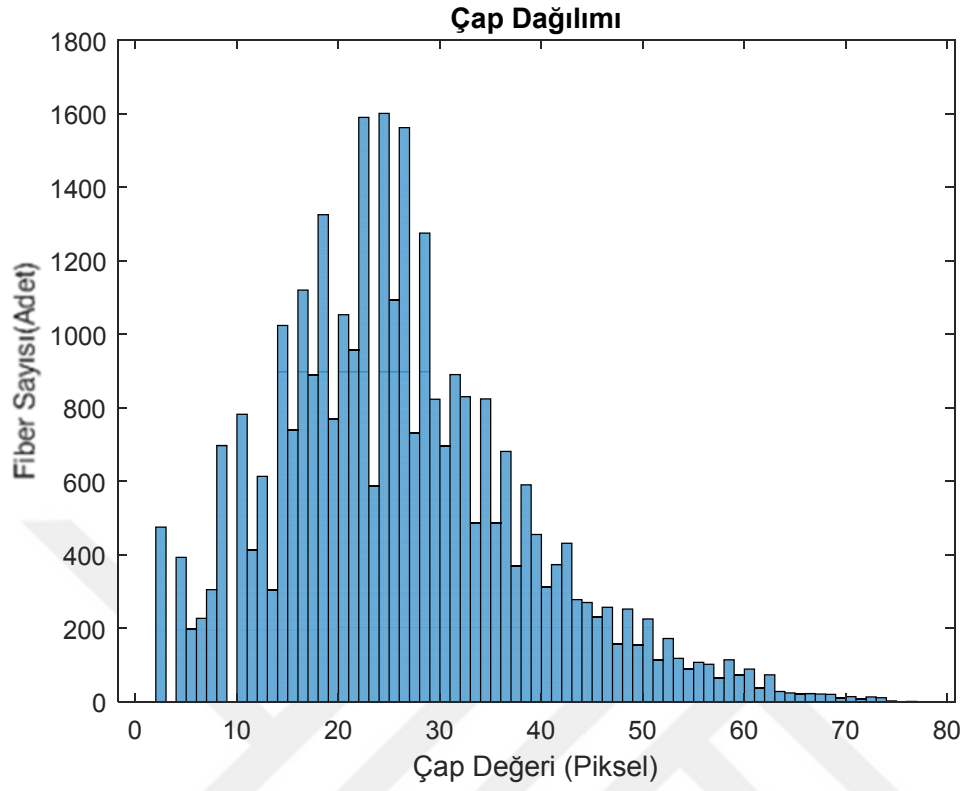
23)



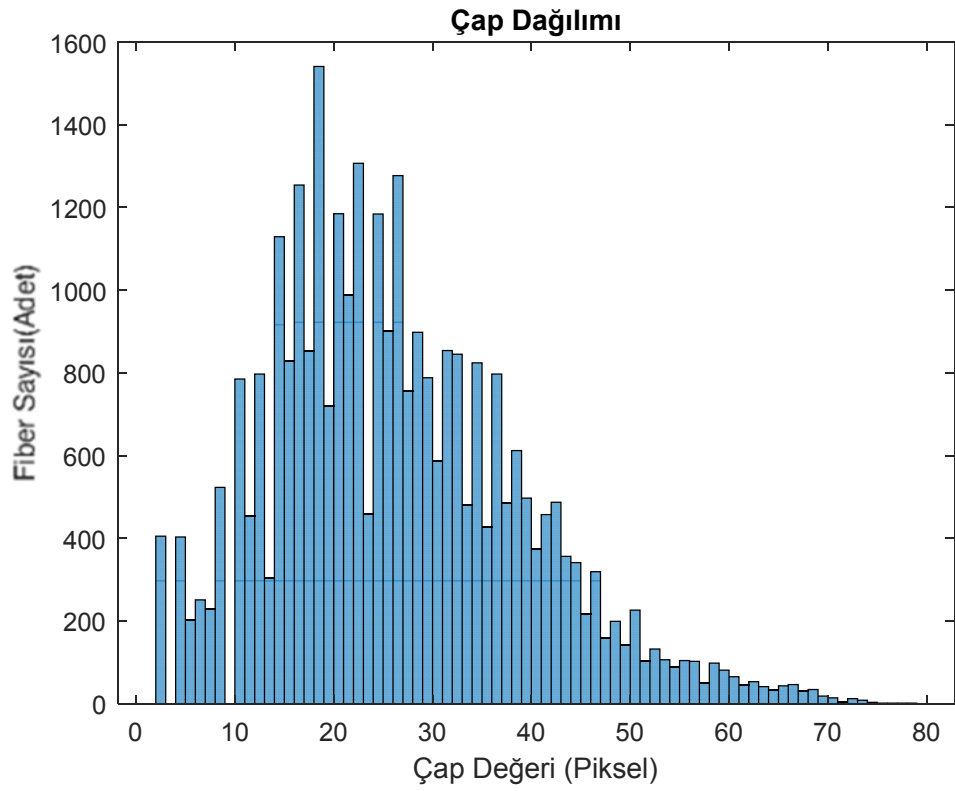
24)



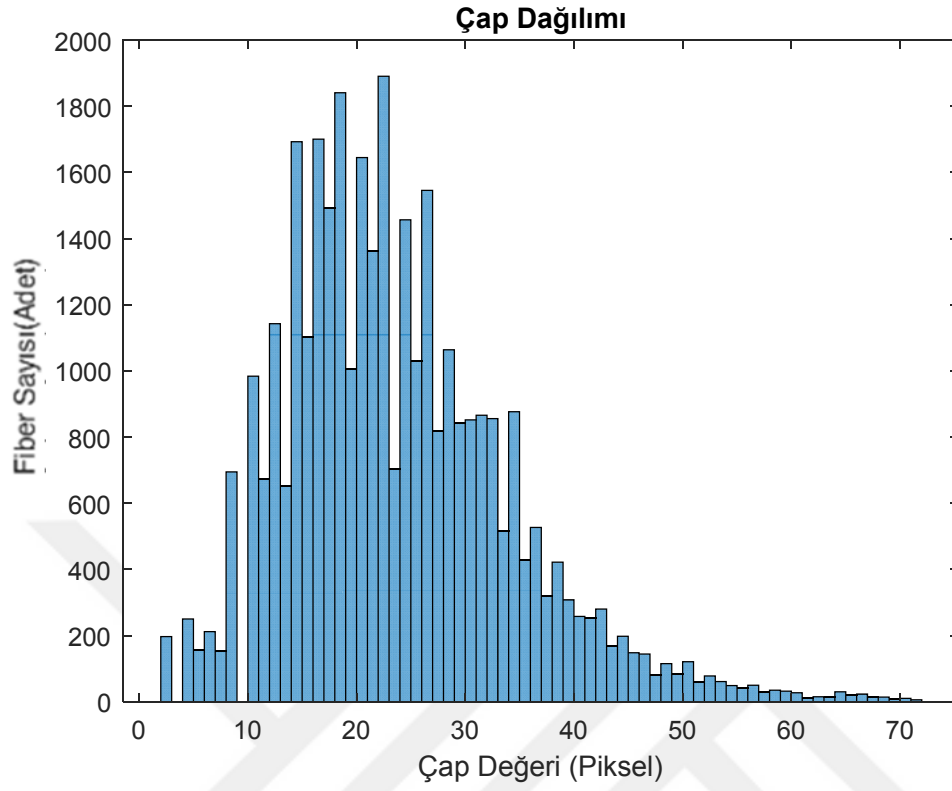
25)



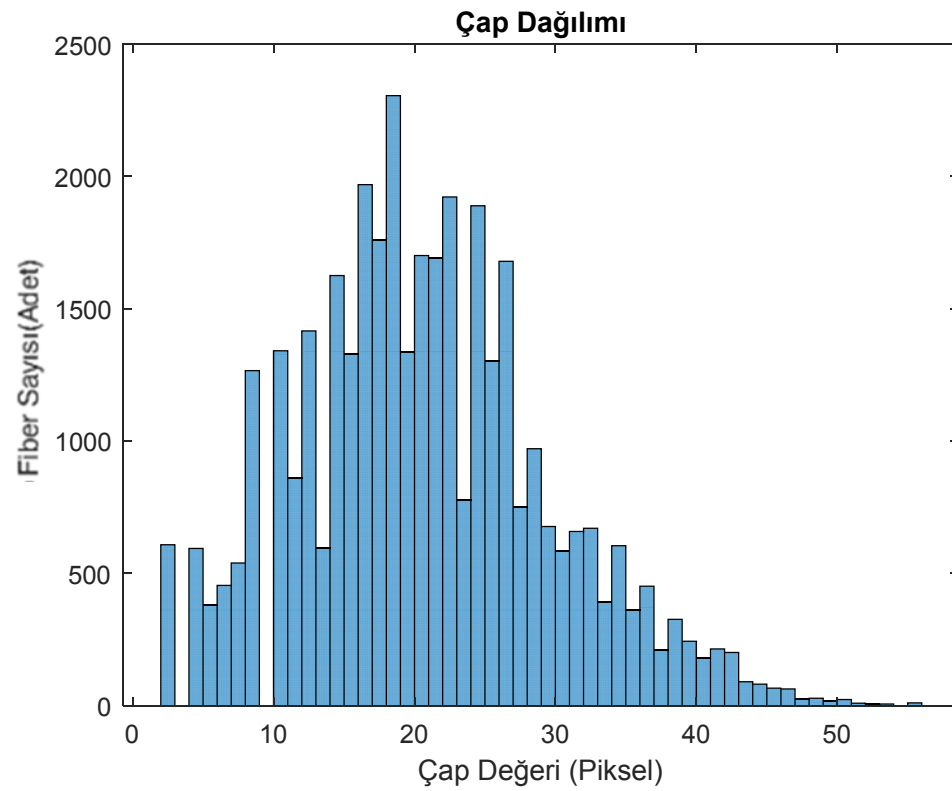
26)



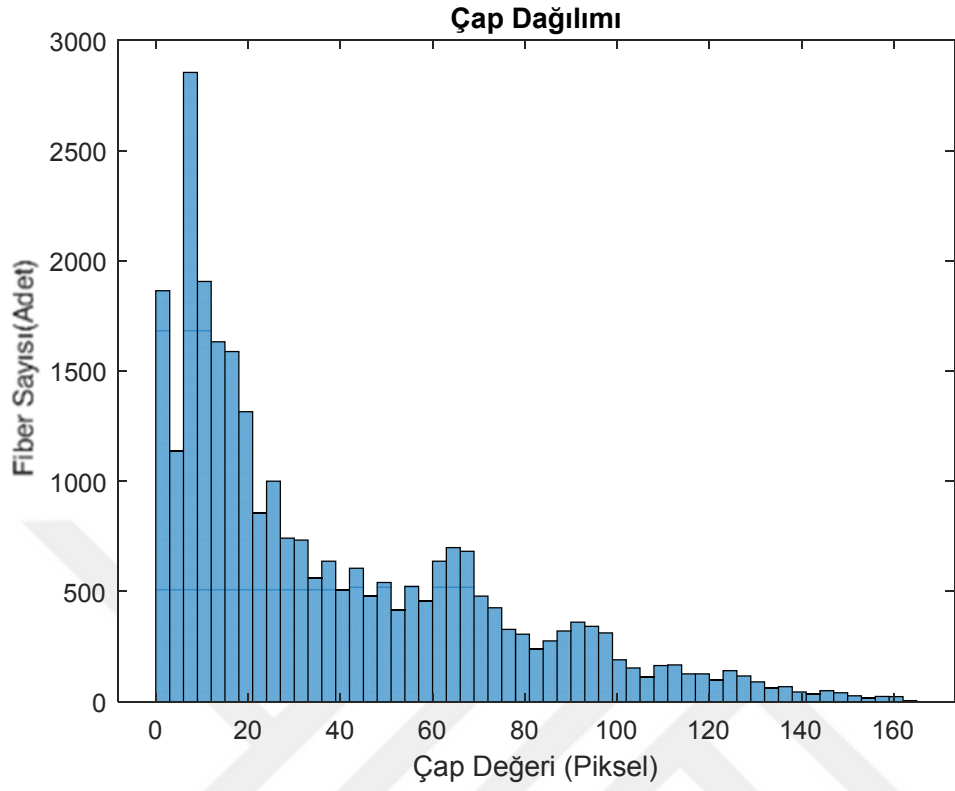
27)



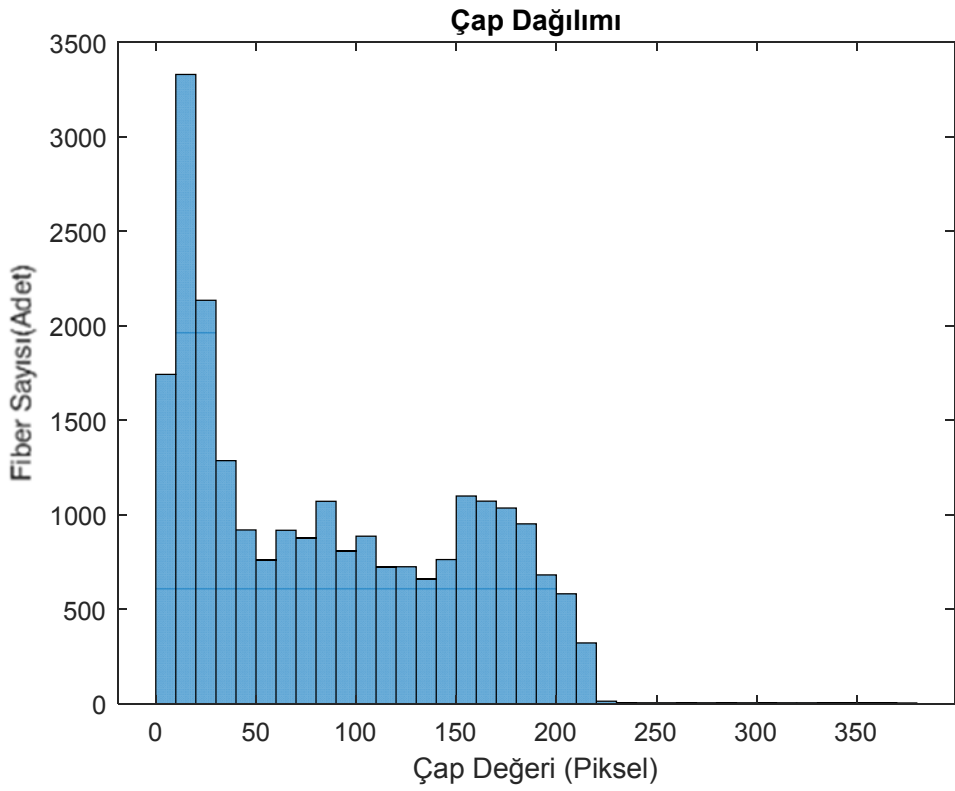
28)



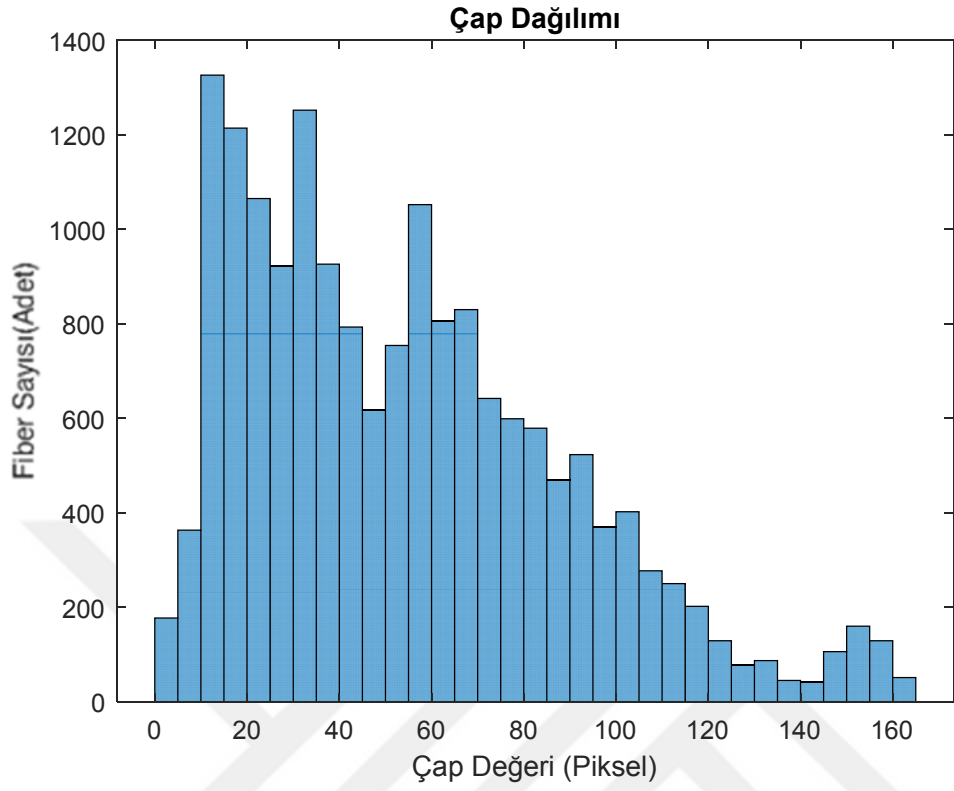
29)



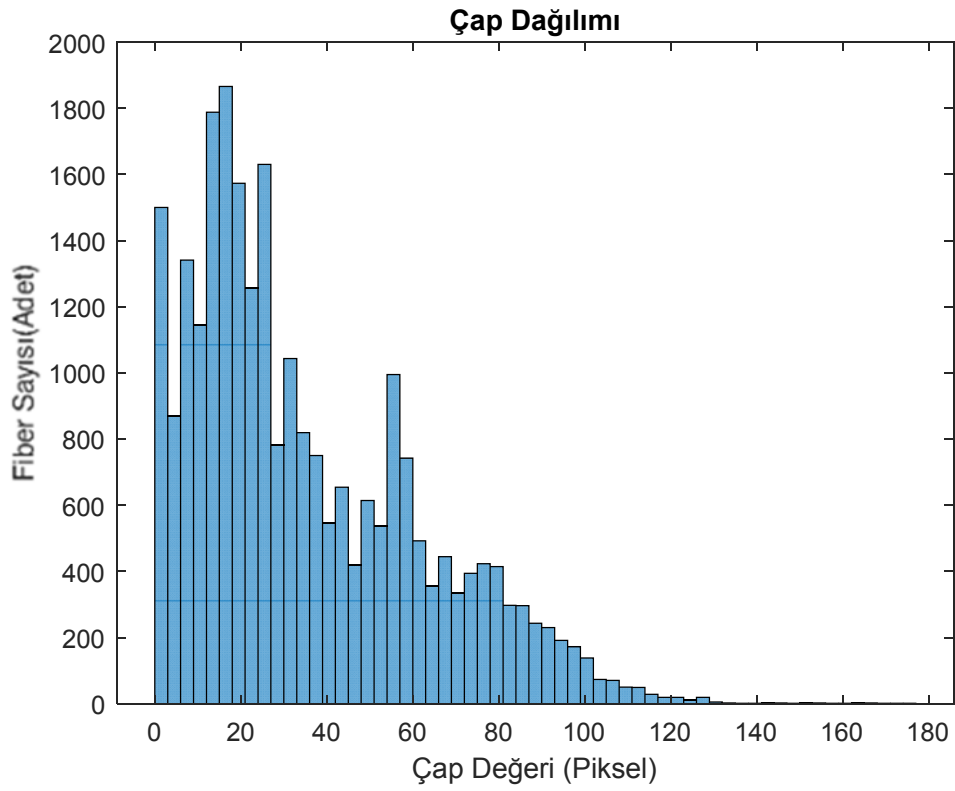
30)



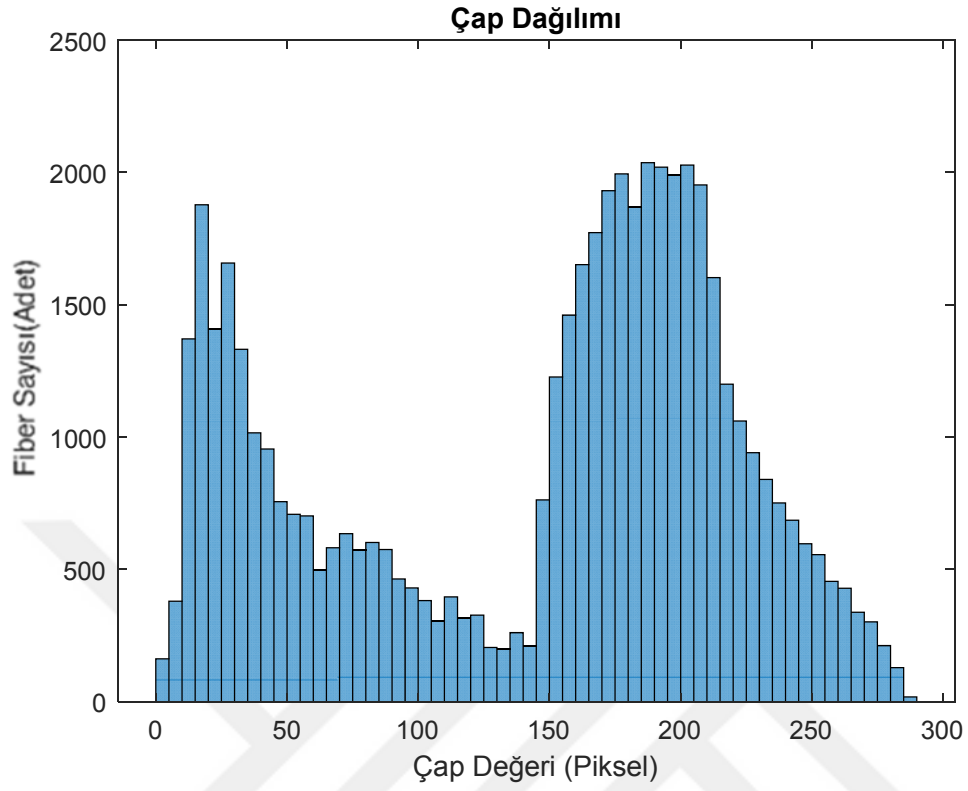
31)



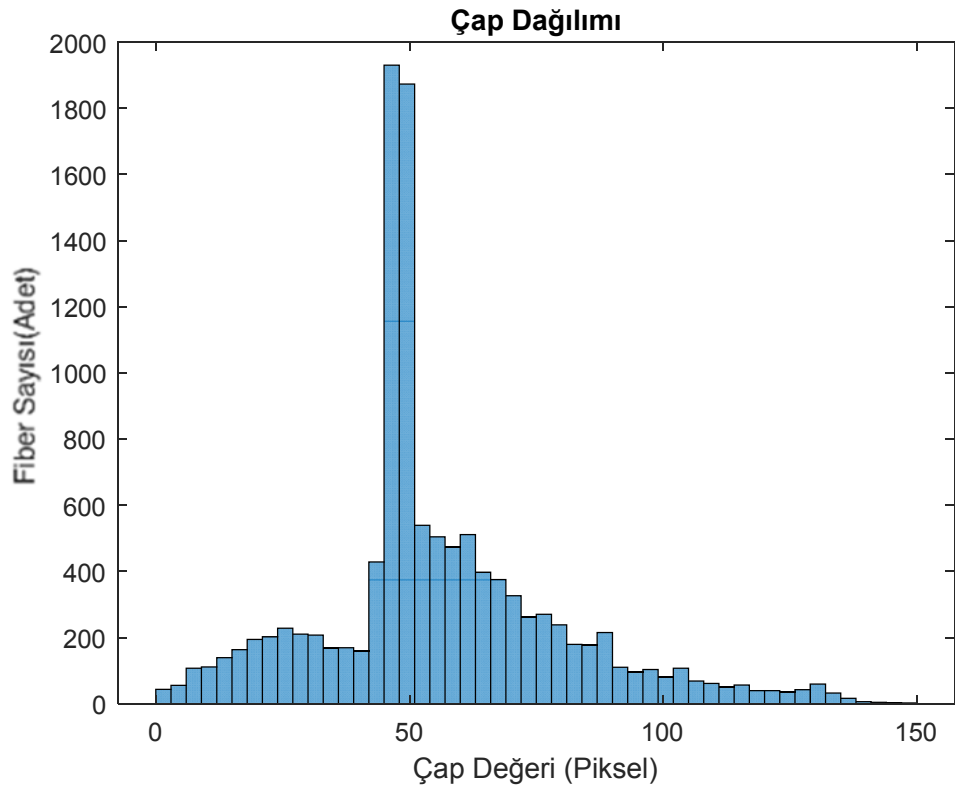
32)



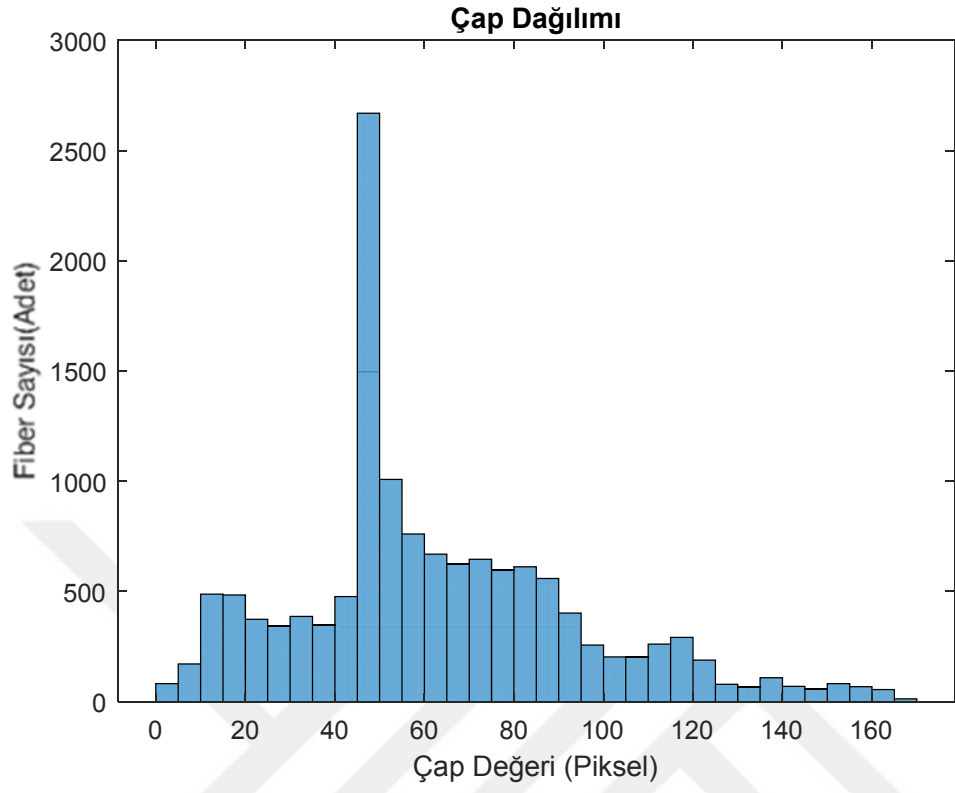
33)



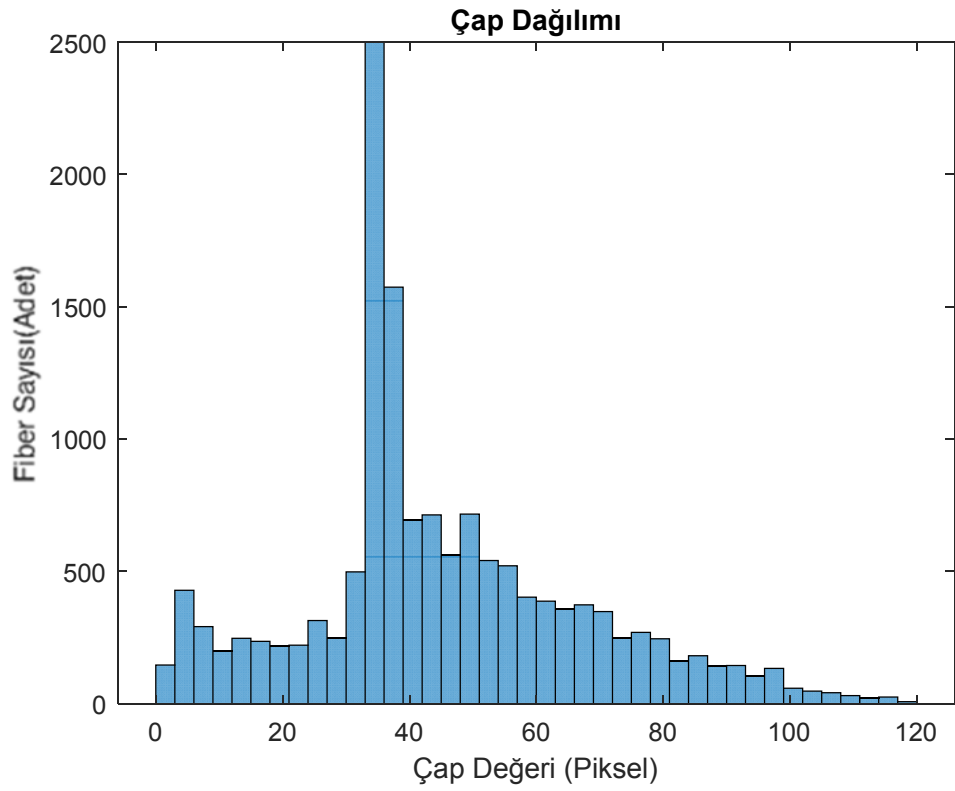
34)



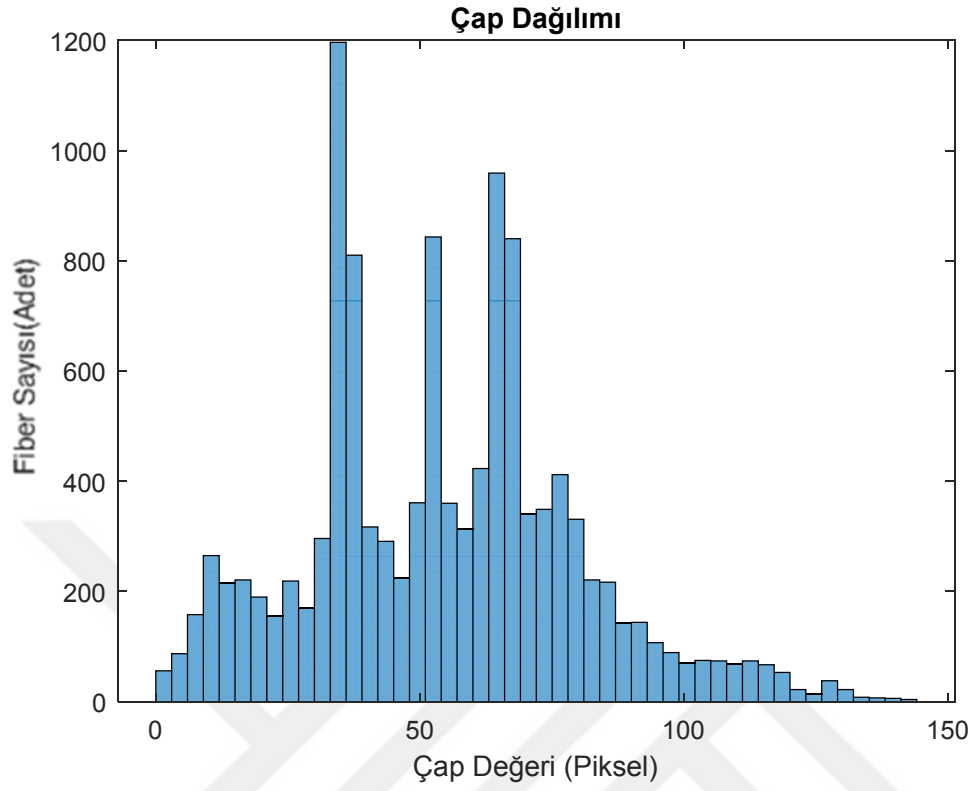
35)



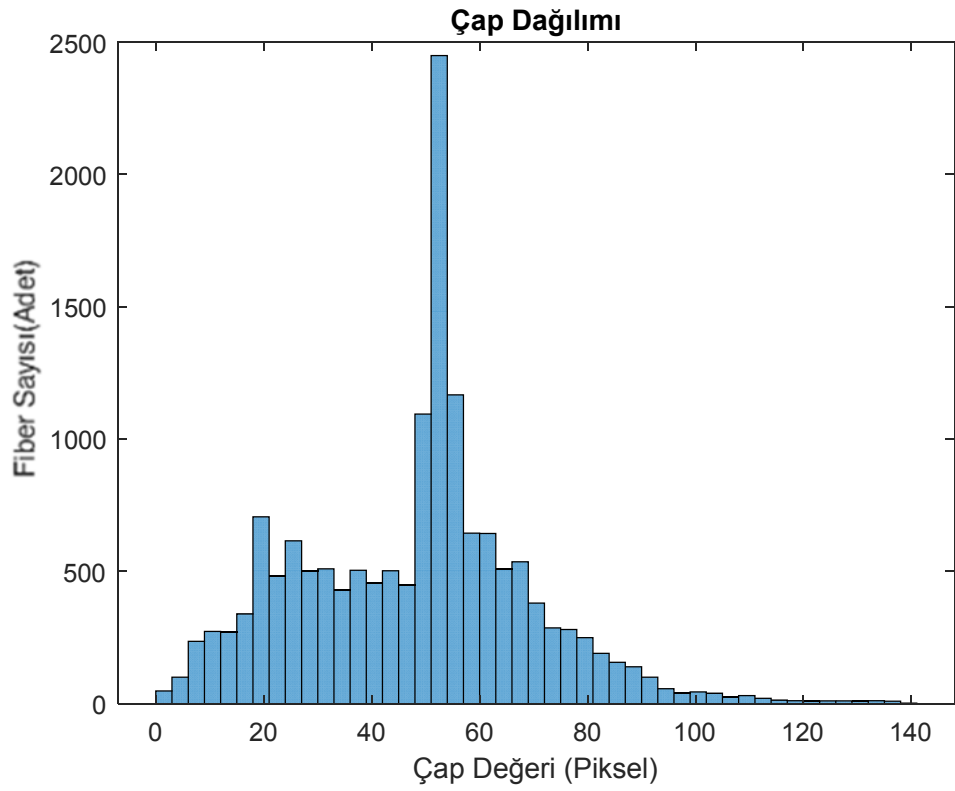
36)



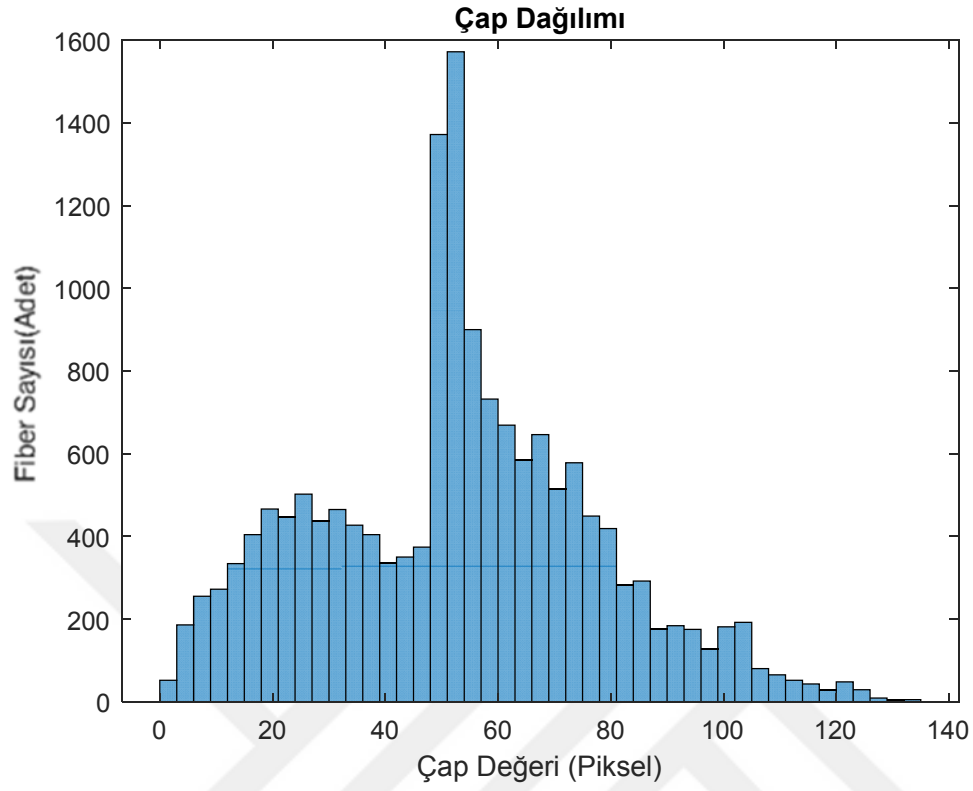
37)



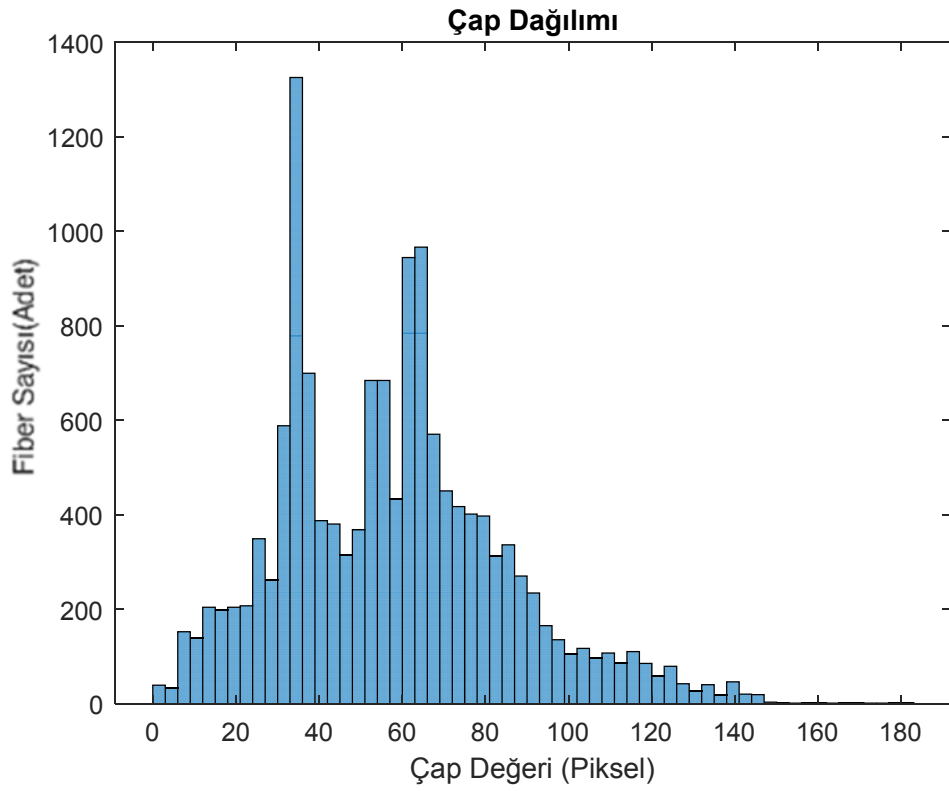
38)



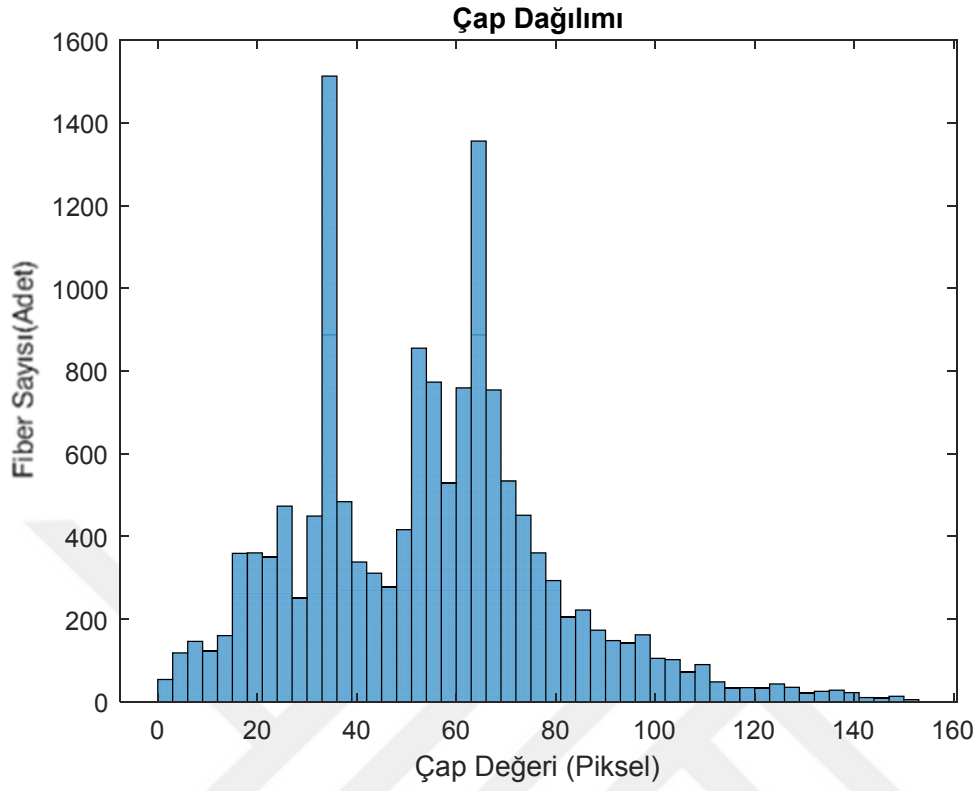
39)



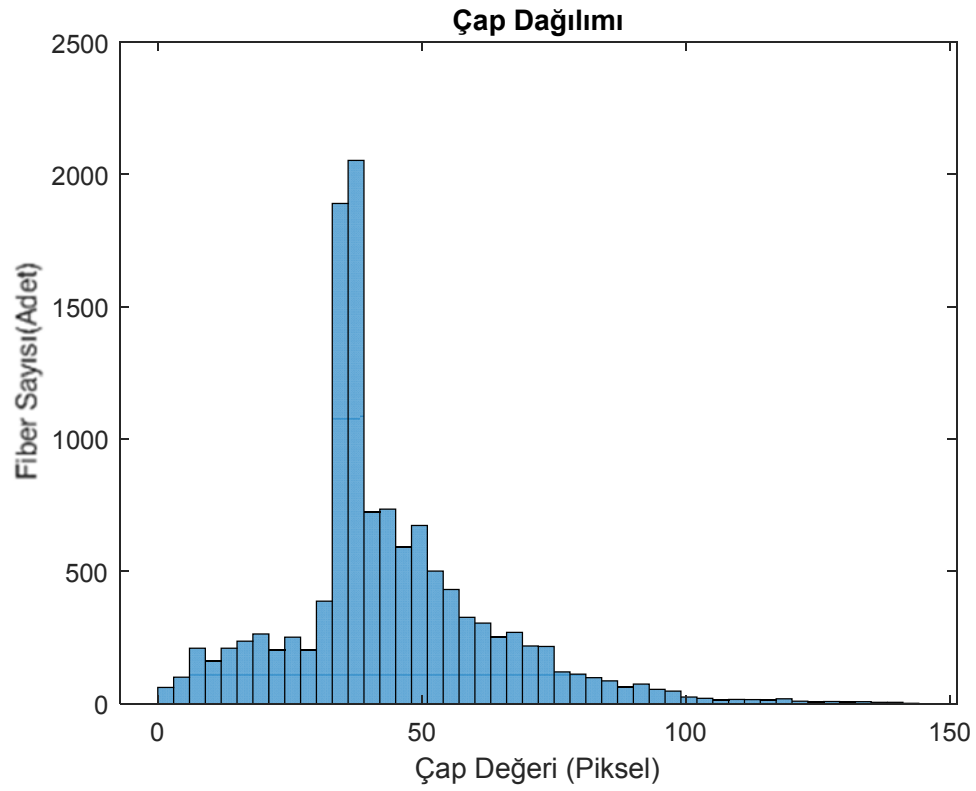
40)



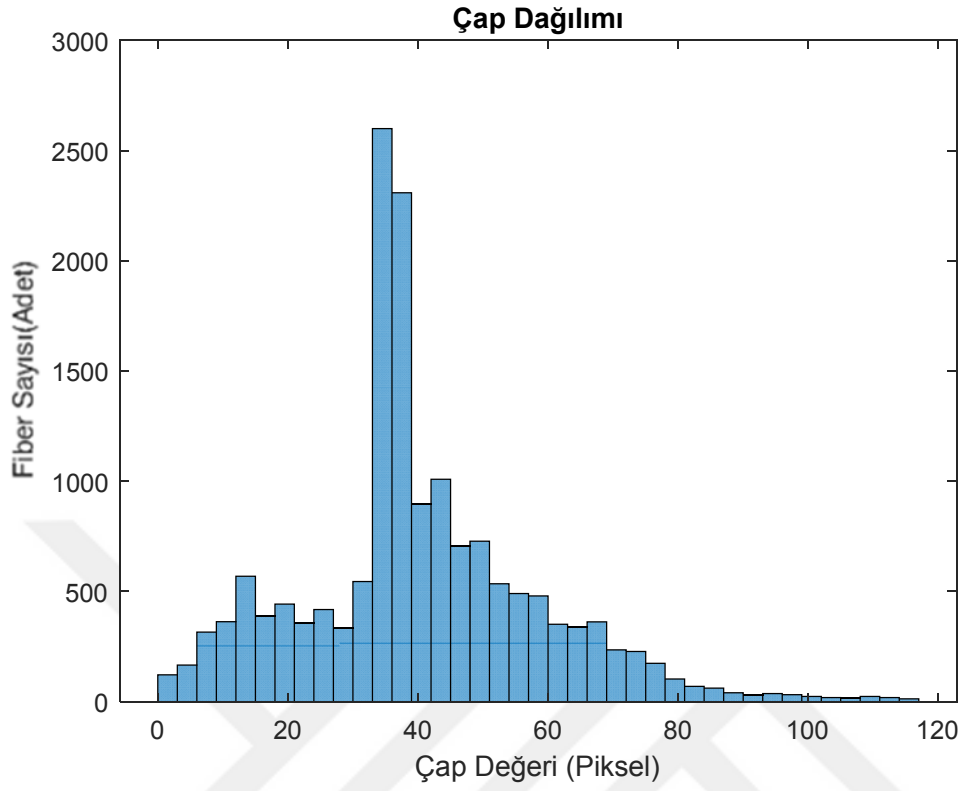
41)



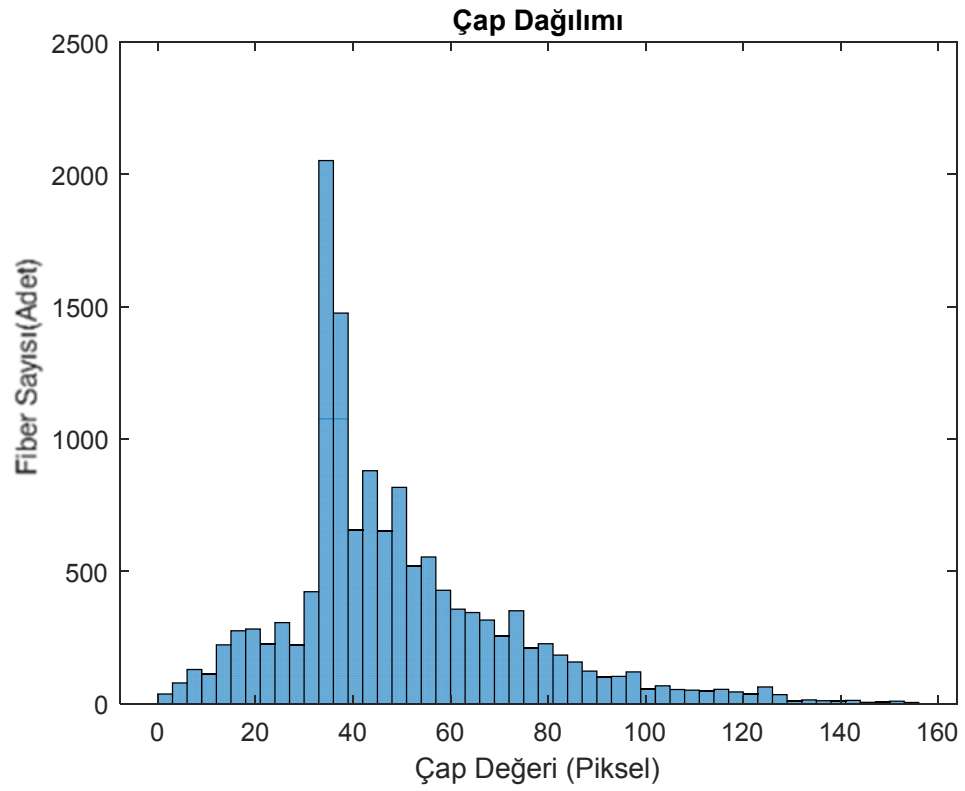
42)



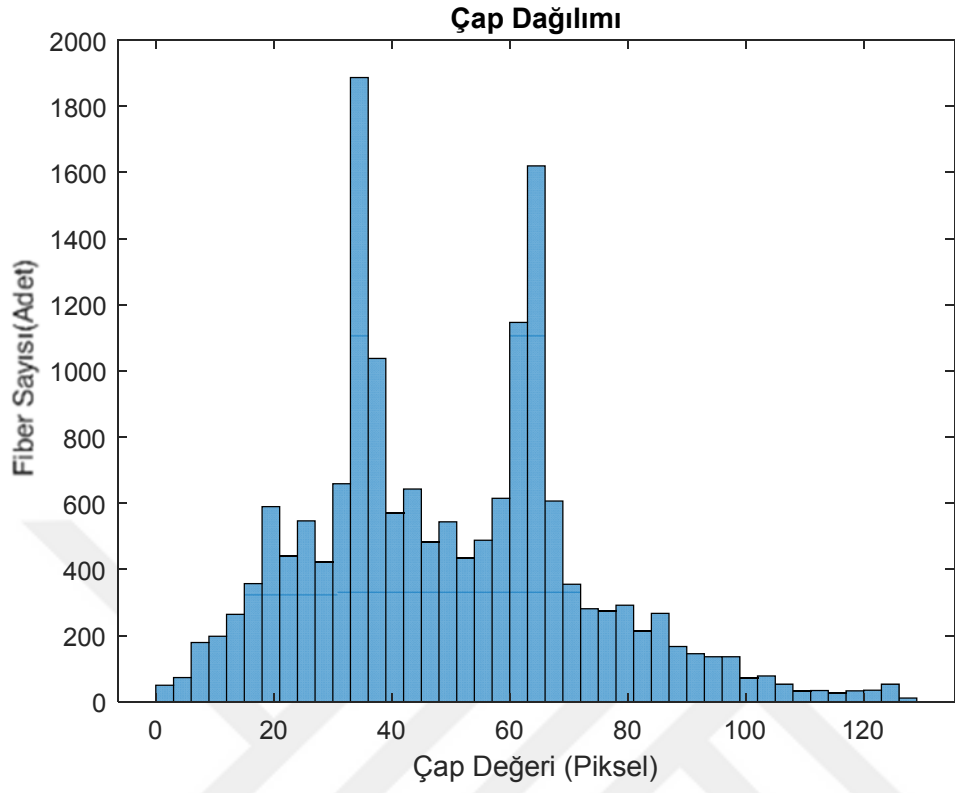
43)



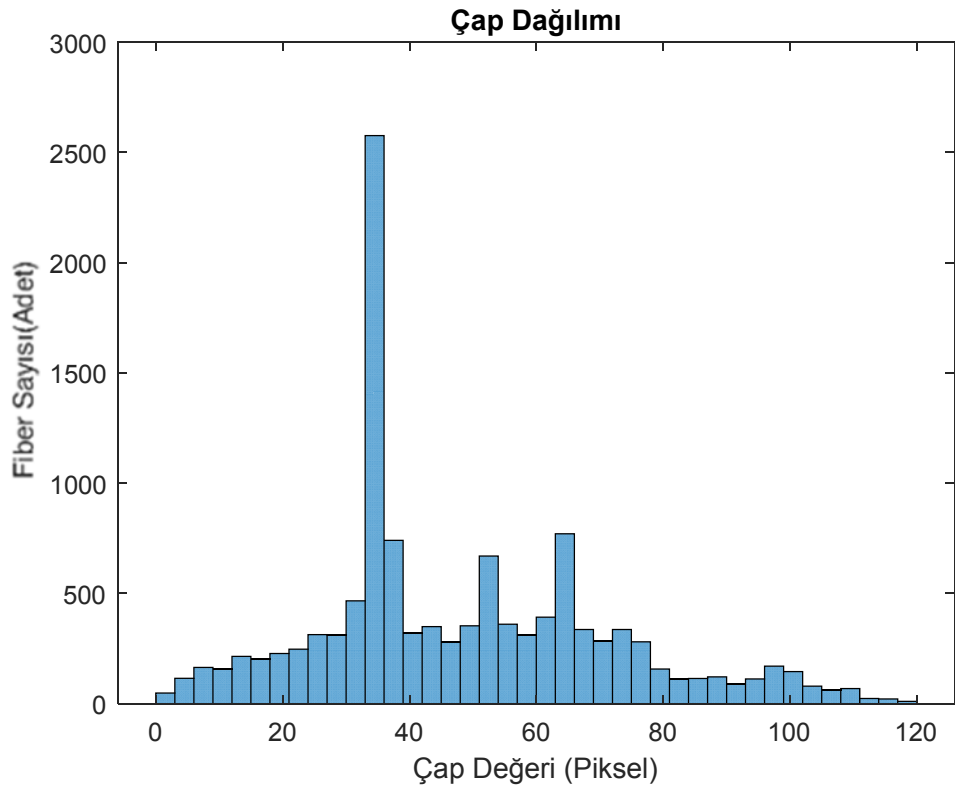
44)



45)

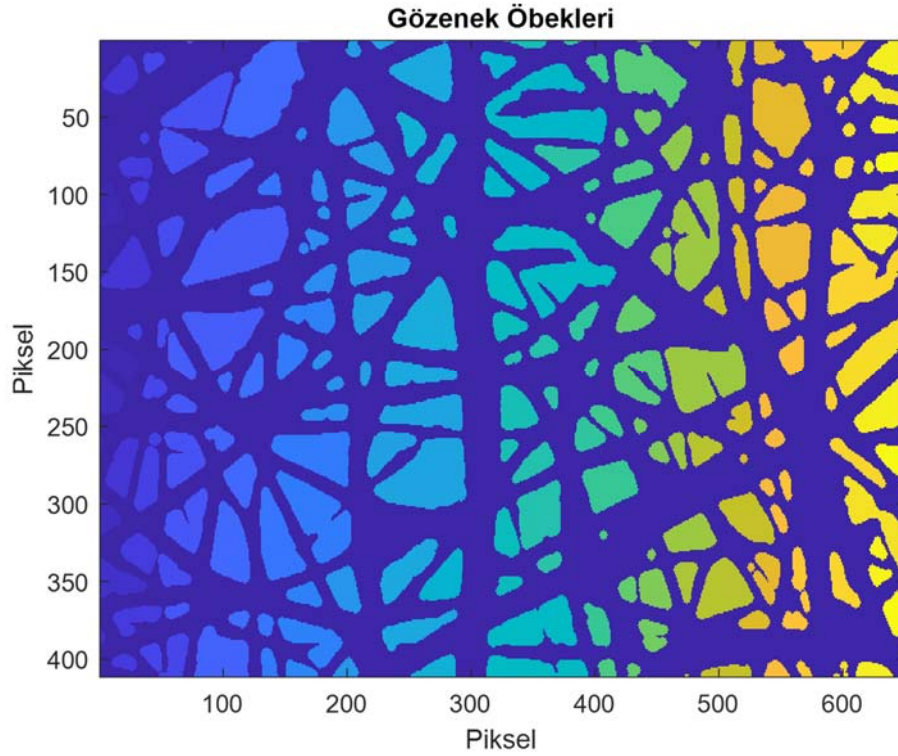


46)

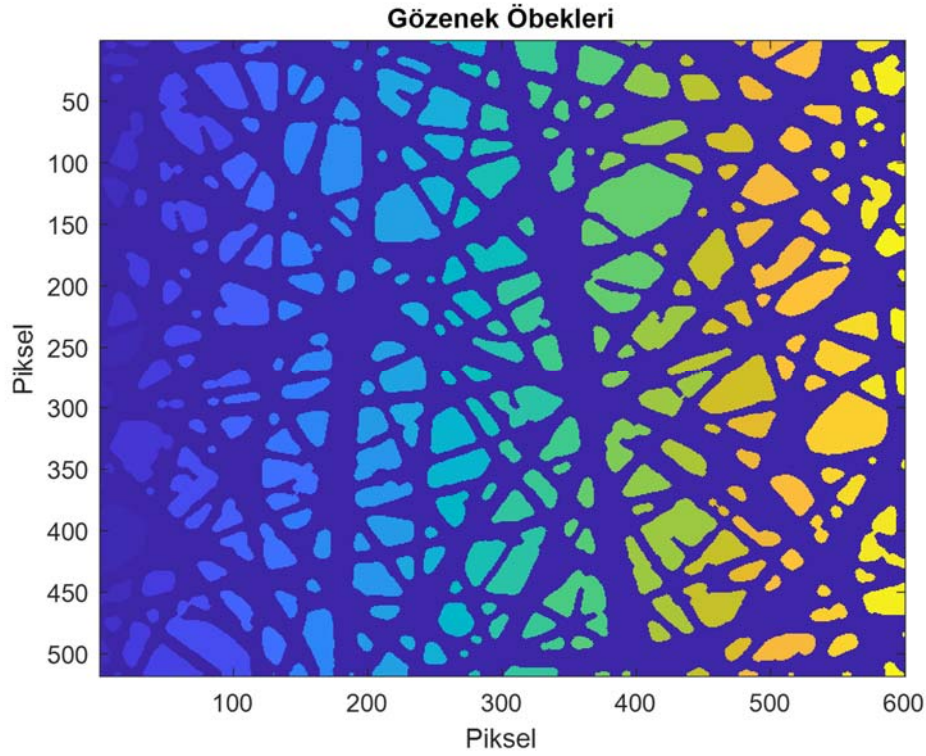


EK 7: 46 Adet Fiber İmge Veri Setine Ait Gözenek Karakterizasyon Matrisleri

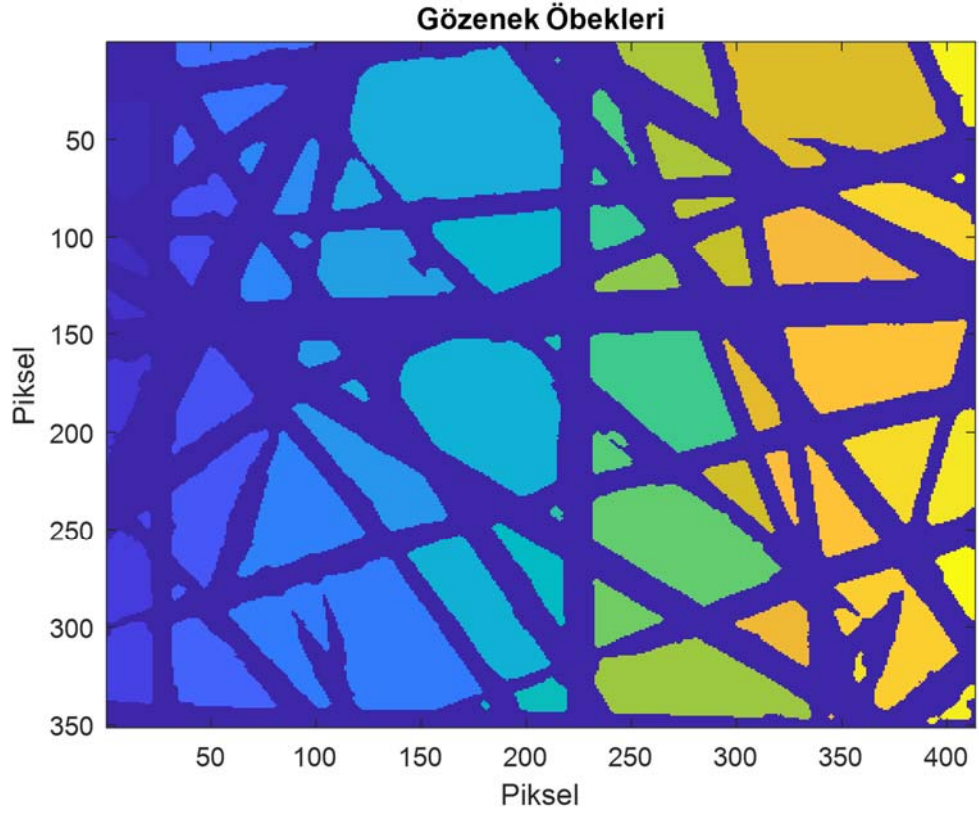
1)



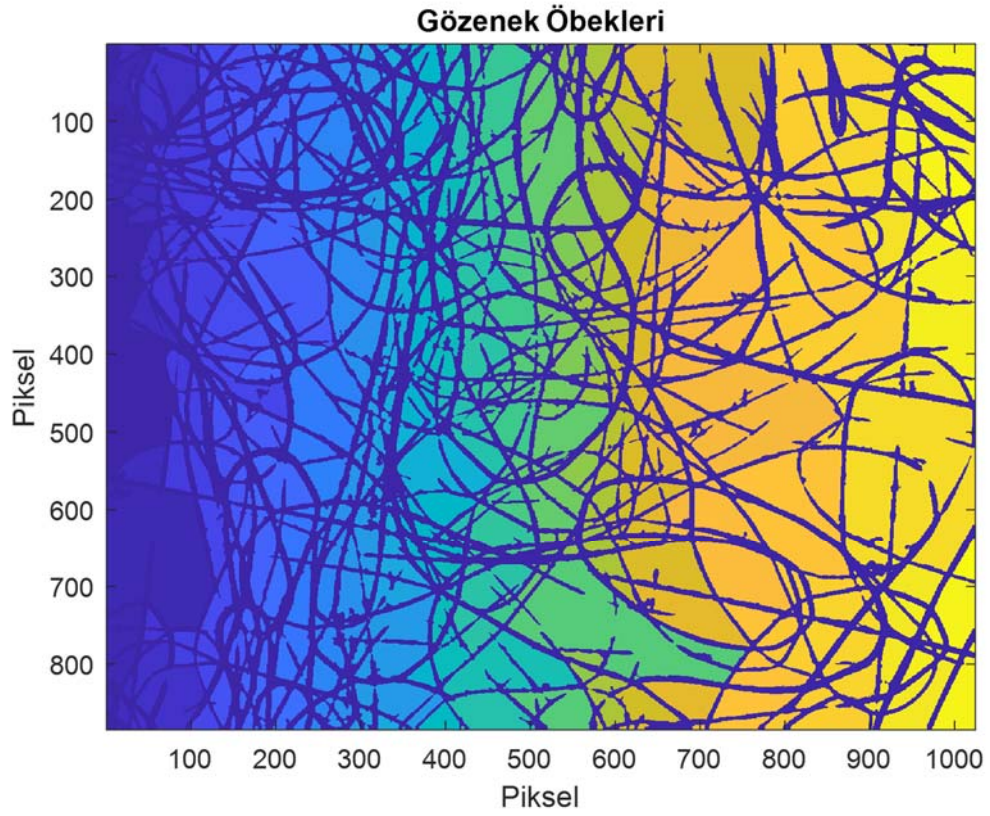
2)



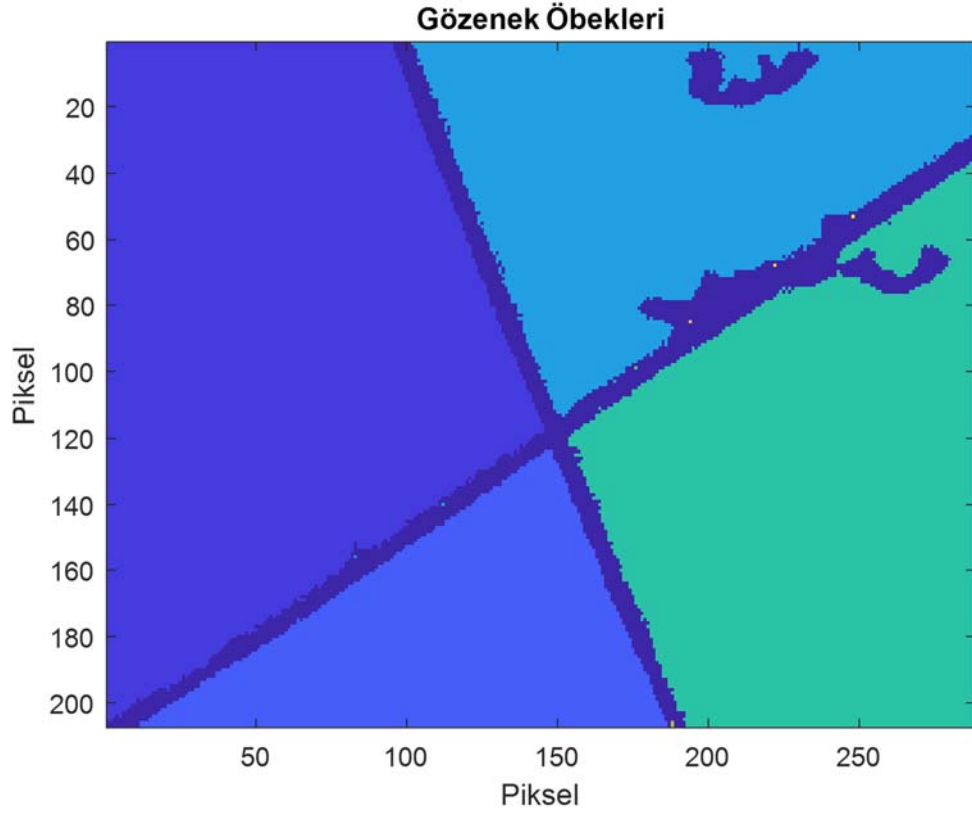
3)



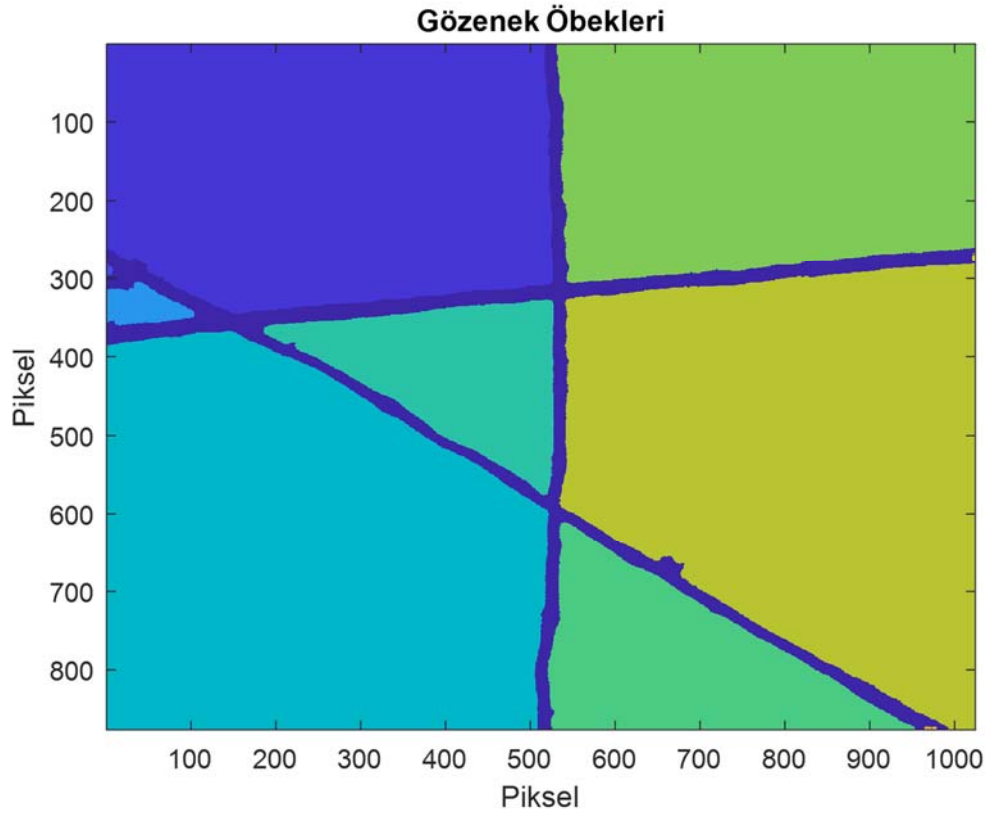
4)



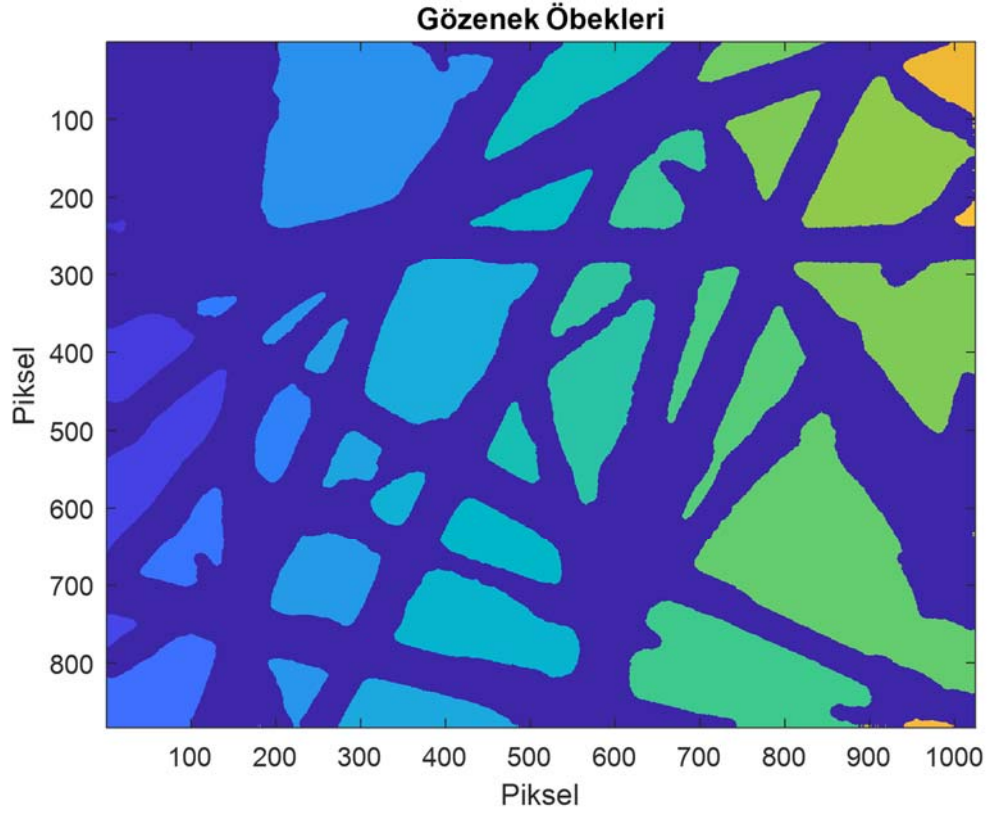
5)



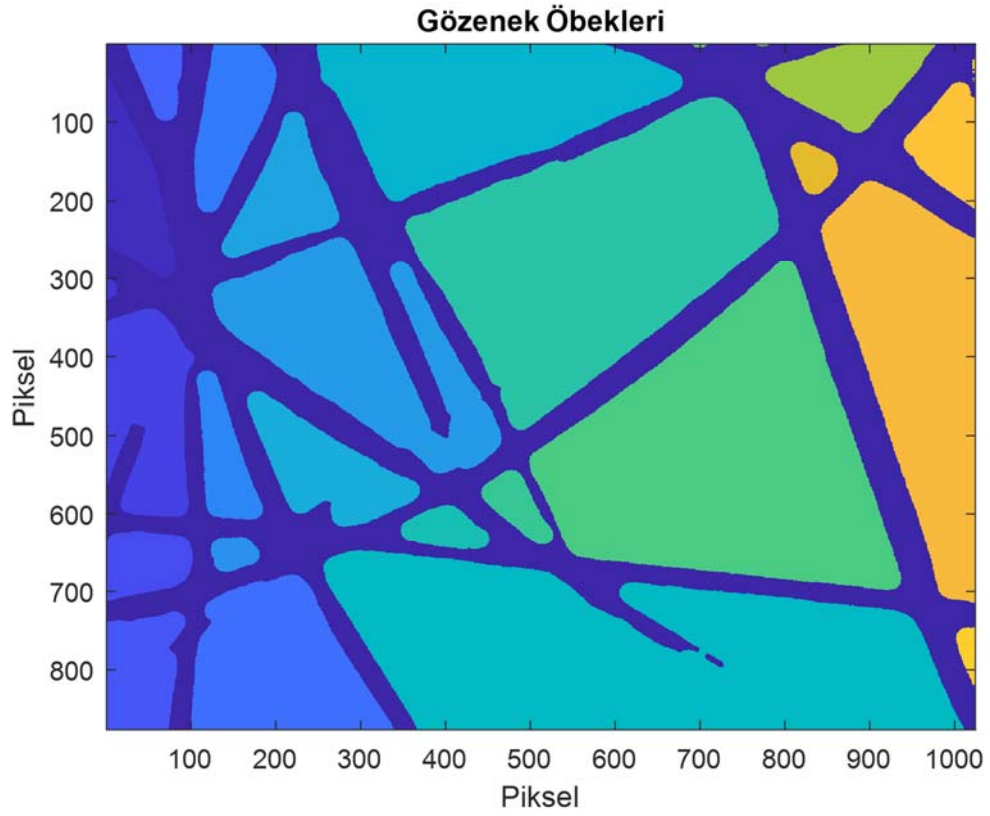
6)



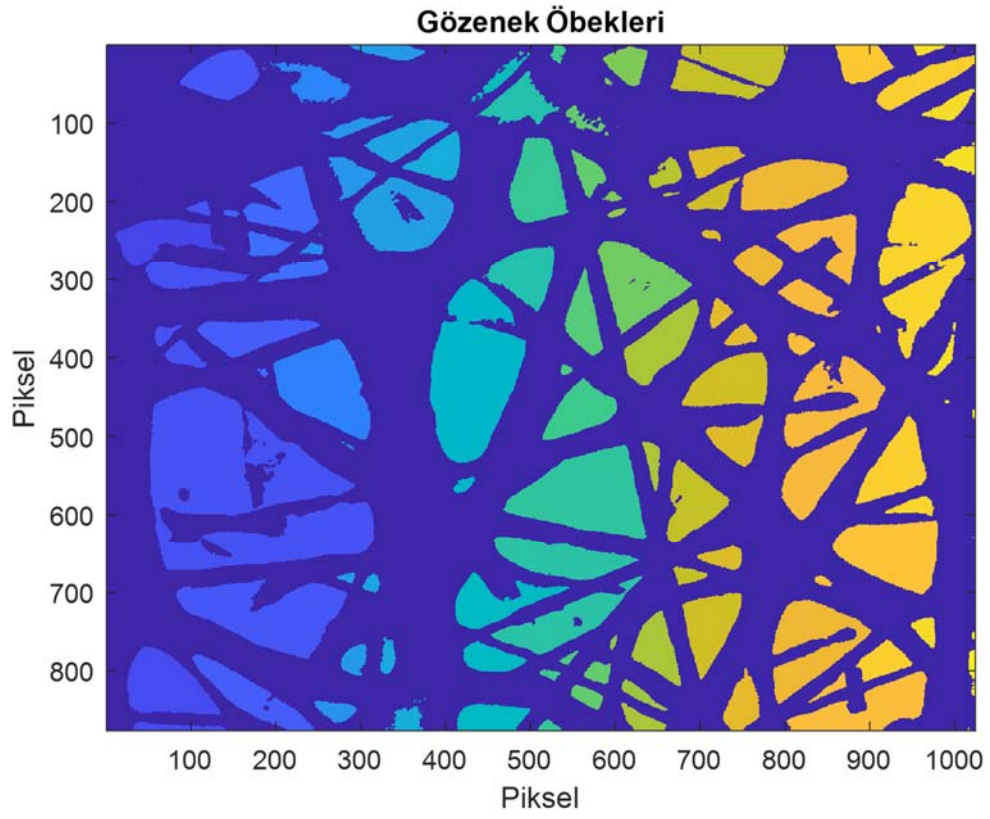
7)



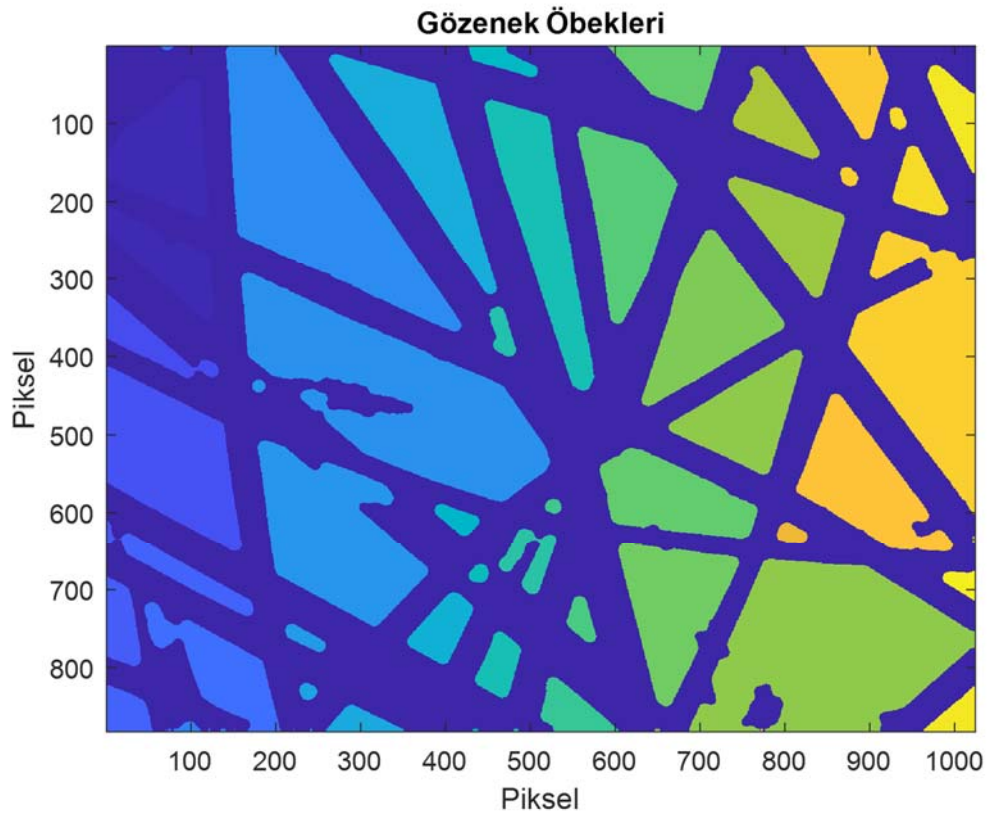
8)



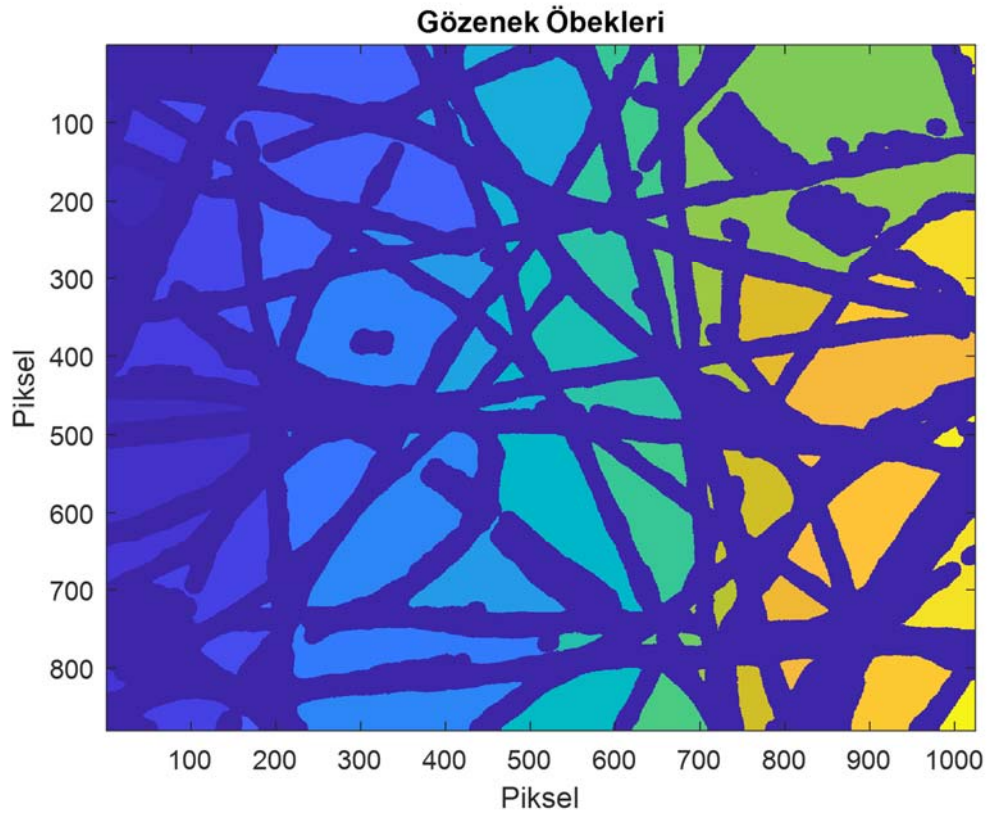
9)



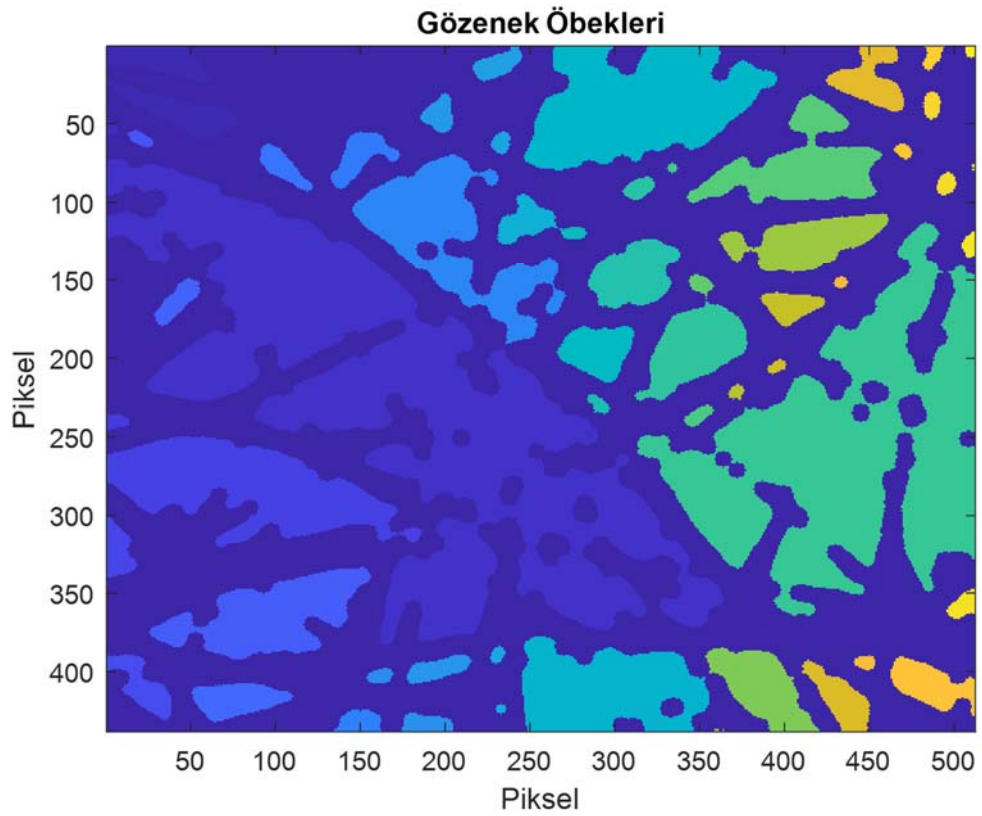
10)



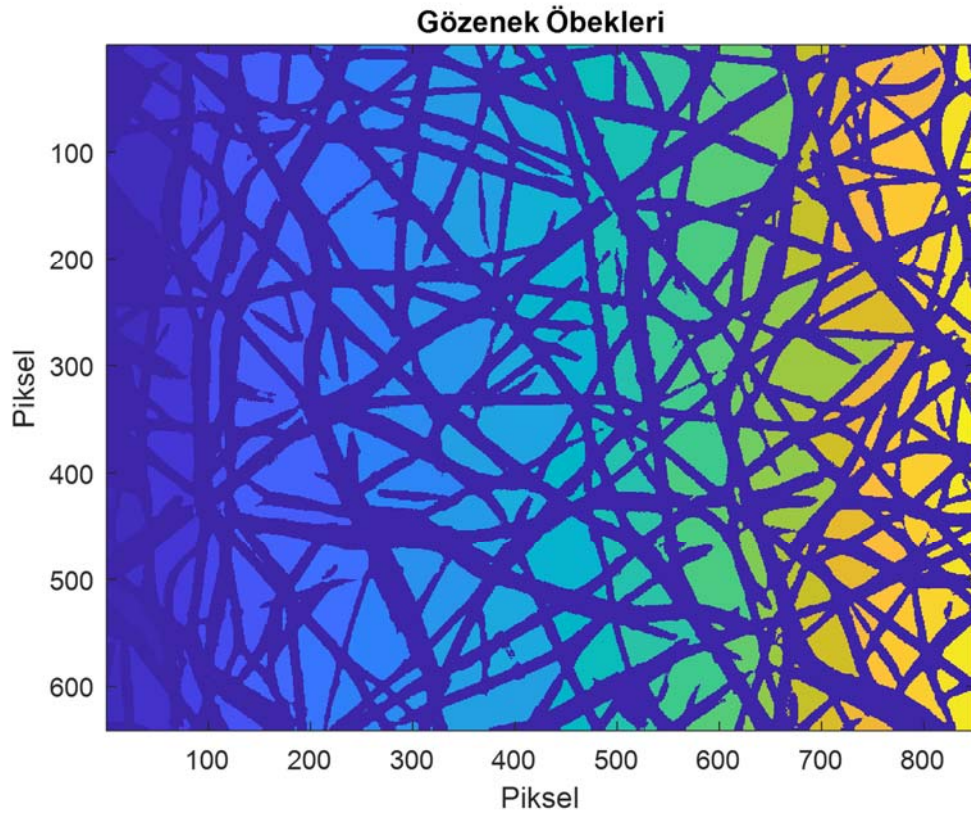
11)



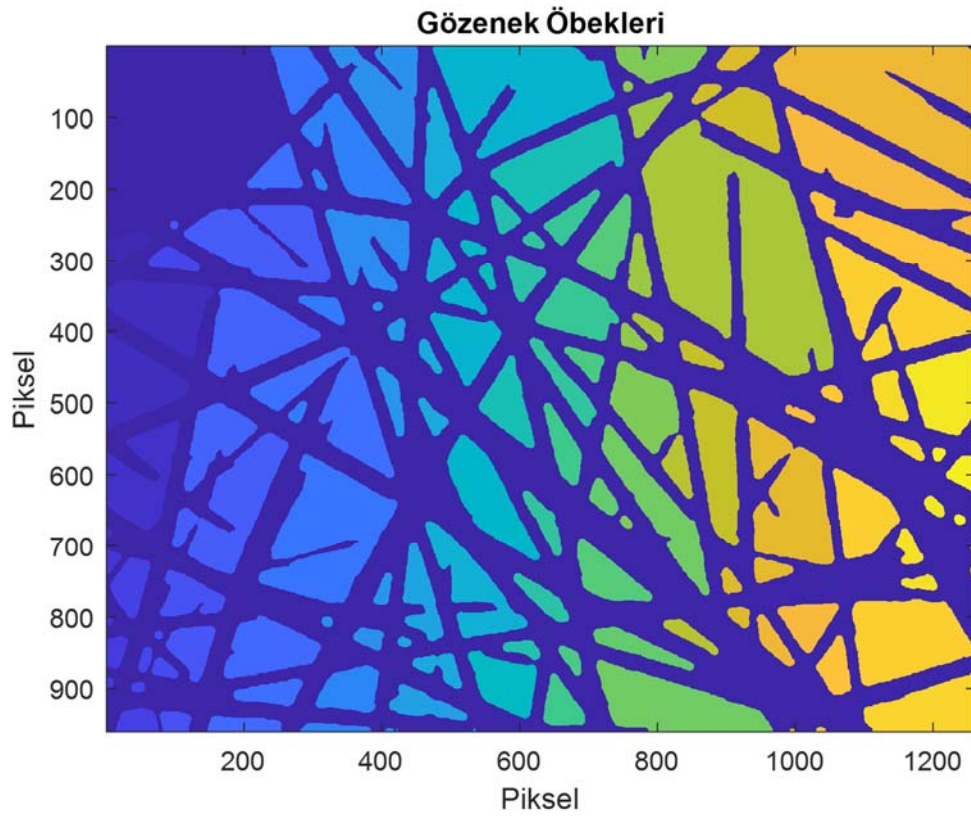
12)



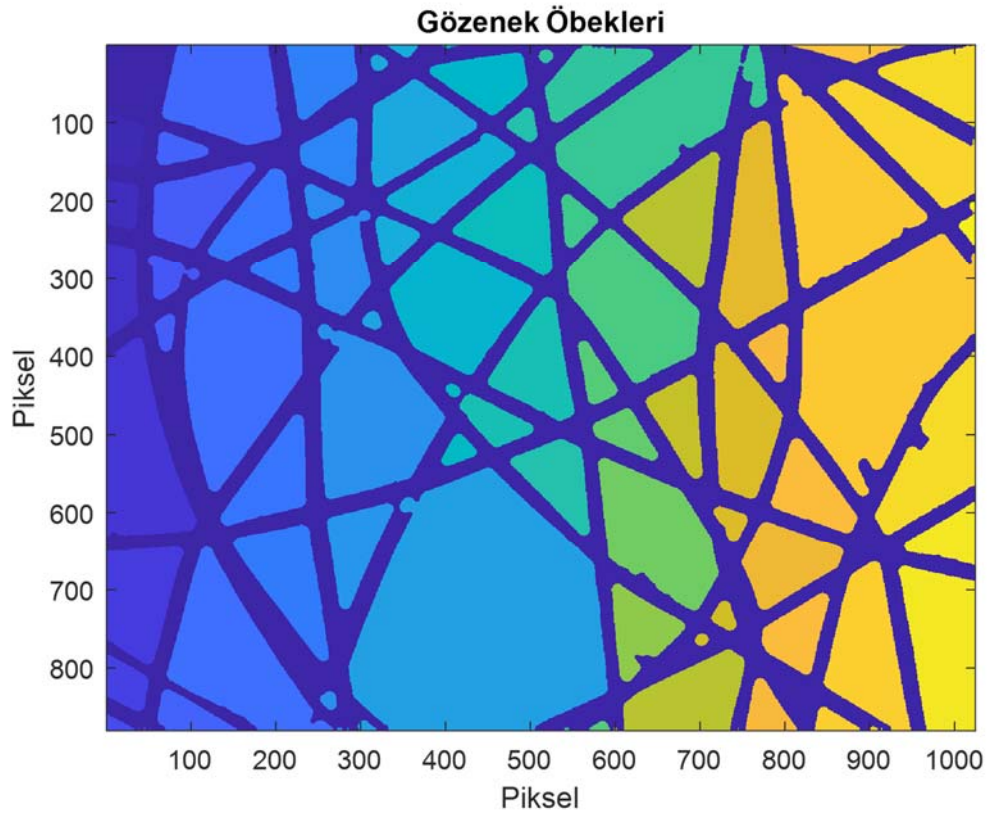
13)



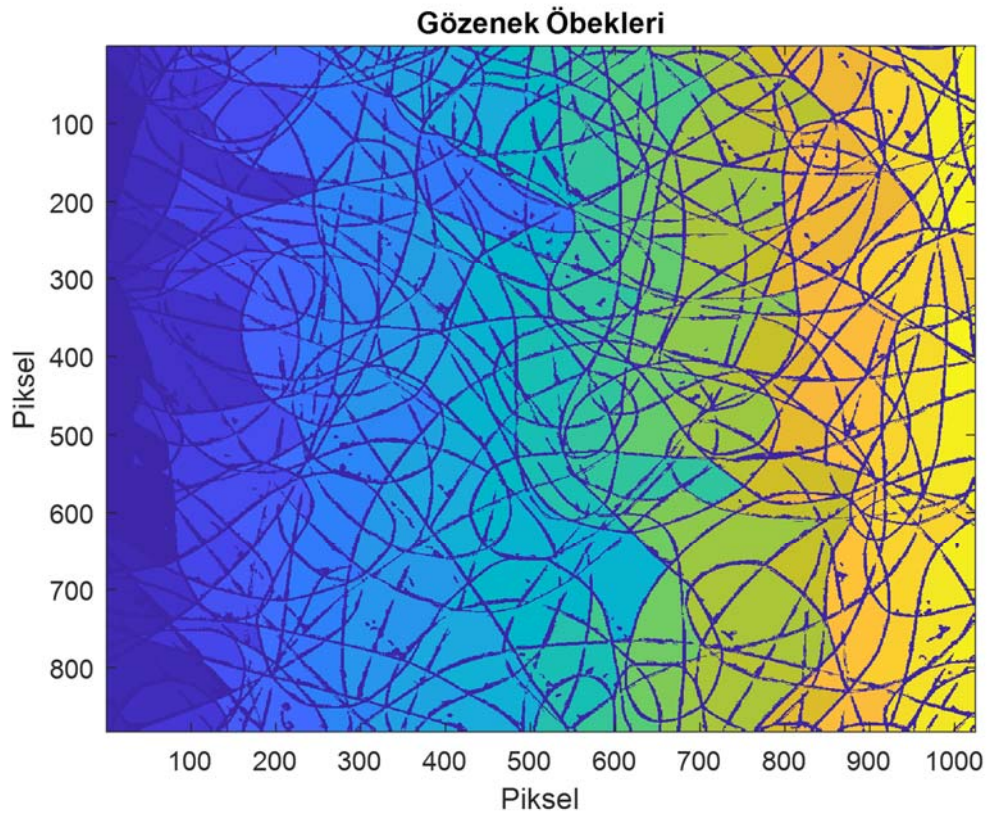
14)



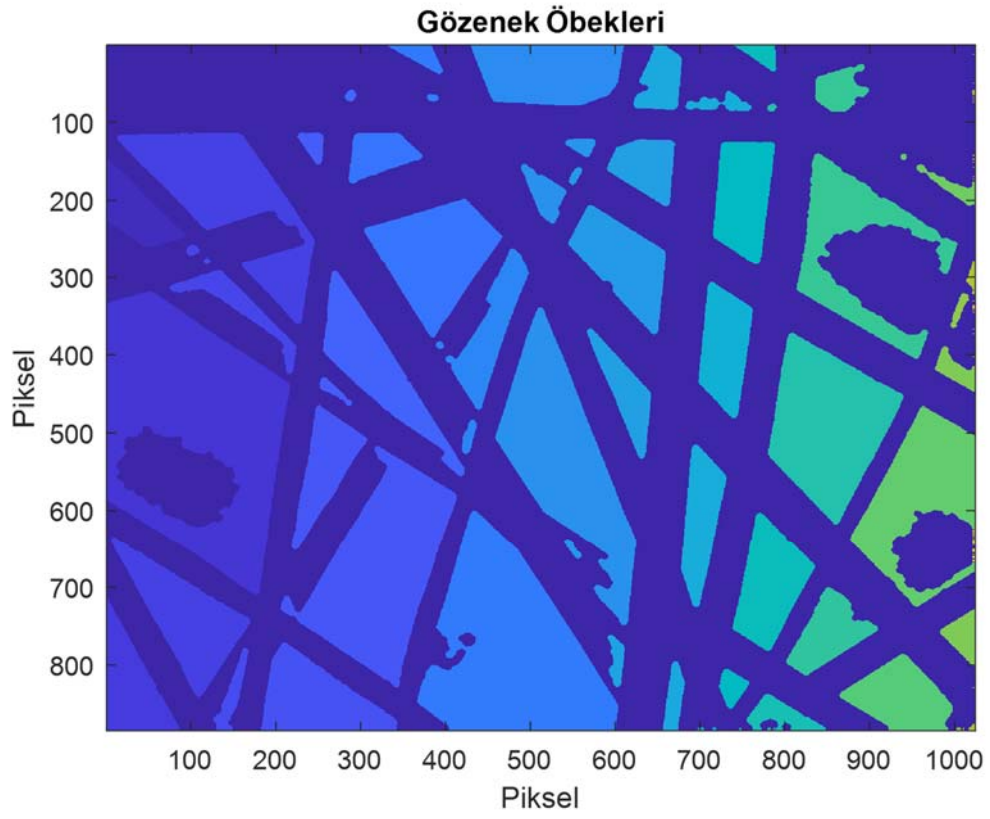
15)



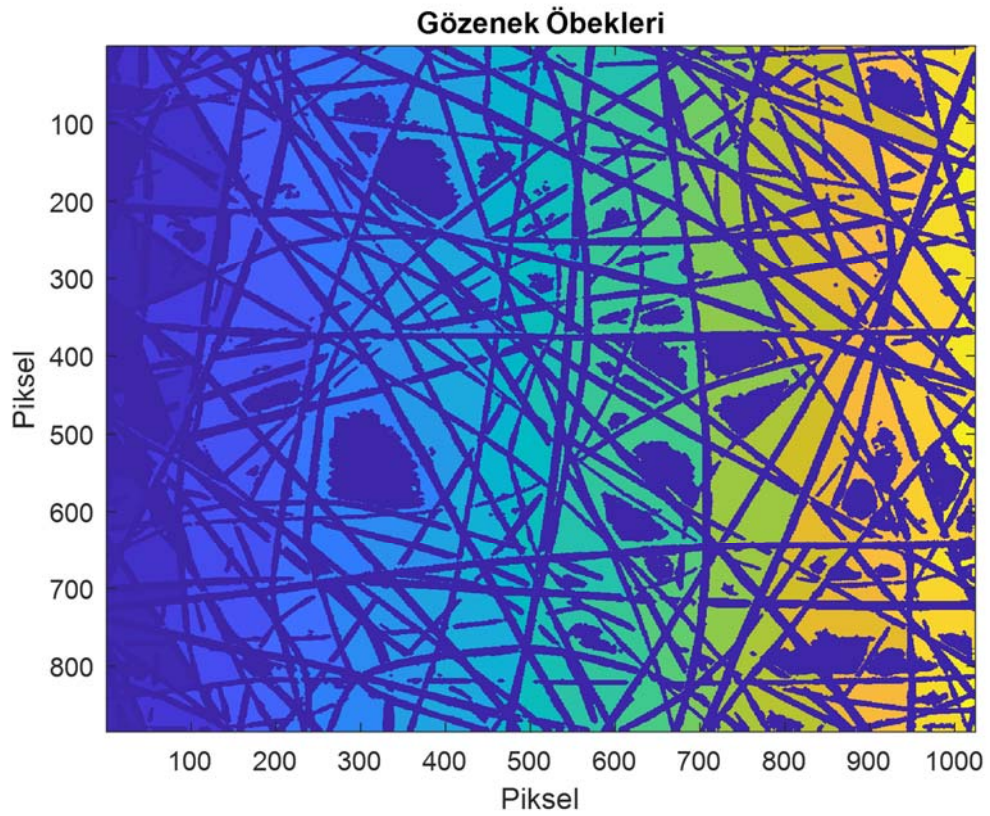
16)



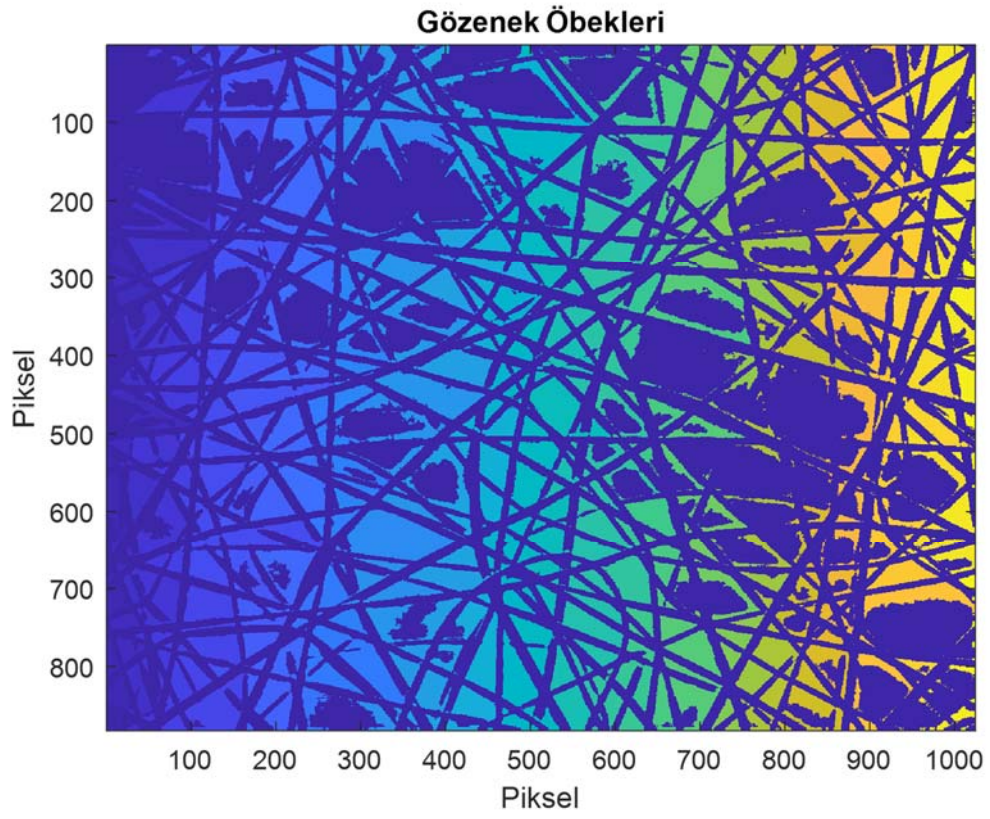
17)



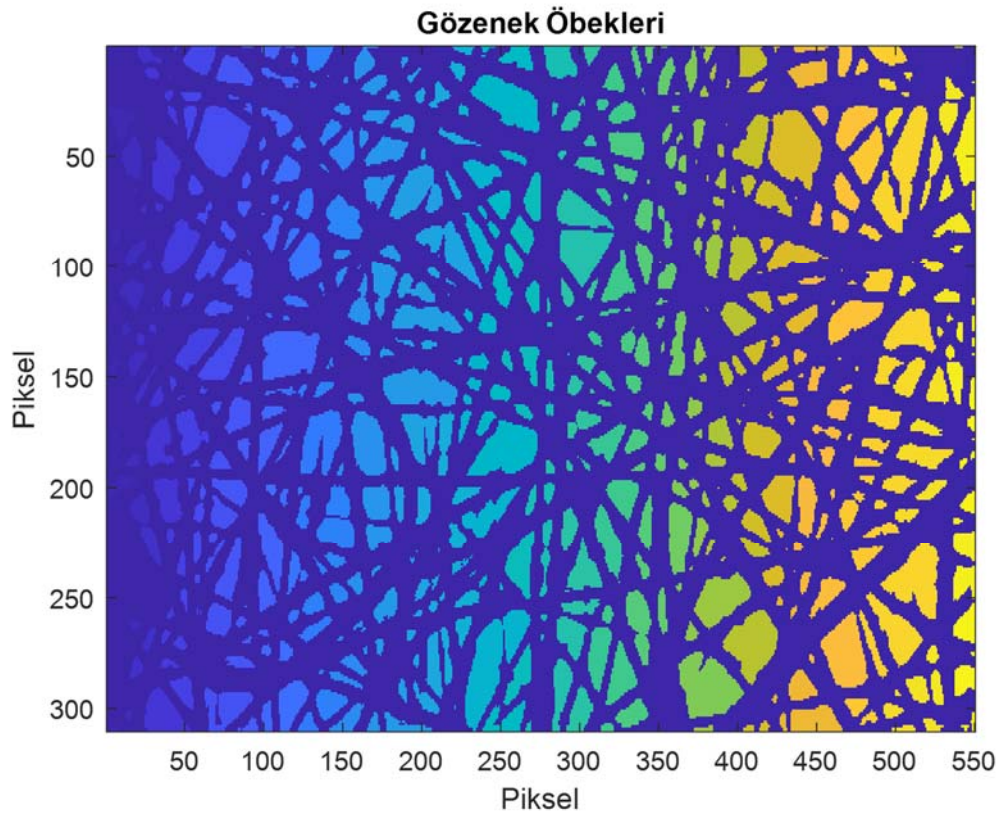
18)



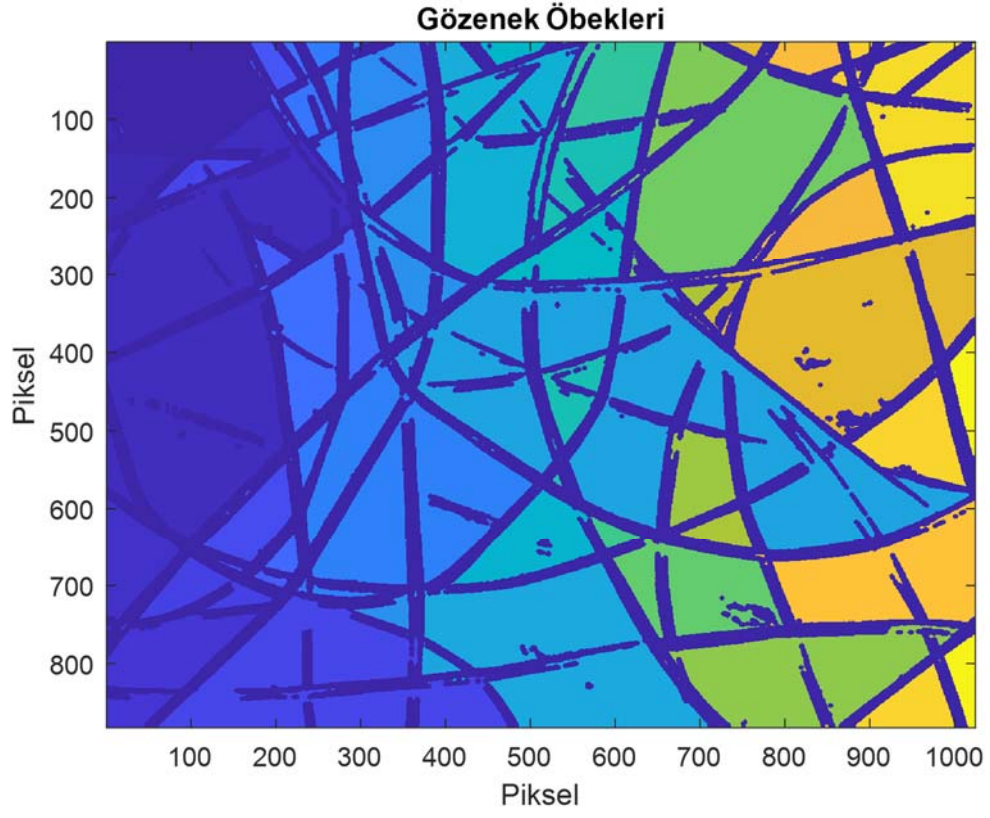
19)



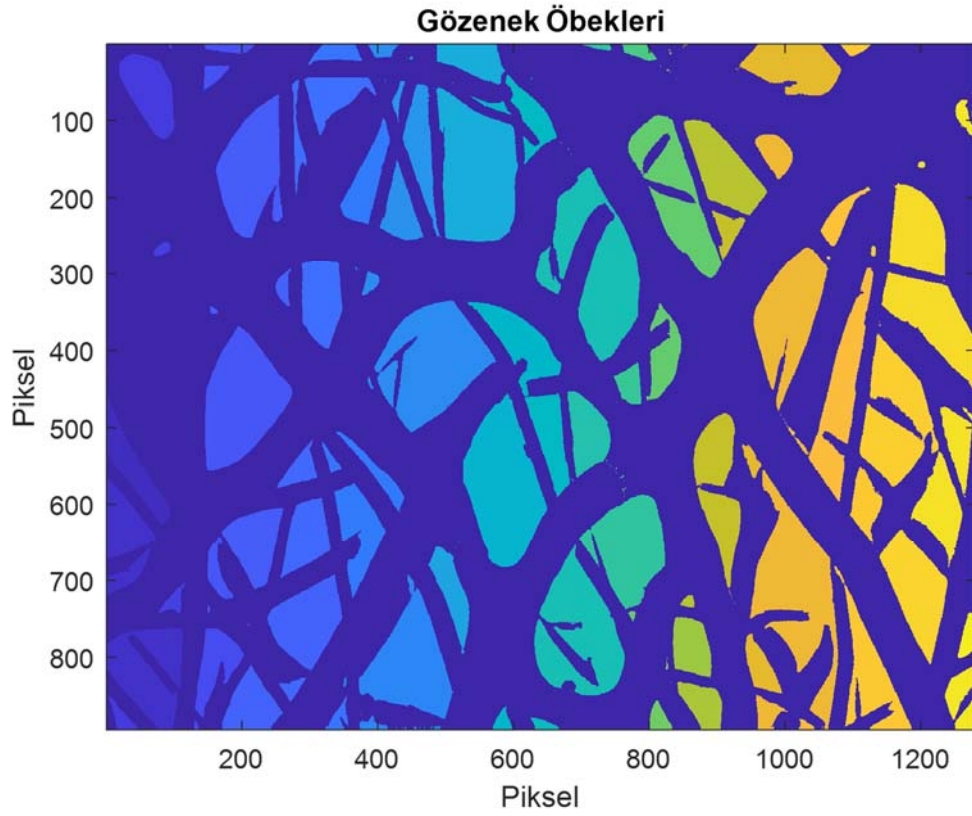
20)



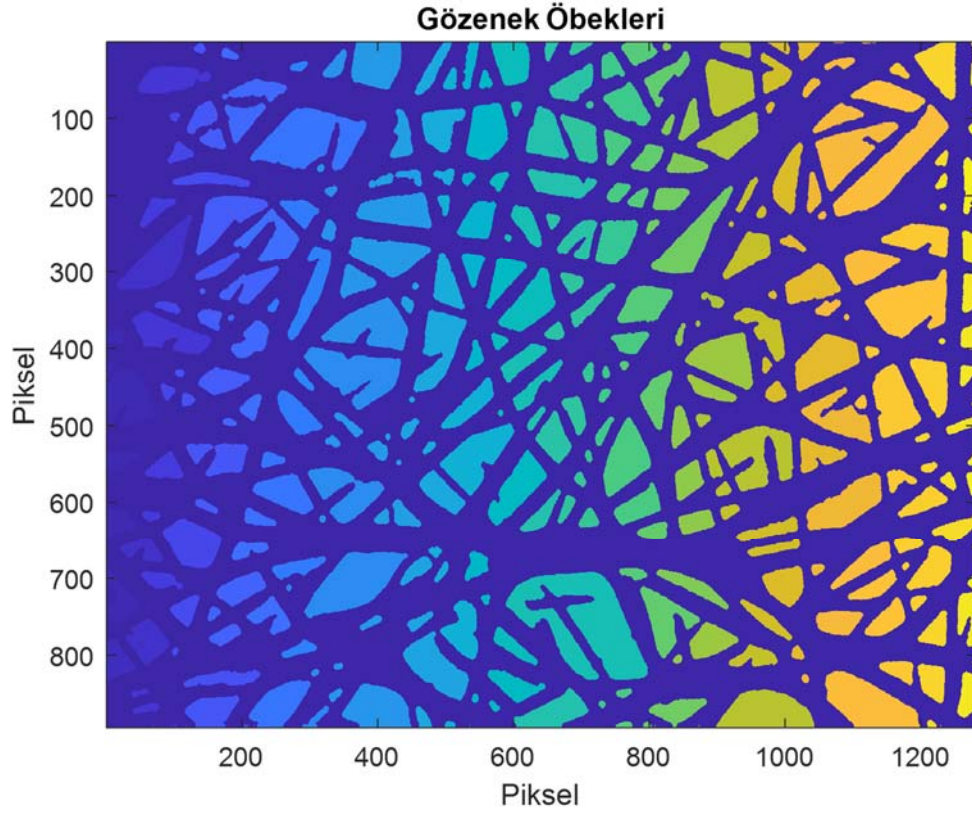
21)



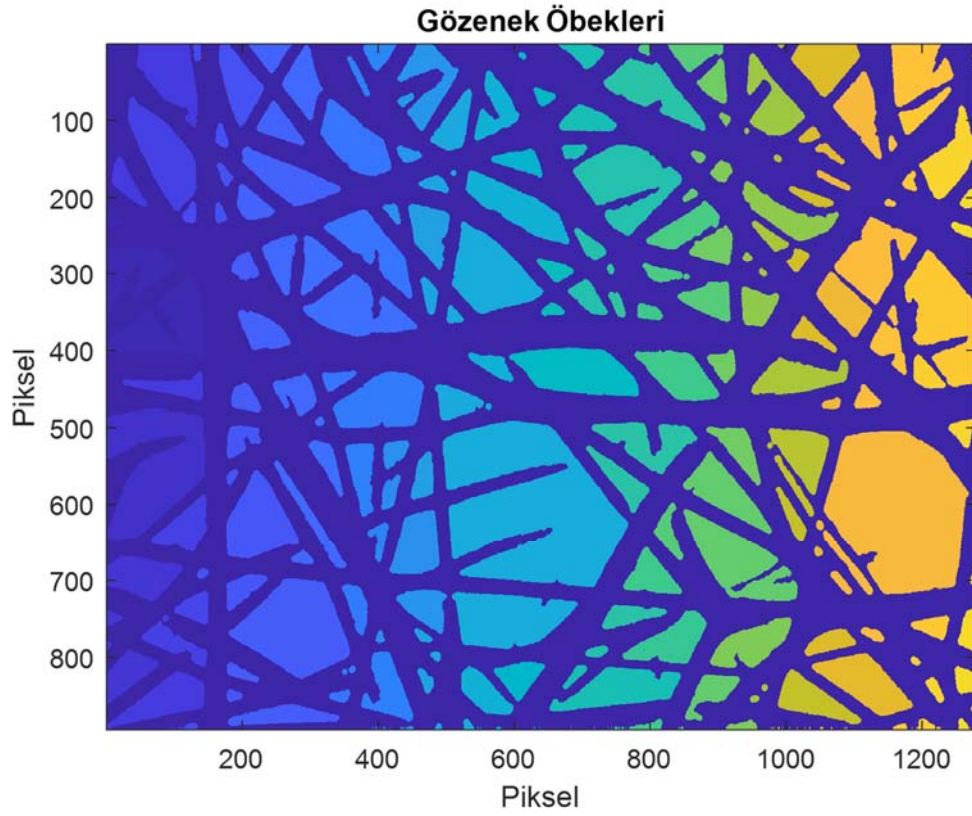
22)



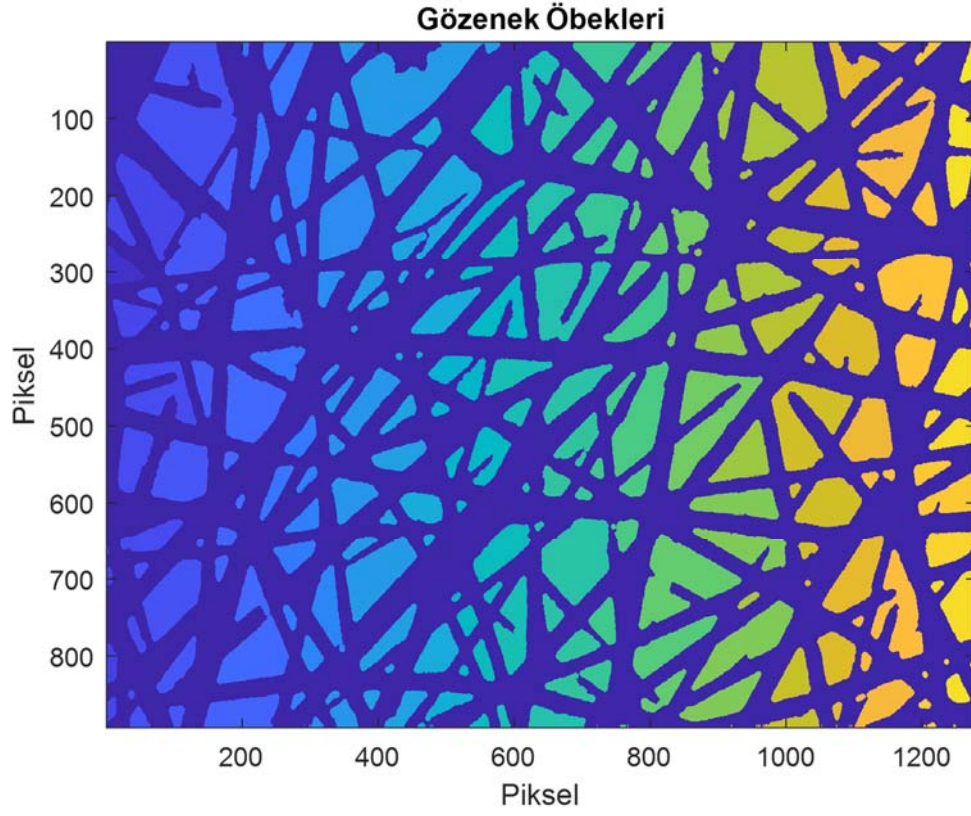
23)



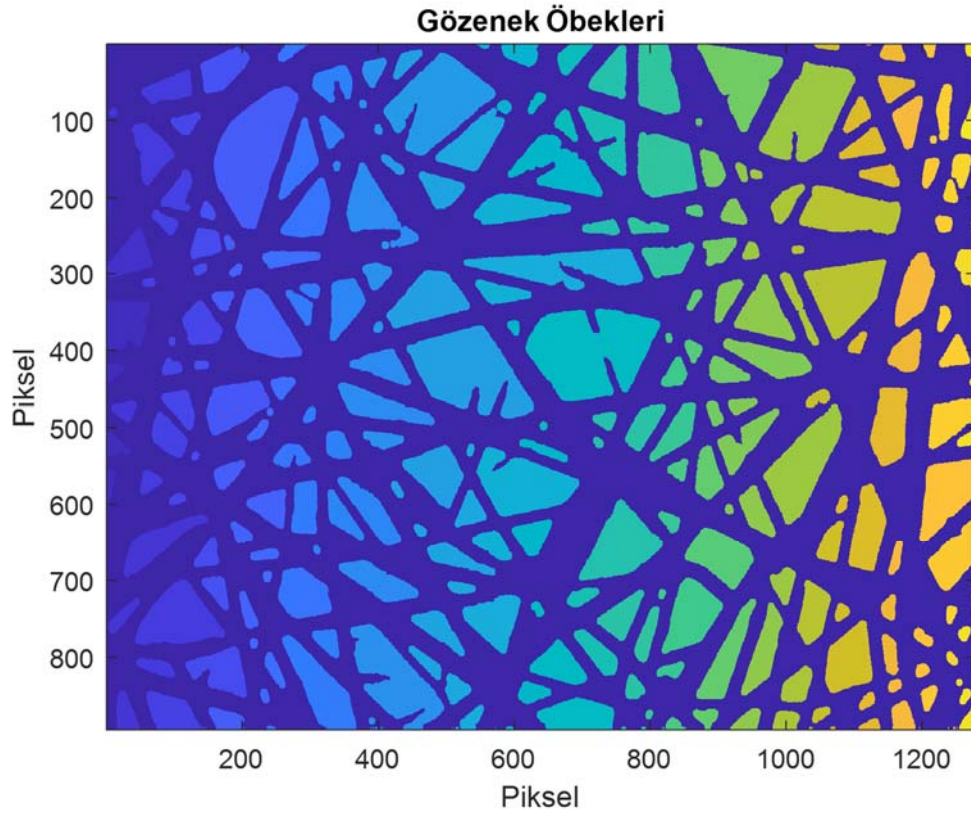
23)



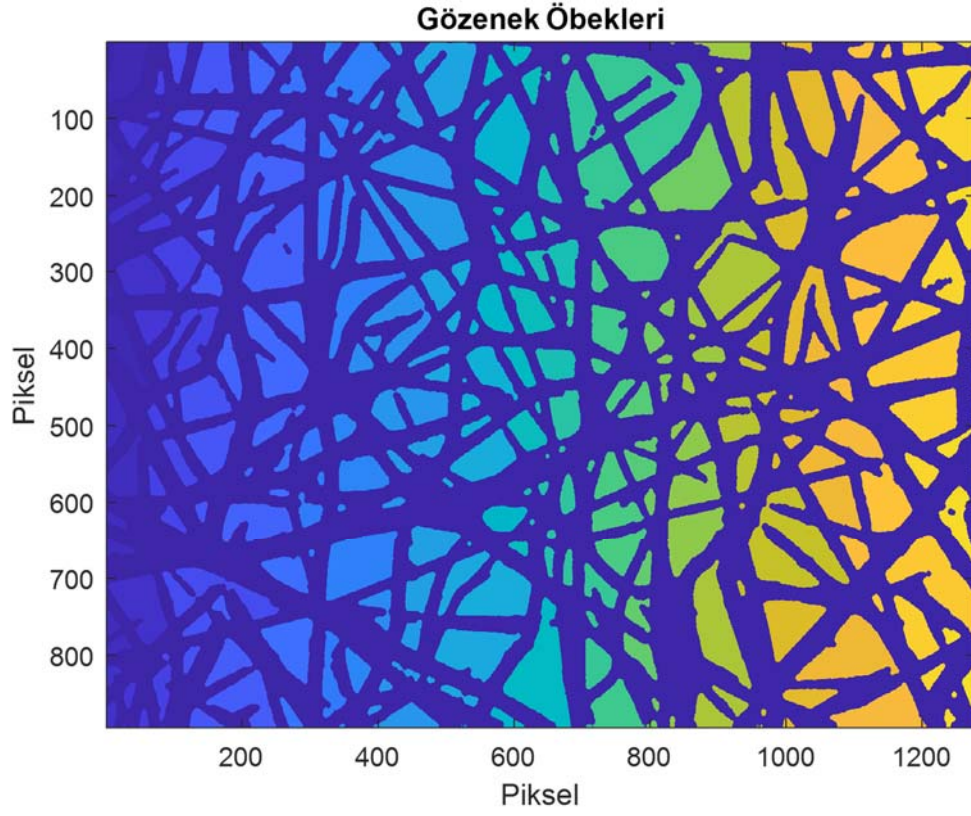
25)



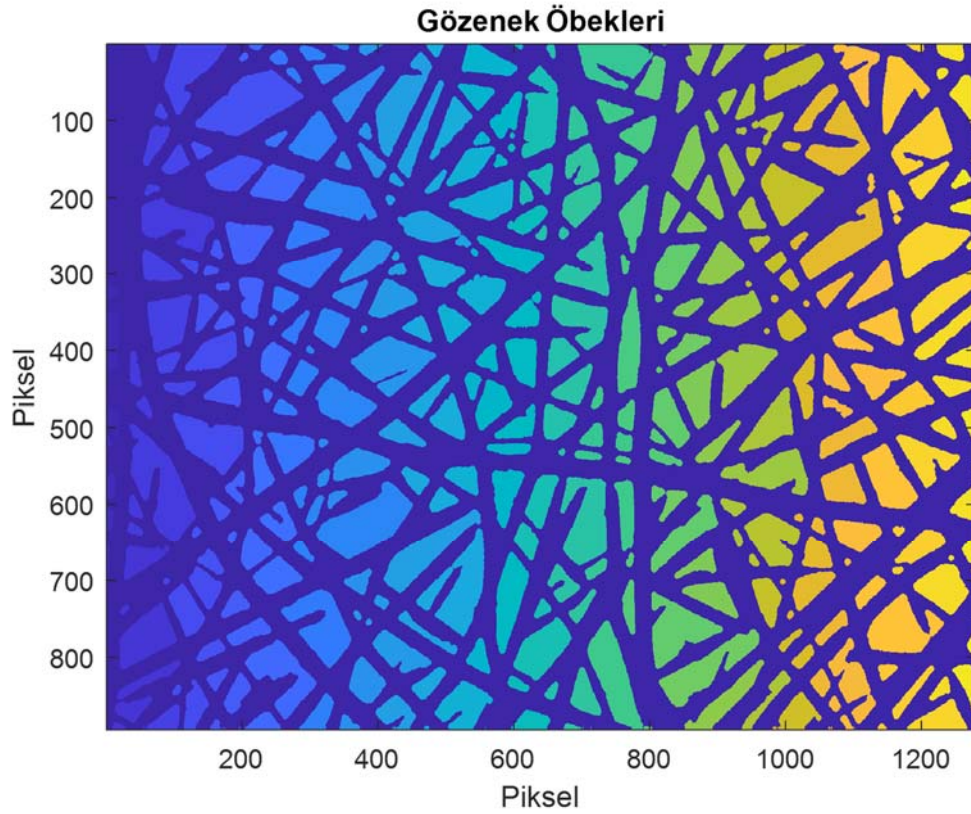
26)



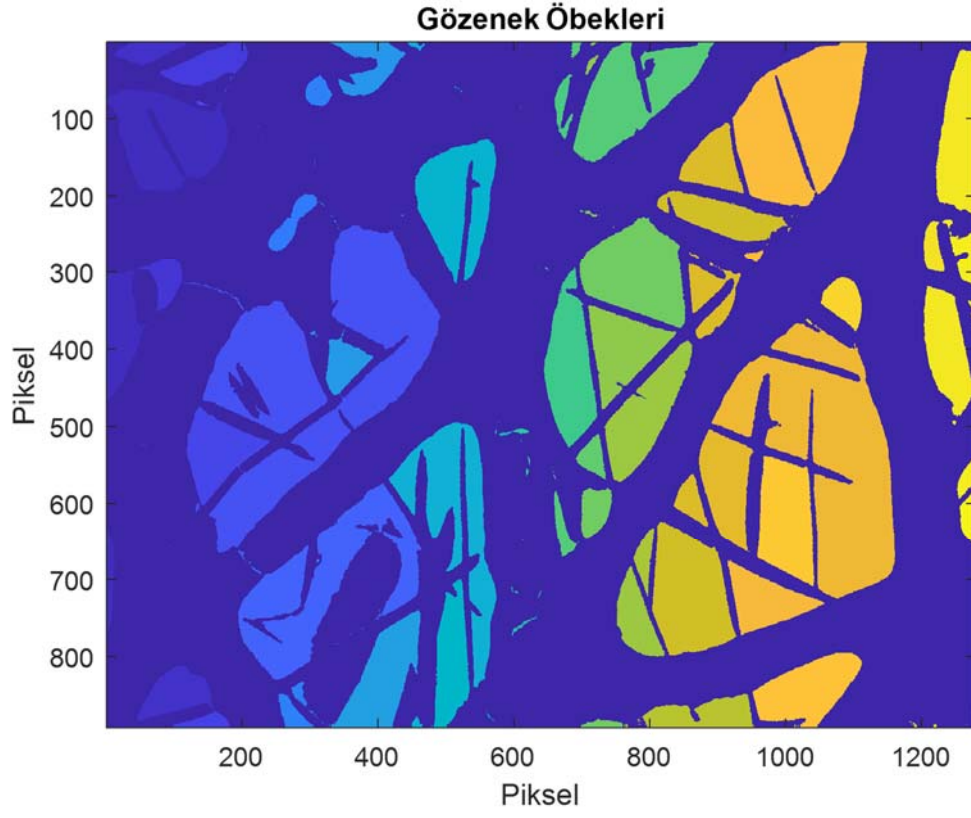
27)



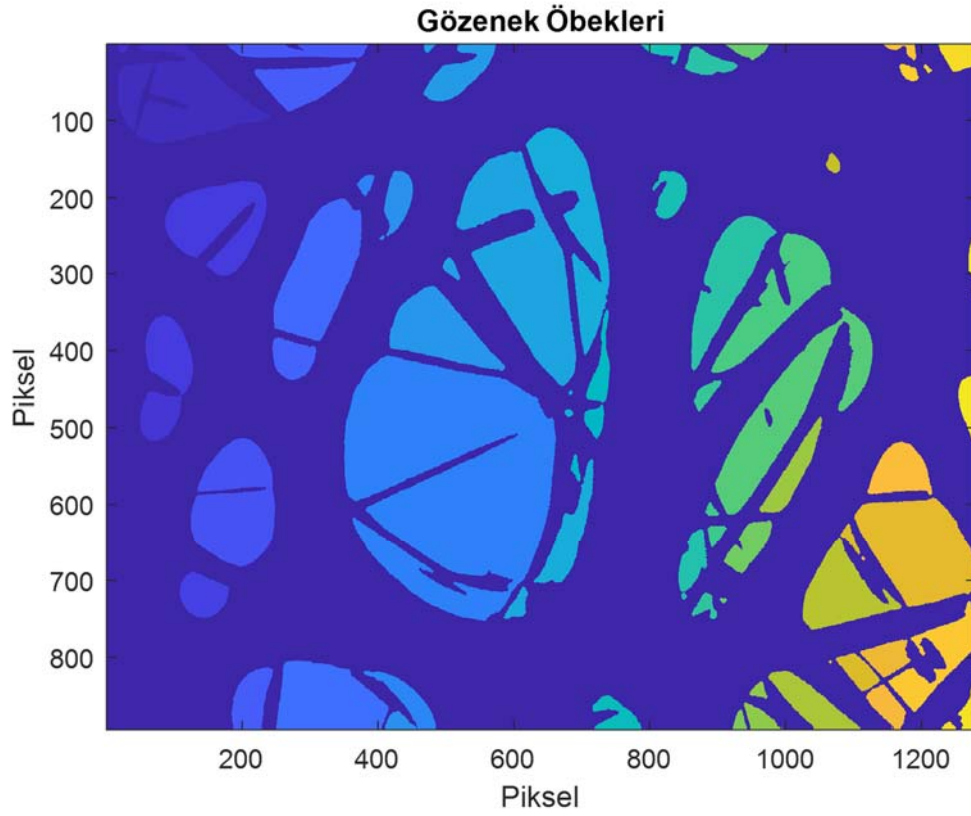
28)



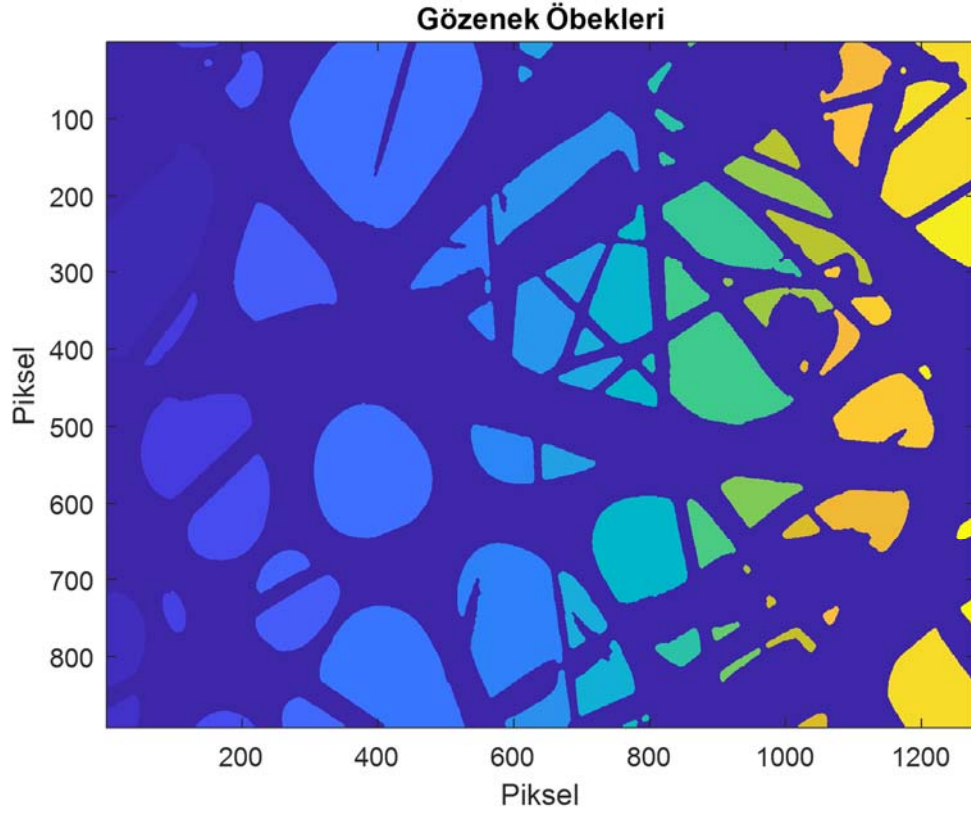
29)



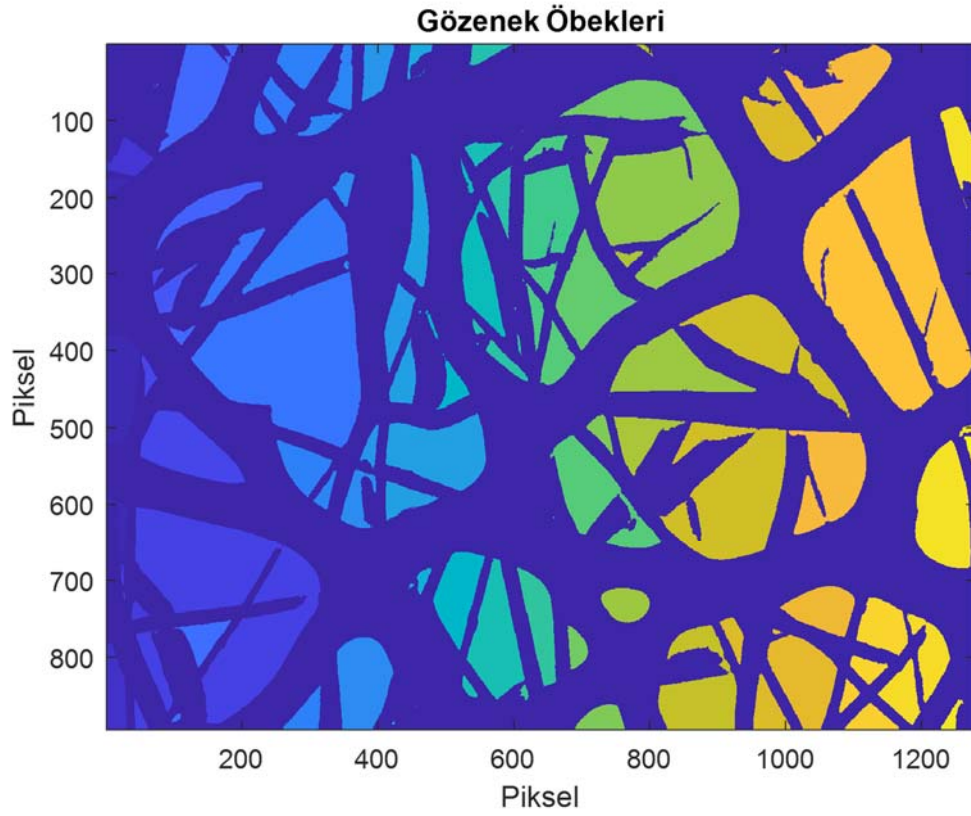
30)



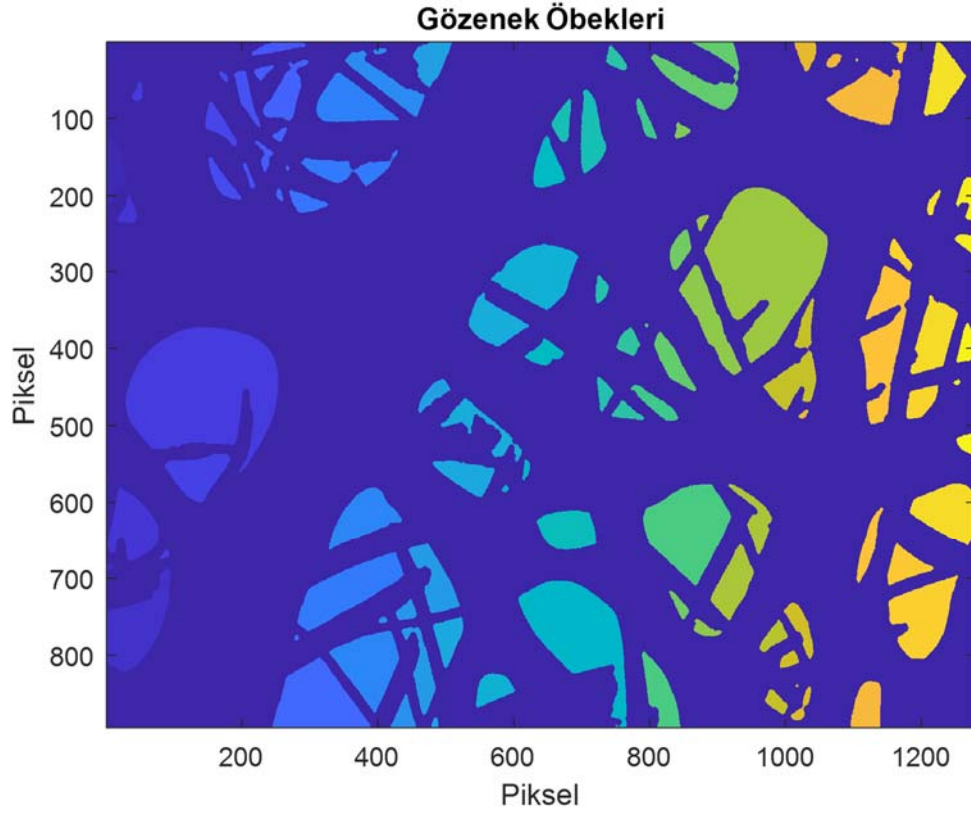
31)



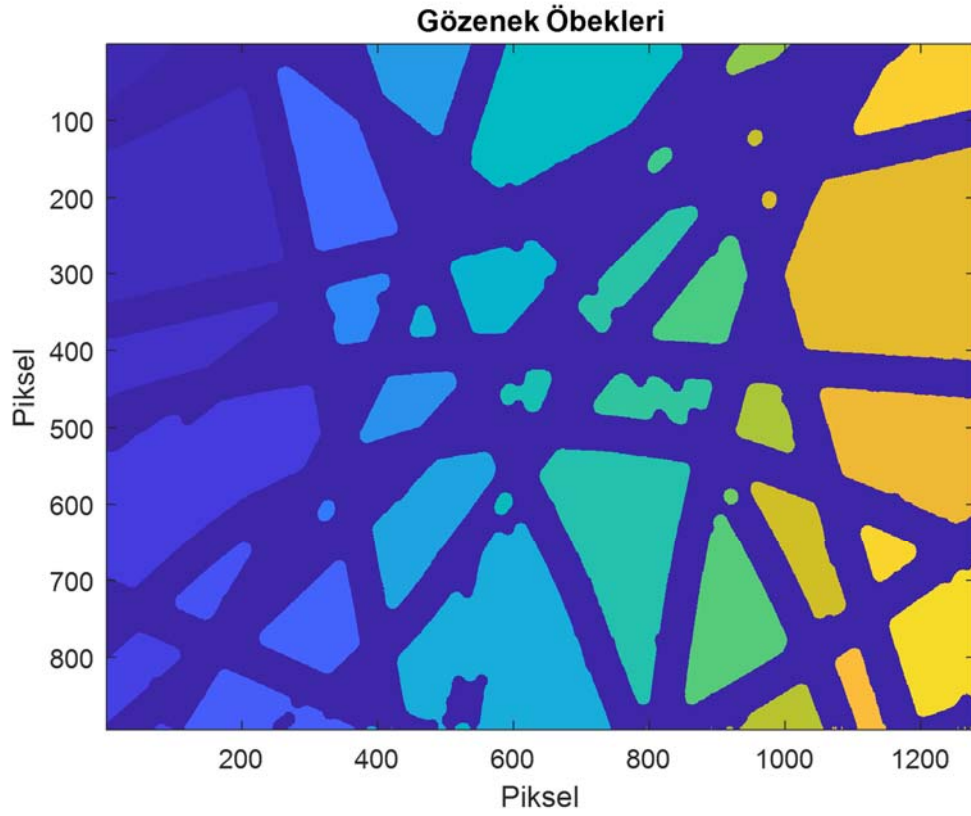
32)



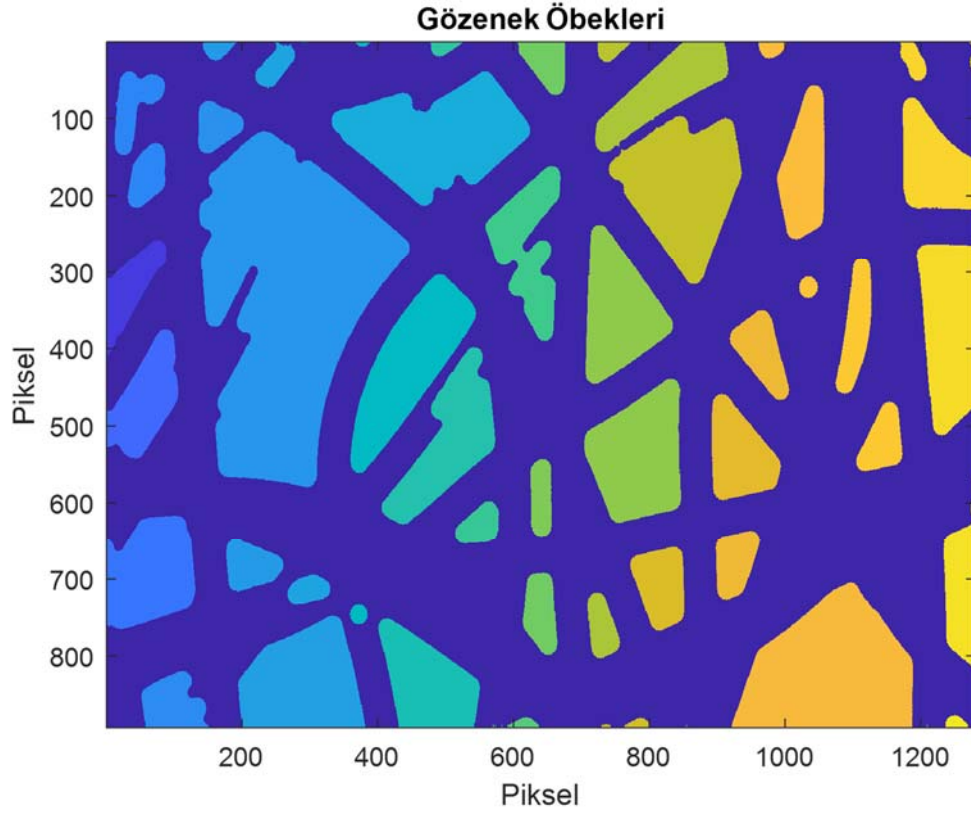
33)



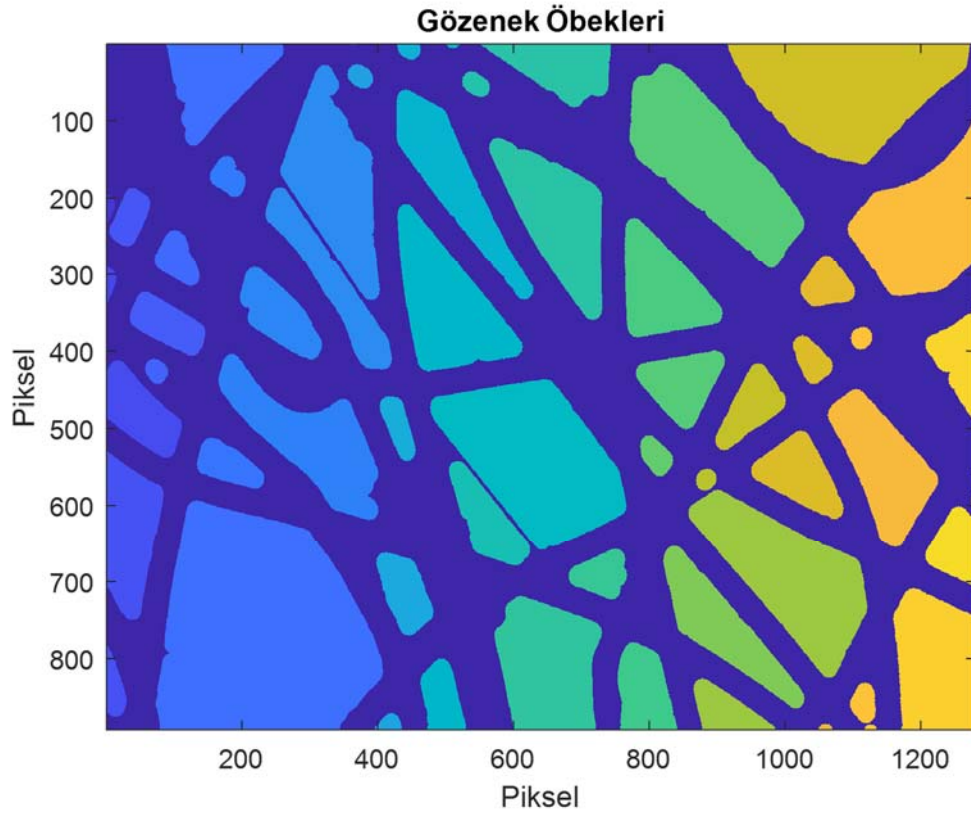
34)



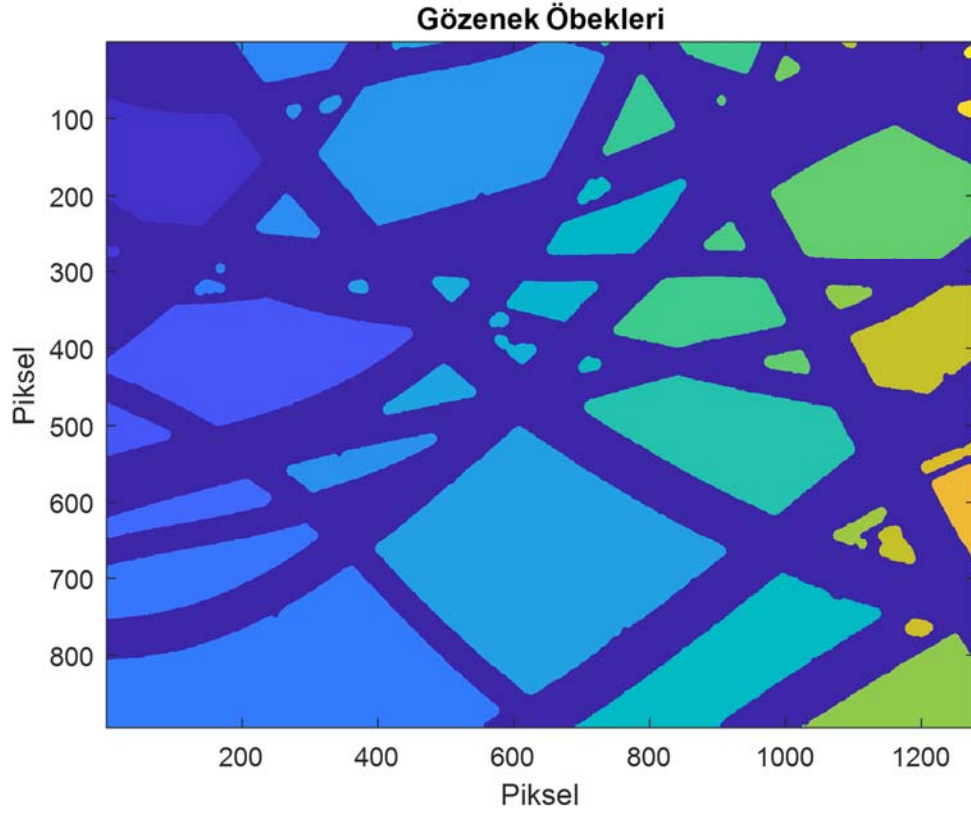
35)



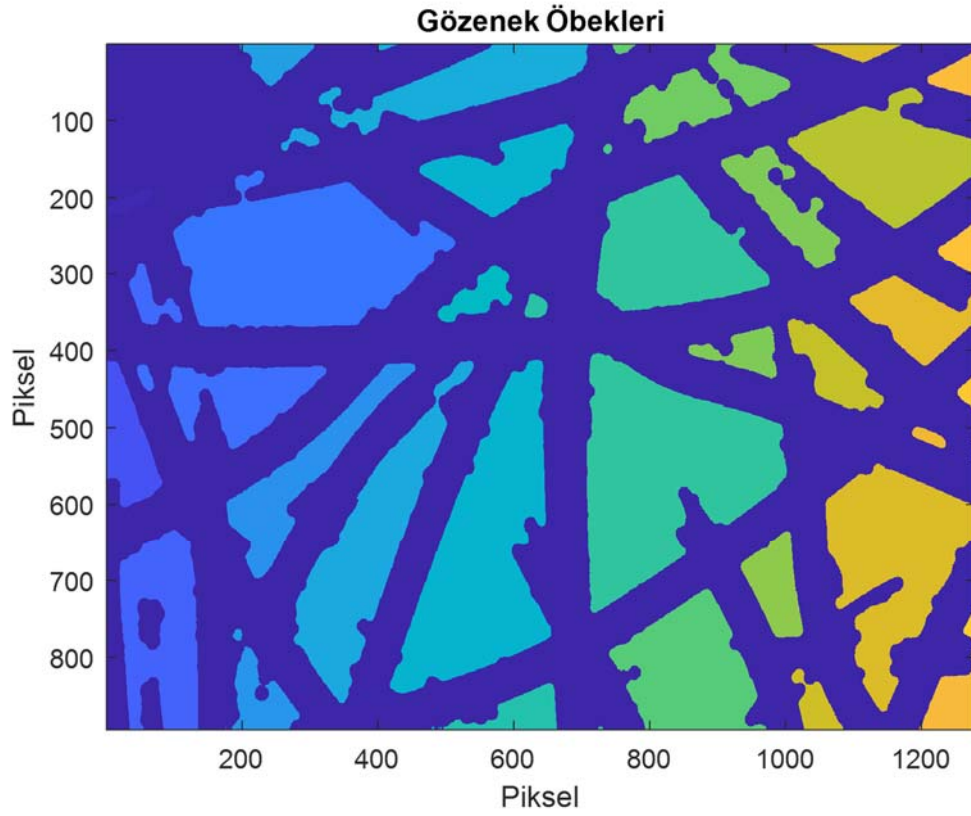
36)



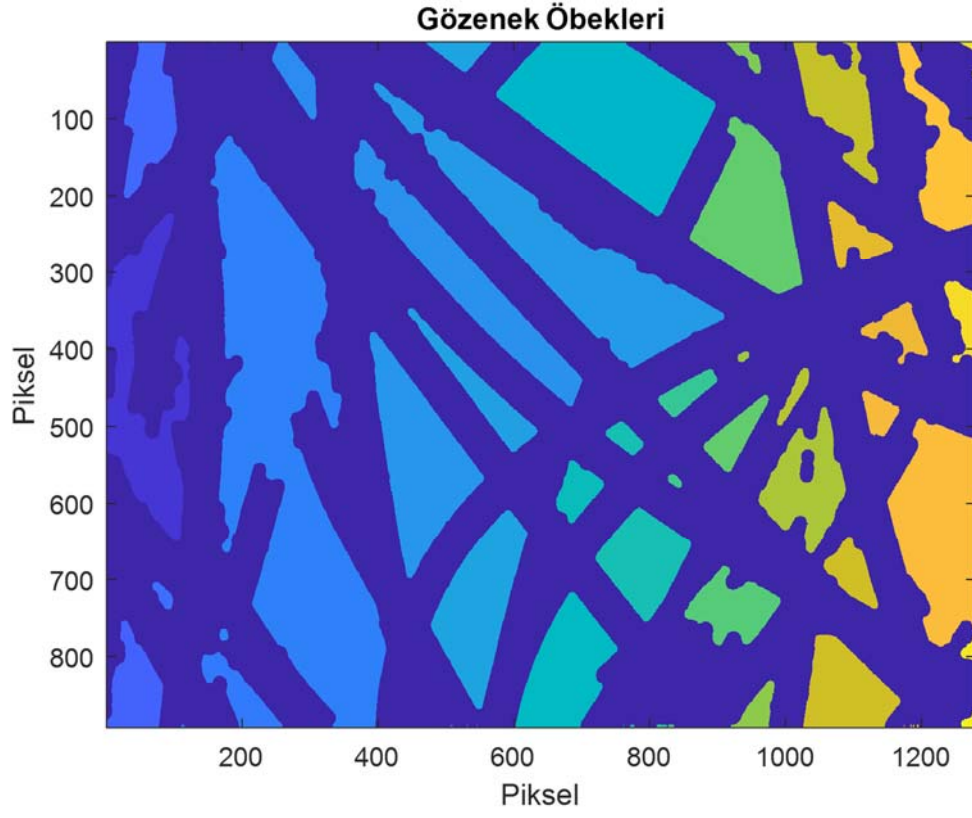
37)



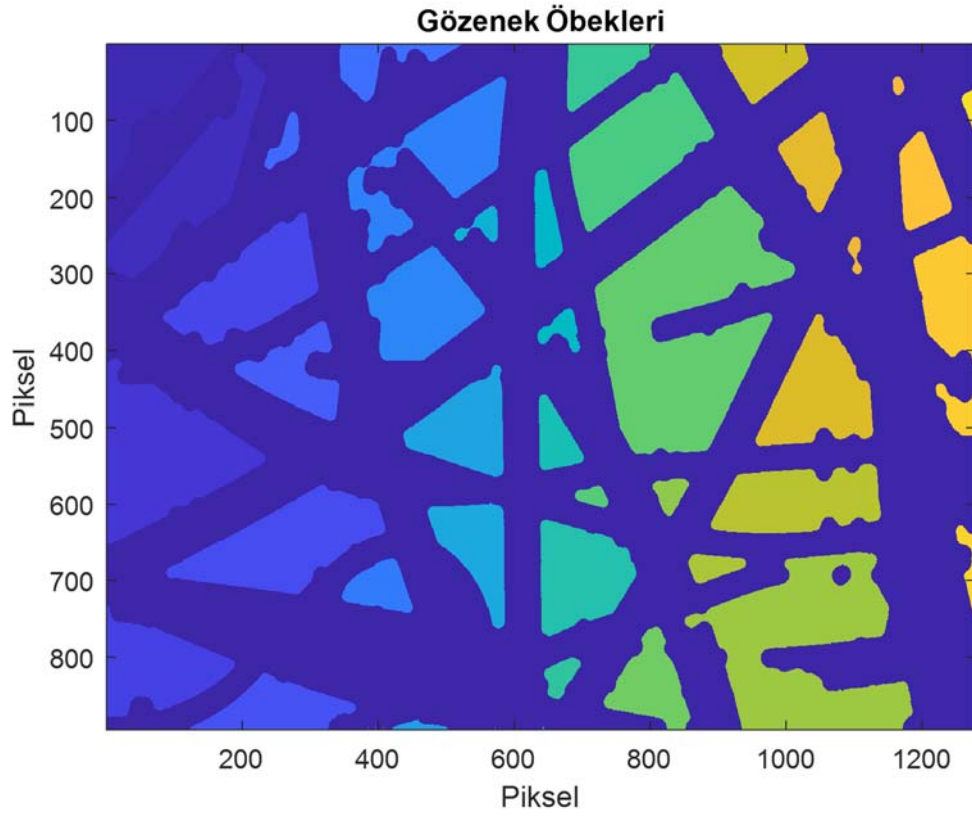
38)



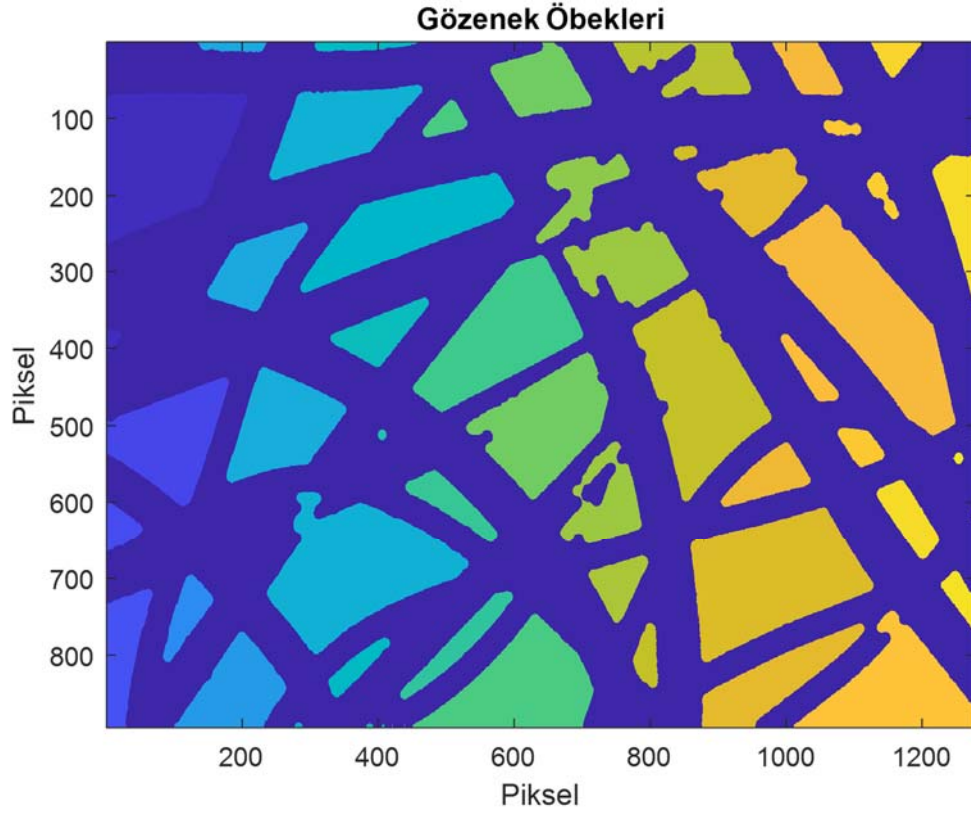
39)



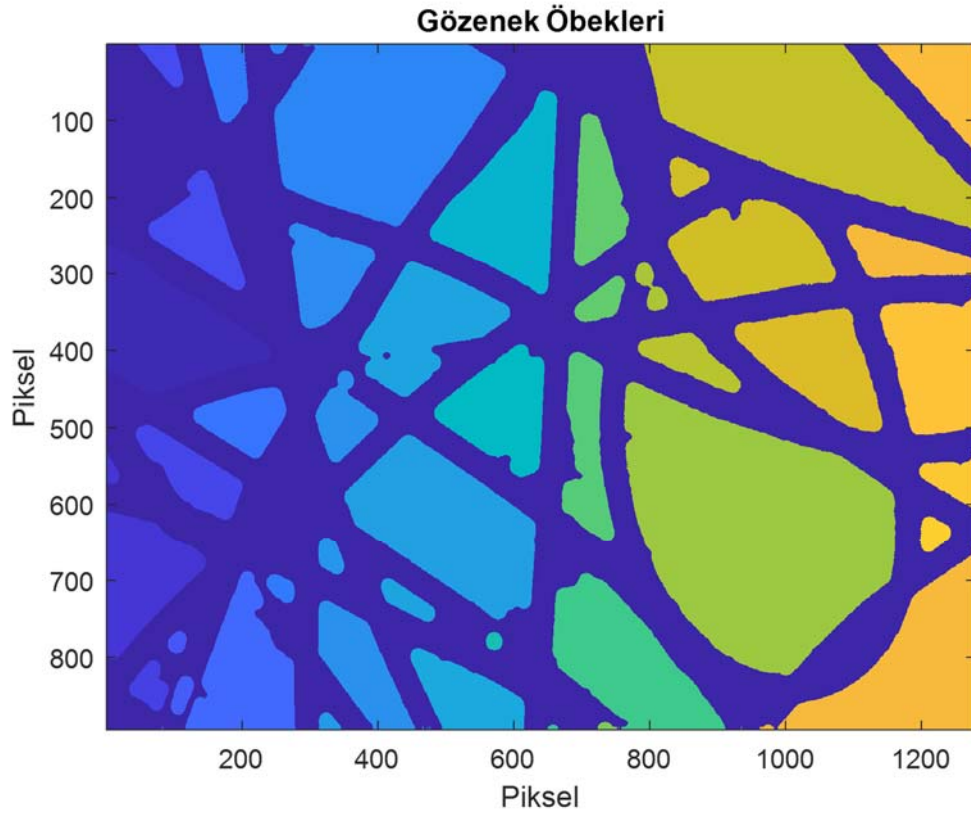
40)



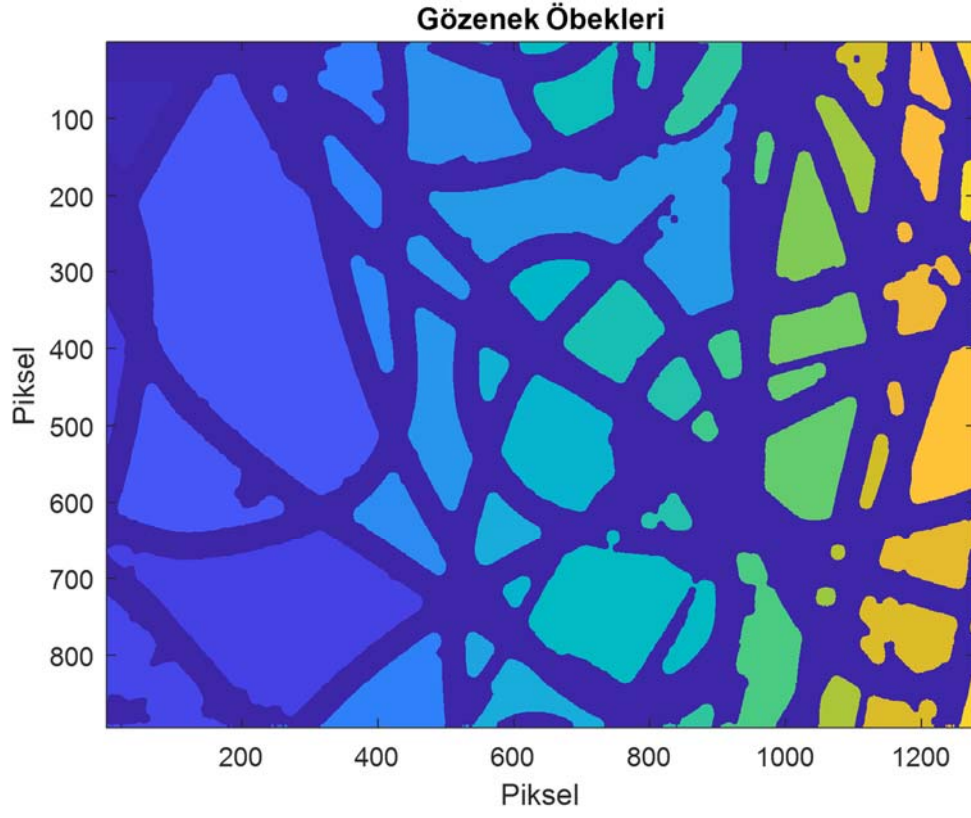
41)



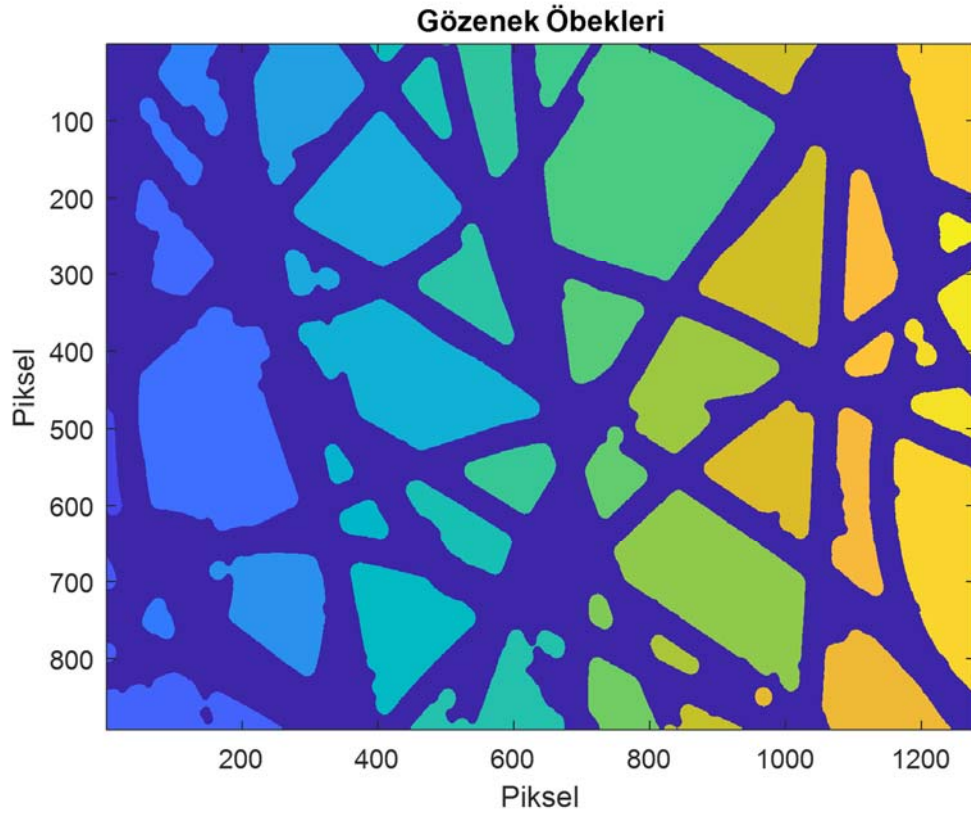
42)



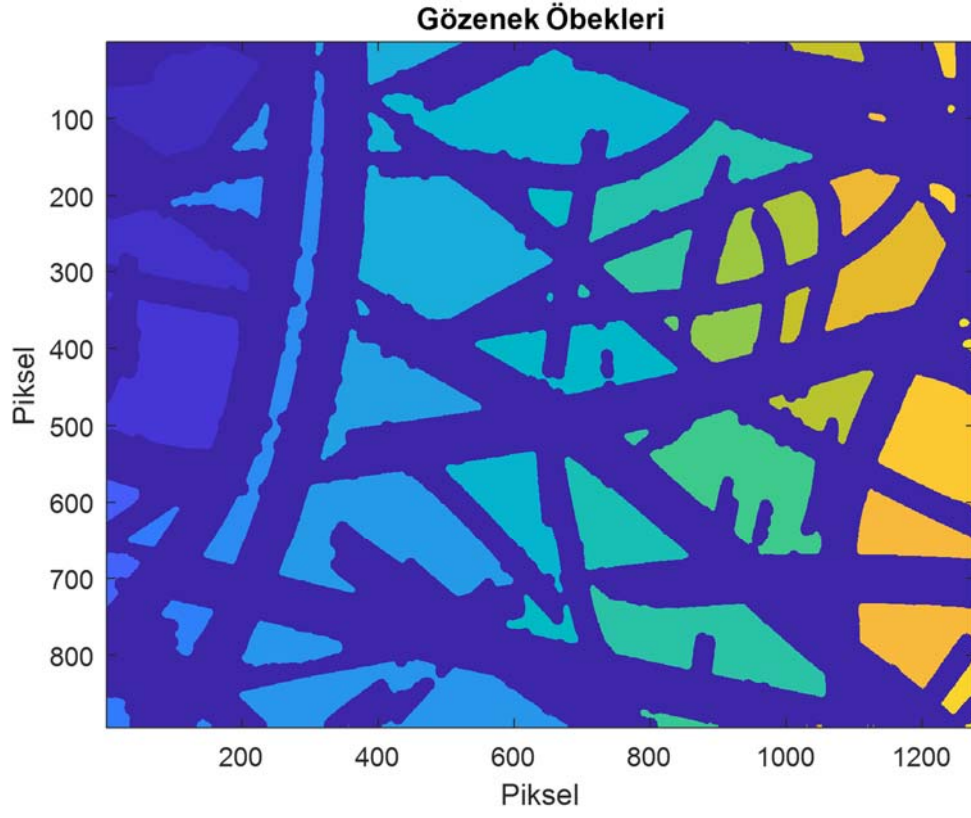
43)



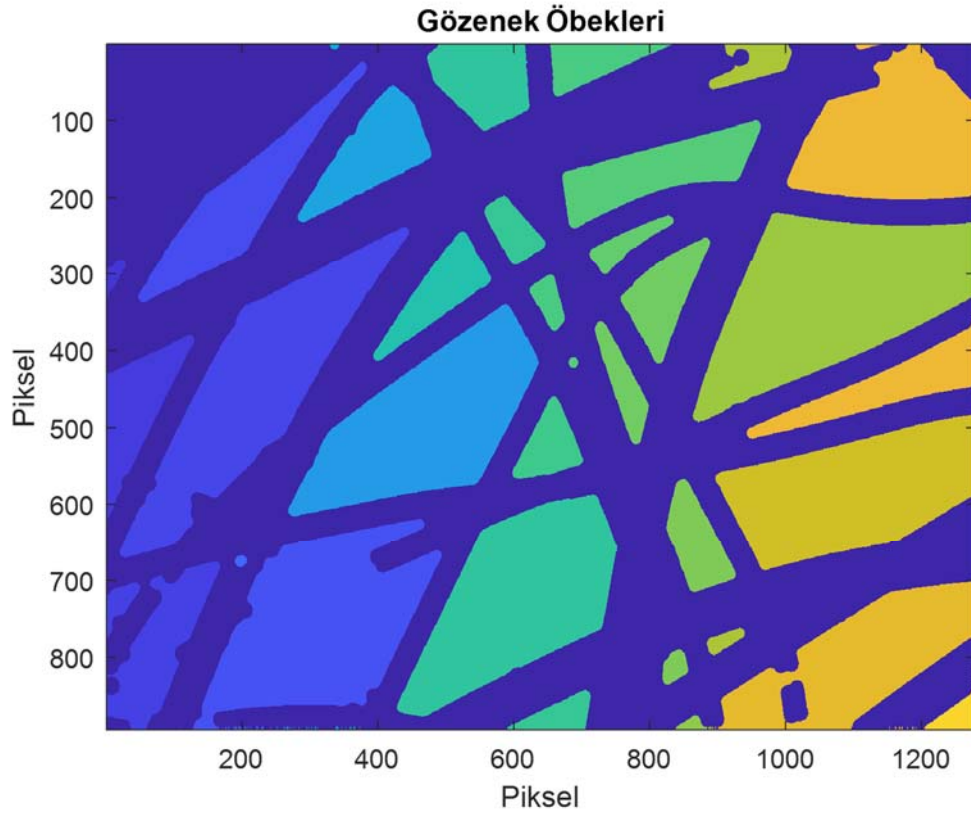
44)



45)



46)



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tansel Uyar
Doğumyeri : Ankara
Medeni Hali : Bekar
E-Posta : tuyar[at]baskent.edu.tr



Eğitim

Lisans : Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce Yökdil (Fen Bilimleri): 80, Kasım 2017

İş Deneyimi

2010-2018 Araş. Gör. Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği

Deneyim Alanları

Biyomalzemeler
Görüntü İşleme
Yazılım geliştirme

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Uyar T., Erdamar A., Gümüşderelioğlu M., Akşahin M.F., Irmak G., Eroğul O. (2018, May). Segmentation of Live and Dead Cells in Tissue Scaffolds.

In Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU), 2018 26th (pp. 1-4). IEEE.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. Uyar T, Gümüşderelioğlu M, Demirtaş T.T, Irmak G, Erdamar E, Akşahin M.F, Eroğul O, Automatic detection of MC3T3 proliferation on confocal laser scanning microscope images by using image processing techniques, BIOMED 2015, Türkiye, Antalya, October 22-24 2015.
2. Uyar T, Erdamar A, Gümüşderelioğlu M, Akşahin MF, Irmak G, Eroğul O, “Doku İskelesindeki Canlı ve Ölü Hücrelerin Bölütlenmesi”, SIU2018, Türkiye, İzmir, May 2-5 2018.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 31/07/2018

Tez Başlığı / Konusu: Doku Mühendisliğinde Malzemeye ve Hücresel Özelliklere Ait İmgelerin Görüntü İşleme Teknikleri ile Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 106 sayfalık kısmına ilişkin, 31/07/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

31/07/2018

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Tansel Uyar

Öğrenci No: N12144864

Anabilim Dalı: Biyomühendislik Anabilim Dalı

Programı: Biyomühendislik Doktora

Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioglu

(Unvan, Ad Soyad, İmza)