

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HİSTOLOJİK DOKU KESİTİ
GÖRÜNTÜLERİNDE REFERANS DOKUYA
DAYALI NORMALİZASYON**

SELEN ZENGİN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HİSTOLOJİK DOKU KESİTİ
GÖRÜNTÜLERİNDE REFERANS DOKUYA
DAYALI NORMALİZASYON**

UZMANLIK TEZİ

SELEN ZENGİN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. SÜLEN SARIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	ii
RESİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	3
GİRİŞ VE AMAÇ	5
GENEL BİLGİLER	7
MATERYAL VE METOD	12
SONUÇLAR.....	23
TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR.....	38

TABLO LİSTESİ

1. H&E boyanma sürecinde farklı kesitler için hematoksilen ve eozinin uygulanma süreleri
2. Van Gieson boyanma sürecinde farklı kesitler için FeH ve pikrofuksin uygulanma süreleri
3. CD34 boyanma sürecinde farklı kesitler için antikor dilüsyonları ve uygulanma süreleri
4. Tüm boyalar için kullanılan toplam görüntü sayıları
- 5a. H&E boyalı karaciğer görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin hematoksilen için semikantitatif skorları
- 5b. H&E boyalı karaciğer görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları
- 6a. H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş karaciğer görüntülerinin hematoksilen için semikantitatif skorları
- 6b. H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş karaciğer görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları
- 7a. H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin hematoksilen için semikantitatif skorları
- 7b. H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları
8. CD34 boyalı kolonik submukoza görüntülerinin semikantitatif skorları
9. CD34 boyalı plasenta görüntülerinin semikantitatif skorları
10. Hematoksilen eosin boyalı kolonik mukoza görüntülerinin hematoksilen için MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması
11. Hematoksilen eosin boyalı kolonik mukoza görüntülerinin eozin için MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması
12. CD34 boyalı plasenta görüntülerinin MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması

RESİM LİSTESİ

1. Test kesitlerinin şematik görünümü
2. H&E boyaması, standart kontrol doku görüntüsü ve örnek doku görüntüsü kolon normal mukozası
3. H&E boyaması, standart kontrol doku görüntüsü sirotik karaciğer ve örnek doku görüntüsü kolon normal mukozası
4. Van Gieson boyaması, standart kontrol doku görüntüsü sirotik karaciğer ve örnek doku görüntüsü kolon submukozası
5. CD34 boyaması, standart kontrol doku görüntüsü plasenta ve örnek doku görüntüsü kolon submukozası
- 6a. CD34 boyalı plasenta örneği görüntüsü
- 6b. CD34 boyalı plasenta örneği görüntüsünde DAB pozitif kahve renkli alanların seçimi

KISALTMALAR

H&E: Hematoksilen eozin

ÖDG: Örnek doku görüntüsü

sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü

dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü

aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü

KDG: Kontrol doku görüntüsü

sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü

aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü

MOD: Mean optik dansite

TOD: Toplam optik dansite

RGB: Red Green Blue

CIE: Commission Internationale de L'Eclairage: Uluslararası Aydınlatma Komisyonu

CMY(K): Cyan, Magenta, Yellow, Key (black) Color Space: Cam göbeği, Magenta, Sarı, Siyah Renk uzayı

TEŞEKKÜR

Öncelikle uzmanlık tezimin baştan sona her aşamasında beni destekleyen, bana önderlik eden ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bu süreci kendisi ile paylaşma şansına eriştiğim değerli tez hocam Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU' na,

Bu zorlu süreci kendileriyle paylaşma şansına eriştiğim, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdener ÖZER'e ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda hizmet veren, her biri birbirinden değerli tüm öğretim üyesi hocalarıma,

Kendileri ile çalışma, tecrübelerinden yararlanma şansına eriştiğim, ancak yakın zamanda emekli olan, patolojinin değerli isimleri, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Şerafettin CANDAN, Prof. Dr. Uğur PABUÇCUOĞLU ve Prof. Dr. Aydanur KARGI'ya,

Tez sürecim boyunca bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen Yüksek Elektrik Elektronik Mühendisi Mustafa ŞAKAR ve Elektrik Elektronik Mühendisi Devrim ÖNDER' e,

Tezimin laboratuvar aşamasında yapmış oldukları katkılarından dolayı teknisyenlerimiz Ayşen ÇAYAN, Nalan OKAY ve Yahya Tufan ORHAN'a,

Asistanlığım süresince birlikte ağlayıp birlikte güldüğümüz çok sevgili asistan arkadaşlarıma,

Başka şehirde de olsalar, desteklerini hep hissettiğim annem Sema Seyrek, babam İsmail Seyrek ve kardeşlerim Handan Tıgılı ve Burak Seyrek' e,

Bu zorlu süreçte bana hep destek olan, yardımlarını esirgemeyen, sabırlı ve çok sevgili eşim Ahmet Zengin' e sonsuz teşekkür ediyorum.

Selen Zengin

İzmir,

2013

ÖZET

HİSTOLOJİK DOKU KESİTİ GÖRÜNTÜLERİNDE REFERANS DOKUYA DAYALI NORMALİZASYON

Dr. Selen Zengin

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

selenseyrek@hotmail.com

Amaç: Bu çalışmada, kontrol doku görüntüleri (KDG) farklılıklarına bağlı olarak histogram transferi ile renk düzeltilmesi yapılması ve bu yaklaşımın performansının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: CD 34 ile boyanmış plasenta ve tümörlü kolon kesit görüntüleri, kontrol doku görüntüsü (KDG) ve/veya örnek doku görüntüleri (ÖDG) olarak kullanılmıştır. Otuz altı görüntüden bir tanesi standart boyanmış bir görüntü iken (standart boyalı kesit görüntüleri: sKDG ve sÖDG) diğerleri farklı süre ve dilüsyonlarda hazırlanmış kesit görüntüleridir. Van Gieson (20 preparat) ve Hematoksilen Eozin (H&E) (20 preparat) boyaları için ise sirozlu karaciğer ve kolon normal mukoza dokuları kullanılmıştır. Normalizasyon uygulanmaksızın, standart ışık altında ışık mikroskopuna bağlı CCD kamera ile çekilmiş dijital görüntüler bilgisayarda depolanmıştır. İki KDG arasındaki histogram farkını bulmak ve farkı ÖDG'ne transfer edip düzeltilmiş ÖDG (dÖDG) elde etmek için bilgisayar yazılımı hazırlanmıştır. sÖDG, ÖDG ve semikantitatif olarak iki gözlemci tarafından kör olarak skorlanmıştır ve ÖDG ile dÖDG skorları sÖDG skoru ile karşılaştırılmıştır. Kantitatif analiz için ise ÖDG, dÖDG ve sÖDG' nin ortalama optik dansite (MOD), toplam optik dansite (TOD) ve intensite (boyanan alan yüzdesi) değerleri, görüntü analizi programları ile hesaplanmıştır.

Bulgular: Toplam 474 görüntü elde edilmiştir. Semikantitatif skorlamada iki gözlemci için ağırlıklı Kappa (wKappa) 0.59 'dur (MEDCALC). Tüm görüntüler için, ÖDG'nin %23.5' unun semikantitatif skoru ile sÖDG'nin semikantitatif skoru aynıdır ancak dÖDG için

%76.35'tir. CD34 ile boyalı plasenta görüntülerinde düzeltmeden sonra TOD ve intensite değerlerinde H&E görüntülerinde ise MOD ve TOD değerlerinde düzelme olmuştur.

Sonuç: İlk kez uygulanan KDG'ne dayalı histogram transferi, görüntülerin renk standardizasyonu için değerli bir araç olarak görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Renk normalizasyonu, histogram transferi, kontrol doku görüntüsüne dayalı renk düzenleme

ABSTRACT

COLOR CORRECTION OF TISSUE SECTION IMAGES BY HISTOGRAM TRANSFER ACCORDING TO CONTROL TISSUES

Selen ZENGİN, MD

Dokuz Eylul University School of Medicine Department of Pathology

selenseyrek@hotmail.com

Aim: In this study, we aimed to present a color correction method by histogram transfer depending upon control tissue image (CTI) differences and to evaluate its performance.

Methods: Images from colon and placenta sections stained by anti-CD34 were used as CTI and/or sample tissue images (STI). Thirty-six slides but one (standard stained slide with images sCTI and sSTI), were stained for different durations and dilutions than the standard procedures. For H&E (20 slides) and Van Gieson (20 slides) stainings, colon and liver tissues were used. Digital images taken by a CCD camera connected to a light microscope without normalization was stored at a computer.

Software was prepared in order to find the histogram difference between two CTIs and transfer the difference to the STI for achieving a corrected STI (corSTI).

sSTI (one image) and STI and corSTI (for each images) were semiquantitatively scored by two observers in blind fashion and the STI and corSTI scores were compared with sSTI score. Also total optic density (TOD), median optic density (MOD) and intensity of images were calculated by software.

Results: Total number of images was 474. The wKappa was 0,59 for two observers (MEDCALC) for semiquantitative analysis. The STI semiquantitative score was same as the sSTI in 23,5% of the STI but this was 76,35% for corSTI. TOD and intensity values of CD34 stained placenta images and TOD and MOD values of H&E stained colonic mucosa images increased when these images were corrected.

Conclusion: It seems the novel approach of this study “histogram transfer depending upon CTIs” may be a valuable tool for color correction of tissue section images.

Key Words: Color normalization, histogram transfer, color correction according to control tissue image

GİRİŞ VE AMAC

Histolojik kesitlerin oluşumuna kadar tüm süreçte standart prosedür uygulanmalıdır. Ancak, birçok histopatoloji laboratuvarında, kesitler aynı yöntem ile boyansa da, birçok nedenden ötürü bu mümkün olamamaktadır (1). Bu problemin birçok bileşeni bulunmaktadır. Bunlardan biri, bu çalışmada tartışılması hedeflenmemiş olan doku takibi ve doku kesiti hazırlanması sürecidir. Bu çalışmanın hedefi, boyanma sürecinden kaynaklanan farklılıklardır. Histopatolojik kesitlerde görünüm boya yönteminden (süre, konsantrasyon, vb.) etkilenmektedir. İdeal bir ortamda aynı yöntemle boyanan bir kesitin her bir renk için intensitesi ve dansitesi eşit olmalıdır (1,2). Ancak özellikle farklı günlerde ya da farklı gruplar halinde yapılan boyamalarda bu elde edilememektedir. Bu sorunla histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerde karşılaşılmaktadır (2, 3). Bu problemi aşabilmek için bilgisayarlı görüntü geliştirme metodları geliştirilmiştir: segmentasyon, dekonvolüsyon, renk bileşenlerinin işlenmesi ve değerlerin seçilmiş bir kesitin özelliklerine ya da birden fazla kesitin ortalama değerine ya da dijital manuplasyona göre değiştirilmesi ile görüntünün yeniden oluşturulmasını kapsamaktadır (1-10).

Reinhard ve arkadaşlarının (6) yaptığı bir çalışmada bir görüntüden diğerine renk transferi metodu tanımlanmıştır. Bu yöntem ilk tanımlanmasında histopatoloji dışı görüntüler üzerinde uygulamalar yapılmışsa da daha sonraki uygulamalarda histopatolojik doku görüntülerinde çalışmalar vardır (2,10). Ancak bu çalışmalarda kontrol görüntüler referans alınmamış sadece bir görüntünün histogramı diğerine aktarılmıştır. Tüm bu metodlar görüntüler üzerinde iyileşmeler sağlasa da, daha sonraki bölümlerde tartışılacak olan bir takım kısıtlılıkları mevcuttur. Bu kısıtlılıklardan en önemlisi, tanıya ulaşmada önemli olan hiperkromazi ve /veya eozinofili gibi histopatolojik özelliklerin dansiteleridir. Ayrıca bu çalışmalarda, önerilen yaklaşımların performansını değerlendiren metodlar da standartlaşmış bir yöntemle değerlendirilmemiş olup performansları birbirleri ile karşılaştırılamamaktadır. .

Bu çalışmada, iki kontrol görüntünün histogram farkının araştırılan bir görüntüye transferine dayanan bir metod sunulmaktadır. Ayrıca metodumuzun performansı semikantitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Etik Kurul Kararı: Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından, 26.01.2011 tarihli, 15-GOA protokol numaralı, 2011/01-15 karar nolu yazı ile onaylanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Doku kesitlerini analiz edebilmek için, farklı biyolojik elemanlara seçici afinitesi olan boyalar kullanılır. Dokudaki madde bulunan alanlar boyanır ve ışığı emer. Emilen ışığın dışındaki dalga boylarında renk üretilir. Böylece, boyalı kesitler, mikroskop kullanılarak görünür hale gelir (1).

15. yüzyılda başlayan ve günümüze kadar gelen süre içinde rengin, ışığın taşıdığı bilgilerden biri, yani ışığın bir özelliği olduğu ve renk algılamamanın da görsel algılamamanın bir parçası olduğu ortaya konulmuştur. Renk, bulunulan yerle ilişkili veya geçici ışık özelliklerini içerir. Işık, gözün retinasının uyarılmasından kaynaklanan ve görsel algılamalar aracılığıyla bir gözlemcinin farkına vardığı ışıksal enerjidir (11).

Renklerin sınıflandırılması ve tanımlanmasıyla ilgilenen renk bilim dalına renkmetri (colorimetry) denilmektedir. İnsan gözünde 6-7 milyon koni hücresi renkli görüntülere yanıt verir. Bu hücreler algıladıkları renklere göre 3 gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan %65'i kırmızıya, %33'ü yeşile, %2'si maviye duyarlıdır. Bu nedenle bir rengi tanımlamak için 3 sayısal komponent yeterlidir ve bu amaçla ışınsal fonksiyonlar kullanılır. Bundan dolayı bir renk üç komponentli bir vektör olarak temsil edilebilir. Tüm renk takımı, renk uzayı ya da renk modeli olarak adlandırılan bir vektör uzayını oluşturur (12). Rengi tanımlamak, renk bütünü'nün bileşenlerini bulmak amacıyla, benzer özellikte renklerin bir araya geldiği ve renk değişimlerinin düzenli bir biçimde sıralandığı renk sistemleri ve renk uzayları tanımlanmıştır (11,13).

Renk uzaylarından bahsetmeden önce; yoğunluk (intensity), ortalama optik dansite (MOD), çözünürlük (rezolusyon), parlaklık, renk tonu, doygunluk (saturasyon) gibi terimlerden bahsetmek gerekir (12).

Yoğunluk (İntensite): Elektromanyetik spektrumun bazı aralıklarda bir yüzeye yayıldığı güç akışının, metrekaare başına watt cinsinden ölçümüdür. Bir diğer tanımlama ise lineer ışık ölçümüdür. x ve y uzaysal boyutlar olmak üzere $I(x,y)$, x ve y koordinatlarındaki pikselin yoğunluk değerini gösterir (11). Renkli görüntüler, $C(x,y,\lambda)$ şeklinde 3 bileşenden oluşan intensite fonksiyonu tarafından temsil edilir. x ve y , iki boyutlu görüntüde, herhangi bir pikselin konumunu, λ ise intensite fonksiyonu olarak temsil edilir. İntensite, yansıyan ışığın λ dalga

boyuna bağlıdır. Sayısal görüntülerde, her pikselin değeri, yoğunluk bilgisi taşıyan tek bir örnekle gösterilir. Pikseller, en zayıf yoğunluğu temsil eden siyah (0), en güçlü yoğunluğu temsil eden beyaz (255) arasında gri tonlamalarla gösterilir. Bütün görüntü gri tonlardan oluşur. Aynı yöntemle R (red) G (green) ve B (blue) renk yoğunlukları lineer intensite hesaplamasıyla gösterilebilir (12).

MOD (Ortalama Optik Dansite), bir objenin ortalama yoğunluk değerini veren matematiksel bir yöntemdir. MOD hesabı, $MOD = \text{Objenin yoğunluğu} / \text{Objenin alanı}$ olarak hesaplanır. Objeye olarak, görüntü üzerindeki herhangi sınırları belli bir alan kullanılabilir. Bu durumda MOD hesabı, $MOD = \text{Toplam piksel intensitesi} / \text{piksel sayısı}$ olarak hesaplanır (12).

Çözünürlük (Rezolüsyon): Görüntünün kaç piksele bölündüğünü, yani kaç pikselle temsil edildiğini gösterir. Çözünürlük ne kadar yüksekse, görüntü o kadar yüksek frekansta örneklenmiş olur ve görüntüdeki ayrıntılar o kadar belirginleşir (12).

Parlaklık: Bir alanın az ya da çok ışık saçması olarak tanımlanmaktadır.

Renk tonu: Bir rengin ışık dalgaları karışımındaki dominant dalgadır (12).

Renk uzayları renkleri tanımlamak için kullanılan matematiksel modellerdir. Renk uzayı, akslar içeren 3 boyutlu geometrik bir alan olarak temsil edilir. Bu alanda her renk algısı 1 nokta olarak ifade edilmektedir (14). Renk uzayları, bütün renkleri temsil edecek şekilde oluşturulur. Renk uzayları 3 boyutlu olarak tasarlanır. Çünkü renkmetri biliminin temelini oluşturan Grassmann'ın birinci kanununa göre bir rengi belirlemek için birbirinden bağımsız üç değişkene gerek vardır. Renklerin renk uzayındaki yerleri bu değişkenlere göre belirlenir. Her renk uzayının kendine özgü biçimde renk oluşturma için bazı standartları vardır. Renk uzayları oluşturulurken bir başka renk uzayına doğrusal ya da doğrusal olmayan yöntemlerle dönüşüm yapılabilirdir (11,13). Farklı renkli görüntüleme ve işleme cihazları farklı renk uzayları kullanır. Örneğin televizyon, bilgisayar monitörleri ve tarayıcılar kırmızı, yeşil mavi (red, green, blue) RGB renk uzayını, yazıcı ve çiziciler CMY(K) (Cyan, Magenta, Yellow, Key) renk uzayını kullanır. Renk uzayları genel olarak cihaz bağımlı ve cihaz bağımsız renk uzayları olarak iki gruba ayrılır. Cihaz bağımlı renk uzaylarında renkler cihazın özelliklerine bağlı olarak üretilir. Yani tamamen cihazın teknik özelliklerine bağlıdır. Cihaz bağımsız renk uzayları ise CIE (Commission Internationale de LEclairage: Uluslararası Aydınlatma Komisyonu)

tarafından geliştirilen ve bütün renkler için renk ölçümünü sağlayan yani renkmetride kullanılan uzaylardır (11,13).

Rutin patoloji pratiğinde ise, mikroskop ile boyalı kesitlerden, ışığın üç dalga boyunu içeren (kırmızı, yeşil, mavi) RGB kameralar ile görüntü elde edilir (1). Rutin hayatımızda farkında olmadan sürekli olarak kullandığımız bu renk uzayı toplamalı renk karışımı yöntemiyle bir birim küpün içinde renkleri tanımlayacak şekilde tasarlanmıştır. RGB renk uzayı bilgisayar monitörleri, tarayıcılar ve katodik televizyon tüpleri gibi cihazlarda kullanılır. Herhangi bir rengi bilgisayarda görüntülemek için bu üç renk belirli yoğunluklarda karıştırılır. RGB renk uzayı koordinat eksenleri kırmızı, yeşil ve mavi olan üç boyutlu bir uzay olarak düşünülebilir. Oluşturulmak istenilen renkler bu üç ana rengin koordinatları cinsinden ifade edilebilir (11,13).

Bilgisayar monitöründe elde ettiğimiz dijital görüntü piksellerden oluşmaktadır. Piksel ise tüm sayısal görüntülerin en küçük parçası olan üçlü nokta grubu olarak tanımlanır. Renkli görüntü sistemlerinde, bir rengi oluşturmak için üç veya dört renk kullanılır. Bu renkler kırmızı, yeşil ve mavi (RGB) veya çıyan mavisi, eflatun, sarı ve siyahtır. Her piksel kare biçimindedir ve her pikselde sadece 1 renk vardır. Bir resim piksellerin toplamından meydana gelir. Bitmap programlar, mozaik döşer gibi bunları yan yana getirip görüntüyü oluşturur (13). Her pikseldeki R,G ve B renkleri ışık durumuna göre, 0'dan 255'e kadar bir değer alır. Eğer bir grafik üzerinde aynı ışık değerini alan piksel (nokta) sayısını işaretlersek bir histogram elde etmiş oluruz. Histogram herbir renk için (RGB) çizilebildiği gibi, yoğunluk (intensite) için de çizilebilir. Histogram çizen programlar her bir pikseldeki rengin değerlerini sayarak bunu çubuk grafik olarak gösterirler. Histogramda dikey eksen piksel sayısını, yatay eksen de renk değerlerini gösterir. Bir dijital görüntü için hazırlanmış olan histogram, renklerin dağılım sıklıklarını grafik olarak görmemizi sağlar. Renkler, 0 ile 255 arasındaki değerler ile temsil edilir. Sıfır en karanlık gölgeyi, 255 en aydınlık rengi, 127 ise orta ton dediğimiz (mid-gray)'i temsil eder. Dijital bir görüntünün histogramına bakılarak, kabaca renk değerlerinin düzgün dağılıp dağılmadığına karar verilebileceği öne sürülmektedir (12-14). Bu görüş bir görüntünün renk dağılımının normal dağılımla ilişkili olması gerektiğine dayanmaktadır oysa bir görüntüdeki renk dağılımı, bir yana kaymış, bimodal, plato olabilir.

Biyolojik görme sistemi elektromanyetik radyasyonun görünür bölgesindeki frekansları algılayarak, dijital görüntü işleme sistemleri neredeyse tüm elektromanyetik spektrumu kulla-

nır (ultrason, elektron mikroskobu, bilgisayarda üretilmiş görüntüler). Dolayısıyla dijital görüntü işleme çok geniş ve çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (13). Kabaca; görüntü işleme, sensörlerden gelen görüntünün bilgisayara aktarılıp üzerinde herhangi bir işlem yapılması ve ardından görüntüleyici çıkışa iletilmesidir (13). Görüntü analizi yöntemi şu basamakları içerir; doku hazırlanması, görüntünün elde edilmesi, ön işlem (preprocessing), görüntü segmentasyonu, postprocessing, segmente görüntüde ölçüm yapmak, sonuçları yorumlamak (15). Görüntü işleme yöntemlerinden daha iyi sonuçlar elde edebilmek için hazırlık amaçlı ön işlemler (preprocessing) yapılmaktadır. Bunlar; görüntüdeki gürültüyü azaltma, arka planı normalleştirme, karşıtlık ve özellik geliştirme işlemleridir (16). Dijital görüntülerde, renkler ışığın yönü, ışık kaynağının intensitesine ve renk parlaklığına bağlıdır. Bu özelliklerdeki farklılıklar renk değişikliklerine neden olmaktadır. Aydınlanmadan kaynaklanan problemlerin üstesinden gelebilmek için preprocessing aşamasında renk normalizasyonu algoritmalarından faydalanılır (17). Elde edilen görüntüden doğru bilgiyi elde edebilmek ve anlayabilmek için görüntü işlemede segmentasyon önemli bir basamaktır. Görüntü segmentasyonunun amacı görüntüyü homojen ve ilişkili bölgelere bölebilmektir (13,18). Segmentasyon yöntemleri dört ana kategoride sınıflandırılır; piksel tabanlı, bölge tabanlı, şekil tabanlı ve hibrid teknikler (19). Bu tekniklerden en sık kullanılanı piksel tabanlı metodlardan histogram eşik değer çalışmalarıdır (15).

Histokimyasal boyamalarda birçok alan birden fazla boya ile boyanmaktadır. Segmentasyon bir sınır değeri ile bu bilgiyi göz ardı ederek görüntüyü bölgelere ayırmaktadır. Bu sorunu gidermek amacıyla geliştirilen ve her bir boya bileşenini ayırmak için geliştirilen bir yöntem, “dekonvolüsyon”dur. Dekonvolüsyonun amacı görüntüyü, kullanılan boyanın gerçek renklerine göre kanallara ayırabilmektir. Bu, bir alan birden fazla renk ile boyanmış olsa bile, bir renk için gerçek boyanma değerini ölçebilmeyi sağlamaktadır (20).

Histolojik kesitlerin çok büyük bir kısmı patologlar tarafından görüntülenir ve dijital görüntüler elde edilir. Böylece dijital görüntüler imaj analiz programı uygulamaları için uygun hale gelmektedir (21).

Patologların histolojik kesit gözlemleri, özellikle renk farklılıklarına ve biyolojik özelliklerin morfolojisine odaklanmaktadır. Bu kapsamda, patologlar için farklı kesit görüntülerini karşılaştırma gereği çok nadirdir ve kantitatif analize gerek duyulmamıştır. Ancak bilişim dünyasındaki yükseliş, biz patologlar için tanı, diferansiyasyon ve prognostik özellikler gibi

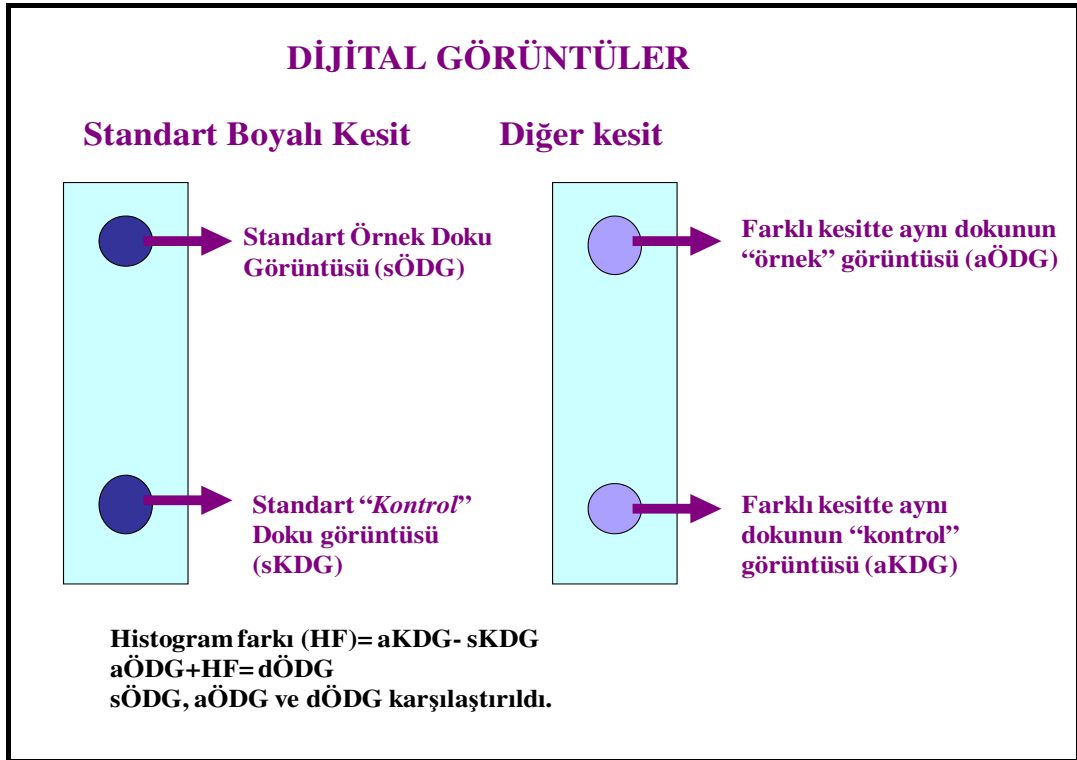
önemli faktörlerin istatistiksel analizi için yeni odaklar oluşturmuştur (21). Günümüzde bilgisayar teknolojisi pek çok alanda gelişip uygulama alanı bulmuş olmakla birlikte, histopatolojik tanı ve değerlendirmede patolojlara destek olarak kullanılabilmeleri için alınacak çok yol bulunmaktadır (1). Bunların bir nedeni doku kesiti tespit, takip, kesit, boyama aşamalarında ortaya çıkan görsel farklılıkları değerlendirememesi ve artifisiyel boyanma ya da yapıların bilgisayar programları tarafından değerlendirme sorunlarıdır. Kuşkusuz en önemli etken, çok farklı yapısal özellikler gösteren patolojik sürecin yarattığı güçlüklerdir. Ancak diğer tüm işlemsel etkenlerin standartlaştırılması ve gerçeklere dayalı normalizasyonu bilgisayar yazılımları ile gerçekleştirilen görüntü işlemlerinin verimliliğini arttırabilir.

Boyalı bir doku kesitinde görüntü birçok etkenle ilişkilidir. Boyalı bir kesitte, her spekt-rumdan belli bir miktar ışık emilir (1). Absorbe edilen her dalga boyunun miktarı boya vektö-rü olarak adlandırılır. Boya vektörü, farklı boyalar için çeşitlilik gösterdiği gibi, aynı boya için de farklılık gösterebilir. Bu birkaç faktöre bağlı olabilir; boya üreticisi firma, boyanın saklan-ma koşulları, boyayı uygulama metodu (zaman ve yoğunluk gibi) ve kesit kalınlığı (2). Emi-len ışığın miktarı birçok faktöre bağlıdır (1) ve aynı zamanda, farklı hazırlanmış kesitlerde de çeşitlilik gösterir. Kesitlerin intensitesi (belirlenmiş bir renk yelpazesinde pozitif boyanan alan (piksel ya da yüzde), boya miktarı ve kesitlerin saklanma koşullarından etkilenir. Bir kesitin renk değerlerini etkileyen birçok etken vardır. Örneğin boyanın tutunduğu hücresel elemanla-rın miktarı önemlidir. En popüler boyama metodu olan hematoksilin selektif olarak nükleik asitleri mavi-mor boyarken, eozin ise sitoplazmik proteinleri parlak pembe boyar. Renk de-ğerlerindeki diğer varyasyonlar ise boyanma sonucu olur. Her boyalı alan aynı miktarda ışık emmediği için farklı renkler görürüz. Bütün renk değerlerinin, ona karşılık gelen bir optik dansite (her pixel için ışığın ölçümü, 0= siyah- 255= beyaz) değeri vardır. (1,22)

Boyalı kesitlerdeki görüntülerin standart hale getirilmesi için yapılmış değerli çalışmalara bazı kısıtlılıkları vardır. Ortalama renk değerlerinin bir eşitliği olacağı ön yargısı taşı-maktadırlar. Oysa çok basit bir örnekle, kolorektal mukoza ve kolorektal karsinom kesitlerinin intensite ve dansitesinin yakın olması beklenemez. Aynı şekilde iyi ve az diferansiye iki kar-sinom için de durum benzerdir. Bu sorunu aşmak için en kolay yöntem kontrol doku ya da madde kullanıp her bir boyamada bu referansla karşılaştırma yapmak olabilir.

MATERYAL VE METOD

1. Metodun Amacı: Yukarıda da bahsedildiği gibi, histopatolojik kesitlerin boyanma özellikleri arasındaki farklılıklar sıkça tartışılan bir konudur (1,2). Bu çalışmada, bir lam üzerinde bulunan kesitlerin boyanma özellikleri benzer kabul edildi ve laboratuvarımızda standart yöntemle boyanan, kontrol ve örnek doku kesiti içeren bir kesit standart olarak seçildi. Çalışmada tasarlanan yöntem, kontrol doku kesiti görüntüleri arasındaki farkı kullanarak, standart kontrol görüntüye göre araştırılan görüntünün düzeltilmesine dayanmaktadır. Bu amaçla yazılmış olan program, iki kontrol doku görüntüsü (KDG) arasındaki histogram farkını bulup, bu farkı örnek doku görüntüsüne (ÖDG) transfer ederek düzeltilmiş bir görüntü (dÖDG) elde etmeyi sağlamaktadır (Şekil 1). Daha önce, Reinhard ve ark.(6) tarafından yapılan bir çalışmada iki görüntü arasında renk transferi tanımlanmıştır. Bu çalışmada ise, bir görüntünün renk özelliklerinin transferinin aksine, kontrol doku görüntüleri arasındaki histogram farkı, örnek doku görüntüsüne transfer edilmektedir. Sistemin performansı, dÖDG ve standart örnek doku görüntüsü (sÖDG) arasındaki benzerliği tanımlayarak değerlendirildi.



Şekil 1: Test kesitlerinin şematik görünümü (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)

2. Programın özellikleri: Bu program, üç renk uzayı olan kırmızı, yeşil ve mavi için herhangi bir görüntünün histogram dağılımını hesaplar ve herhangi bir hedef dağılıma göre, seçilmiş bir görüntüye renk “esnetme” (stretching) yapabilmeyi sağlar. Bu çalışmada, seçilen görüntüler, orijinal görüntünün renk bileşenleri dağılımına göre ve yukarıda tarif edildiği gibi kontrol görüntüleri arasındaki farkın eklenmesi ile esnetilmektedir.

3. Test kesitleri ve görüntülerinin hazırlanması: Formalin fiksasyonu uygulanmış ve parafine gömülmüş dört farklı doku kullanıldı. Bunlar plasenta, kolon, kolon adenokarsinomu ve sirotik karaciğer doku örnekleridir. Parafine gömülü bu dokulardan, aynı mikrotomda, 3 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı. Her lam üzerinde bir kontrol bir de örnek doku kesiti bulunmaktadır. Hazırlanan preparatlardan bir kısmında kontrol doku ve örnek doku aynı doku, bir kısmında ise farklı dokulardır. Haematoxylin & Eosin (H&E), Van Gieson (histokimya) ve CD34 (immunohistokimya) olmak üzere 3 boya grubu hazırlandı. Her üç boya grubu için birer lam standart protokol ile boyandı ve altın standart olarak kabul edildi.

H&E and Van Gieson boyaları: Bu iki boya için 10’ar lama kesitler hazırlandı. Tablo 1 ve 2’de dilüsyonlar ve boyama süreleri özetlenmektedir. H&E ile boyanan grup için, kontrol olarak kolon mukozası ve karaciğer, örnek doku olarak yine kolon mukozası ve karaciğer dokusu kullanıldı. Van Gieson ile boyanan grup için ise kontrol doku olarak sirotik karaciğer dokusu ve örnek doku olarak fibrotik kolonik submukoza ve sirotik karaciğer kullanıldı.

Tablo 1: H&E boyanma sürecinde farklı kesitler için hematoksilen ve eozinin uygulanma süreleri

H&E	Hematoksilen Uygulama Süresi	Eosin uygulama süresi
1	6 dakika	5 dakika
2	6 dakika	10 dakika
3	3 dakika	10 dakika
4	1 dakika	3 dakika
5	1 dakika	30 saniye
6	15 saniye	15 saniye
7	30 saniye	30 saniye
8	30 saniye	1 dakika
9	5 saniye	5 saniye
10-Standart kontrol kesiti	3 dakika	5 dakika

Tablo 2: Van Gieson boyanma sürecinde farklı kesitler için FeH ve pikrofuksin uygulanma süreleri

Van Gieson	FeH	Pikrofuksin
1	1 dakika	1 dakika
2	1 dakika	6 dakika
3	1 dakika	10 dakika
4	2 dakika	1 dakika
5	2 dakika	6 dakika
6	2 dakika	10 dakika
7	3 dakika	1 dakika
8	3 dakika	6 dakika
9	3 dakika	14 dakika
10- Standart kontrol kesiti	3 dakika	10 dakika

Tablo 3: CD34 boyanma sürecinde farklı kesitler için antikor dilüsyonları ve uygulanma süreleri

CD34	Dilüsyon	Süre
1	1/300	60 dakika
2	1/400	60 dakika
3	1/500	60 dakika
4	1/600	60 dakika
5	1/1000	60 dakika
6	1/2000	60 dakika
7	1/3000	60 dakika
8	1/3000	1 dakika
9	1/3000	5 dakika
10	1/200	1 dakika
11	1/200	3 dakika
12	1/200	5 dakika
13	1/200	10 dakika
14	1/200	20 dakika
15	1/200	30 dakika
16	1/200	40 dakika
17	1/200	50 dakika
18- Standart kontrol kesiti	1/200	60 dakika

CD34 immunohistokimyası: Kontrol olarak plasenta ve örnek doku olarak kolon adenokarsinomu kesitleri içeren toplam 18 preparat hazırlandı. Bir preparat standart CD34 immunhistokimyası boyanma protokolü (1/200 dilüsyonda primer antikor 60 dakika uygulandı) ile boyanırken diğer 17 preparat primer antikorun farklı dilüsyonlarında ve farklı sürelerde boyandı (Tablo 3). Primer antikor CD34 (Lab Vision Neomarker's CD34 Ab-1 (Q/3End/10)), ardın-

dan sekonder antikor biotin (Lab Vision Neomarker's) sonrasında streptavidin ile muamele edilip DAB kromojeni ile görünür hale getirildi. Mayer Hematoksilen ile boyama uygulandı. Her preparattan bir plasenta görüntüsü ve kolon adenokarsinomu kesitinden beş görüntü (kolon normal mukoza, submukoza, muskularis propria, yağ doku ile adenokarsinom alanları ayrı ayrı) elde edildi. Her preparatta aynı alanın seri kesiti görüntülenmesi hedeflenerek görüntüler kaydedildi. Böylece 18 plasenta, 18 kolon normal mukoza, 18 submukoza, 18 muskularis propria, 18 yağ doku ve 18 adenokarsinom görüntüsü hazırlandı.

Kesitlerin dijital görüntüleri, standart ışık altında, normalize edilmemiş mikroskopa (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan DP70) bağlı bir CCD kamera (Olympus, Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan BX51) ile 20x büyütmede elde edildi ve kişisel bir bilgisayarda depolandı. Tüm boyalar için toplam 474 görüntü elde edildi (Tablo 4).

Tablo 4: Tüm boyalar için kullanılan toplam görüntü sayıları (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)

	H&E	Analiz edilen H&E görüntüleri	Van Gieson	CD34	Analiz edilen CD34 görüntüleri
sKDG	2	2	2	1	1
aÖDG	63	18	18	102	34
dÖDG	63	18	36	102	34
aKDG	18	18	18	34	34
sÖDG	7	2	2	6	2
Toplam	153	58	76	245	105

Elde edilen tüm bu görüntüler semikantitatif olarak analiz edilmiş olup, tüm test edilenlerde sÖDG ve dÖDG değerlendirilmiş olmasına rağmen görüntü sayısının çokluğu nedeniyle, analiz sonuçlarında ortaya çıkan çok sayıda tablonun karmaşa yaratacağı düşünülerek her üç boya grubu için belirli sayıda görüntünün sonuçları ayrıntılı şekilde değerlendirildi. H&E için oluşturulan iki gruptan (kontrol görüntüsü kolon ve kontrol görüntüsü karaciğer olmak üzere

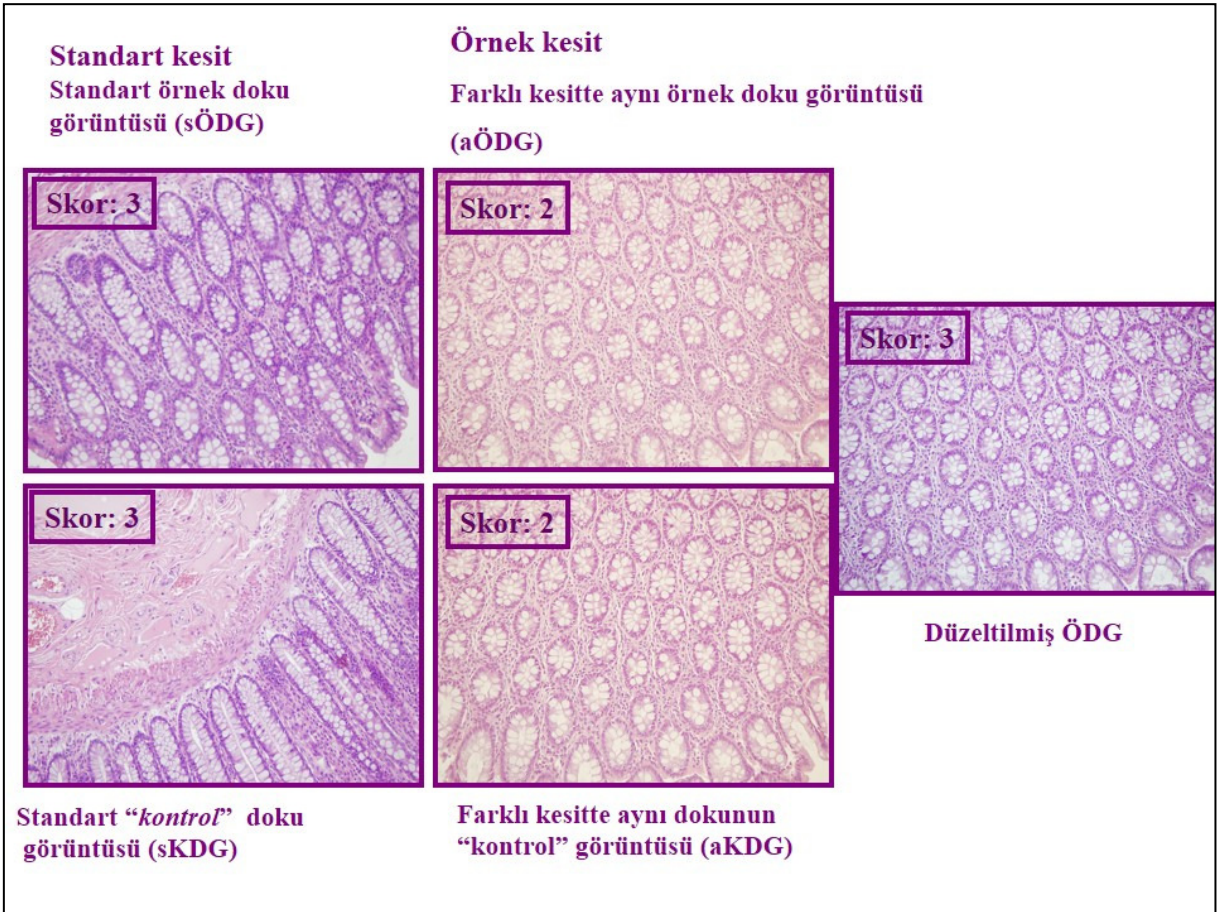
iki grup) toplam 153 görüntü elde edilmiş olup bu görüntülerden 58 tanesi ayrıntılı analiz edildi. Van Gieson için 76 görüntü elde edildi ve tüm bu görüntüler yalnızca semi kantitatif olarak değerlendirildi. Bu boya sonucu elde edilen görüntülerin kantitatif analizler için uygun olmadığı düşünülerek MOD, TOD (Toplam optik dansite) ve intensite hesaplamaları yapılmadı. CD34 immunhistokimyası için toplam 245 görüntü elde edildi ve bunların 105'i ayrıntılı analiz edildi. Ayrıntılı analiz yöntemi Materyal Metod 5. maddede açıklanmaktadır.

4. Örnek Görüntülere Histogram Transferi: Her kesit için kontrol doku görüntüleri (aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü, sKDG: standart kontrol doku görüntüsü) arasındaki histogram farkı bilgisayar programı tarafından hesaplandı ve sonuç farklı kesitteki örnek doku görüntüsüne (aÖDG) transfer edildi. Böylece yeni düzeltilmiş bir görüntü (dÖDG: düzeltilmiş örnek doku görüntüsü) elde edildi ve bir bilgisayarda depolandı. Elde edilen bu düzeltilmiş görüntüler ile standart örnek doku görüntüleri (sÖDG) farklı metodlarla karşılaştırıldı.

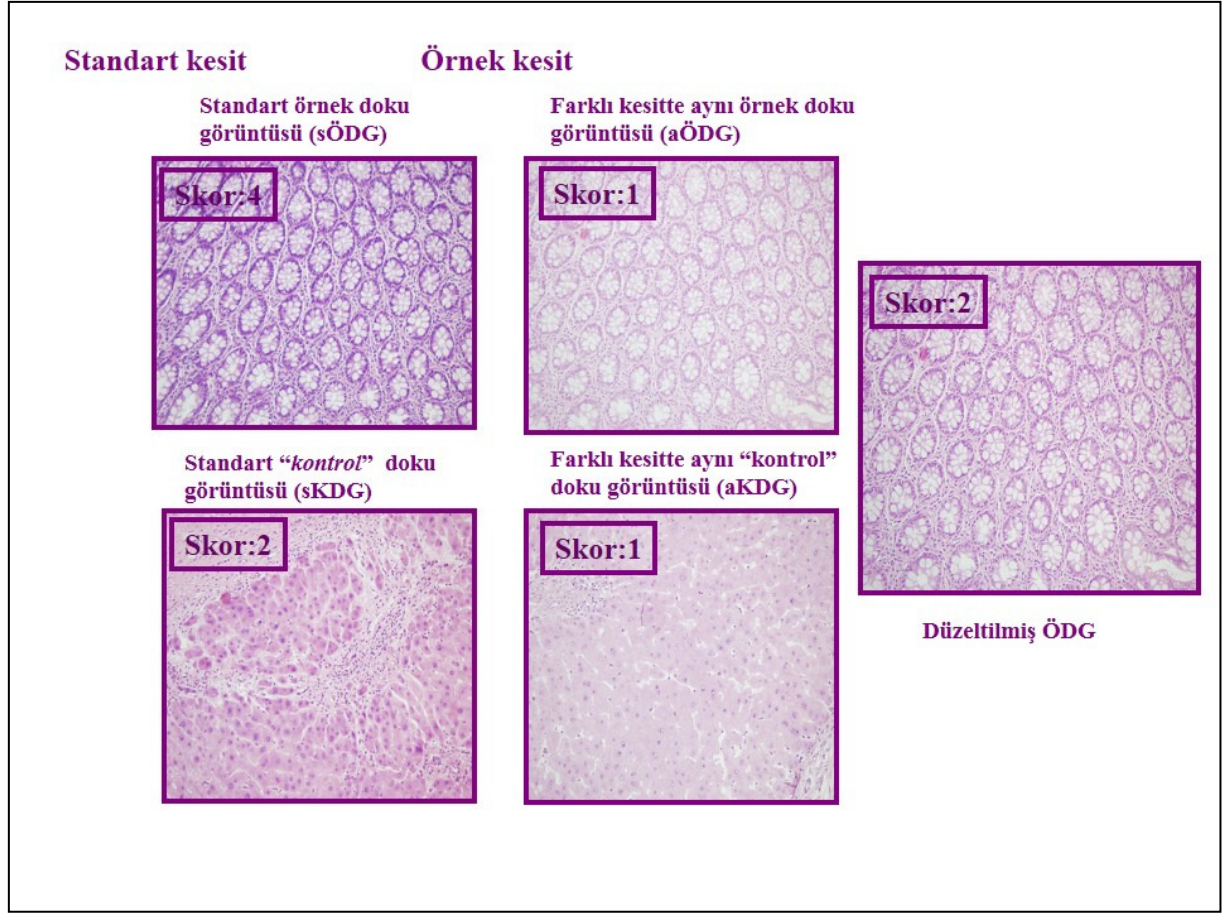
5. Görüntülerin Semikantitatif Ve Kantitatif Analiz İle Karşılaştırılması: Daha önce de bahsedildiği gibi farklı süre ve dilüsyonlarda boyanmış her kesitin düzeltilmiş bir görüntüsü elde edildi. Bu düzeltilmiş görüntüler, bu görüntülerin orijinal hali ve standart görüntü, sayılar ile kodlandı. Kodlanmış bu görüntüler iki gözlemci (SS, SZ) tarafından kör olarak semikantitatif olarak skorlandı. Bu skarlama görüntülerin az boyanması, çok az boyanması, fazla boyanması ve boyanma olmamasına göre yapıldı. Eozin, hematoksilen, Van Gieson ve CD34 boyamaları için uygun görüntülere, yok, çok az, az, normal, fazla (-, +, ++, +++ ve +++) gibi skorlamalar yapıldı. Bu metotta, gözlemciler boyanmanın doğru kalitede olduğunu düşündüklerine +++ skoru verdiler. Gözlemcilerin skorları weighted Kappa analizi ile karşılaştırıldı. Farklı skor almış görüntüler iki gözlemci tarafından birlikte tekrar değerlendirildi ve fikir birliği ile final skor verildi. Daha sonra görüntülerin skorları değerlendirildi. Standart görüntünün skoru 0 olarak kabul edildi ve buna göre diğer görüntülerin skorları +1, +2, +3, 0, -1, -2... gibi değerlendirildi. Böylece diğer görüntülerin standart görüntüye ne kadar yaklaşılabildikleri sayısal değerler şekline dönüştürüldü. Gözlemcilerin boyanmanın doğru kalitede olduğunu düşündükleri görüntülere +++ skoru vermelerine rağmen, her standart görüntü bu skoru alamadı.

ÖDG ve dÖDG skorları sÖDG skoru ile karşılaştırıldı. Şekil 2, 3, 4 ve 5'de her boya için birer örnek semikantitatif skorları ile birlikte verilmiştir.

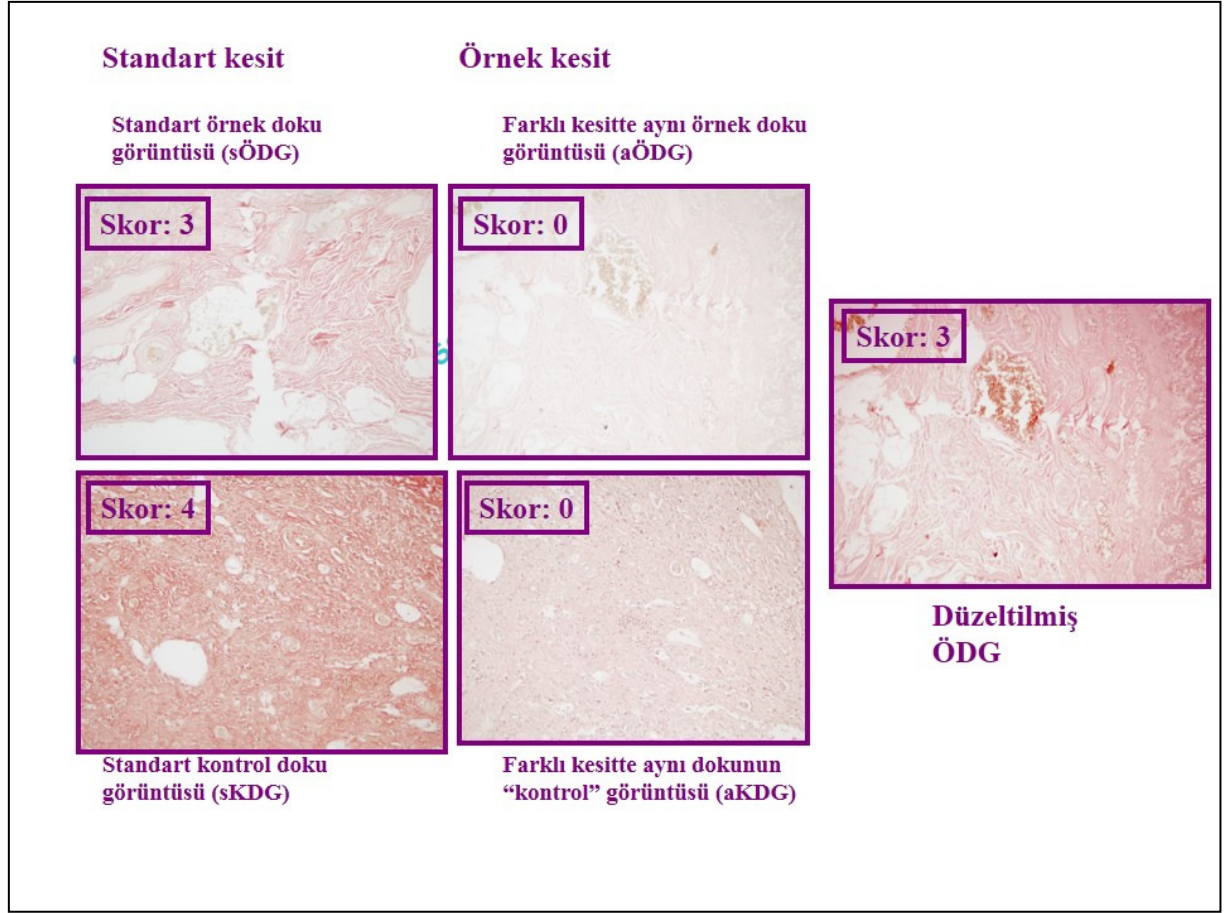
Görüntülerin kantitatif analizi için, optik dansite ve boyanan alan yüzdeleri daha önce bahsedilen görüntü analizi programları ile hesaplandı. H&E boyalı kesitler için, pembe ve mor boyanan alanlar ve CD34 boyası için DAB pozitif kahverengi alanlar manuel belirlenen renk aralıkları için bilgisayar programı tarafından seçildi (Şekil 6). Bu alanların optik dansitesi ve intensitesi görüntü analiz programı (Mustafa Şakar tarafından yazılım geliştirilmiştir) ile hesaplandı (22-24) . Bulunan değerler, gruplandırabilme ve karşılaştırma amacıyla, maksimum ve minimum sayısal değerler göz önüne alınarak, dört eşit parçaya bölerek incelendi, gruplar küçükten büyüğe 1’den 4’e kadar skorlandı. dÖDG’nin değerlerinin sÖDG ile aynı grupta olması başarı ölçütü olarak kabul edildi. Van Gieson boyalı kesitlere ait görüntüler değerlendirme için optimal olmadığı düşünülerek sadece semikantitatif olarak analiz edildi.



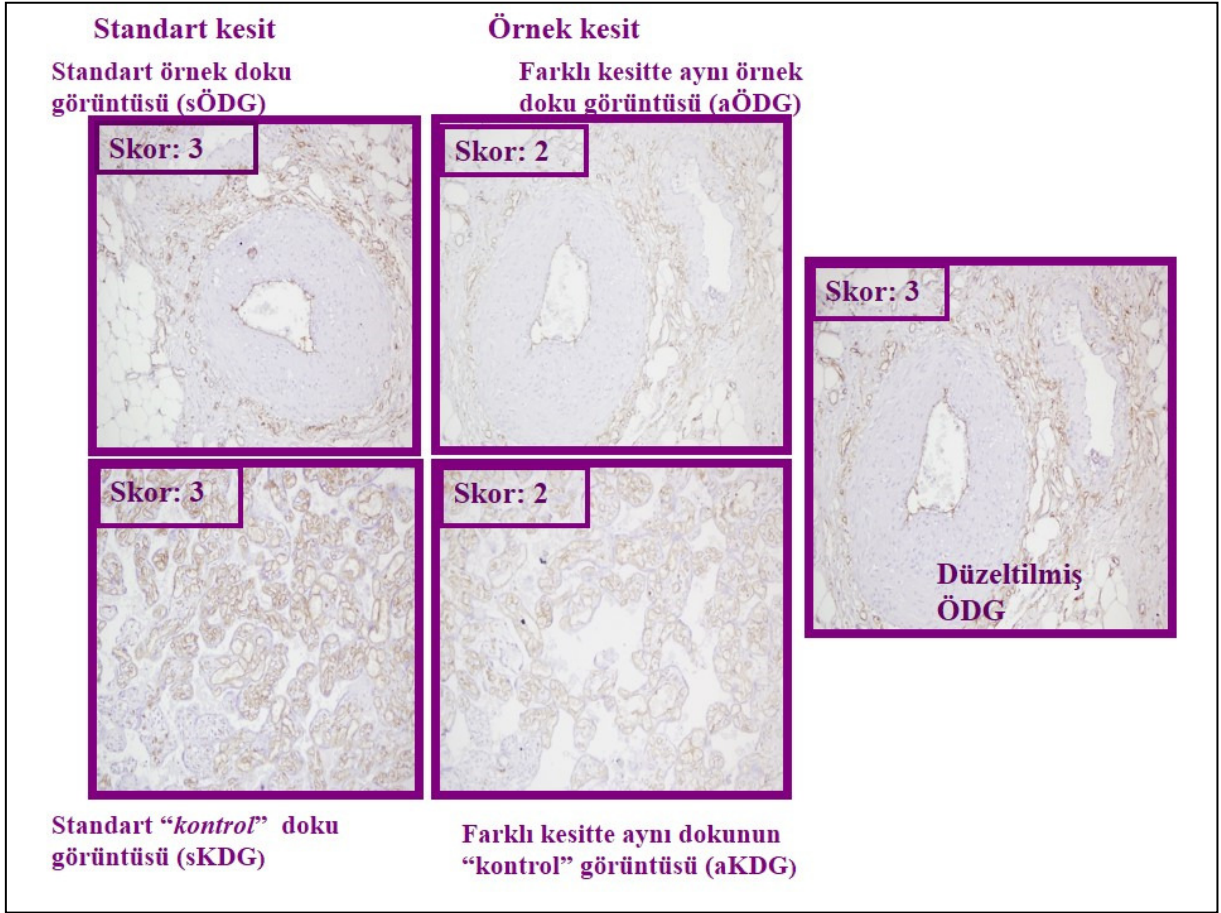
Şekil 2. H&E boyaması, standart kontrol doku görüntüsü ve örnek doku görüntüsü kolon normal mukozası, hematoksilin skorlaması (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)



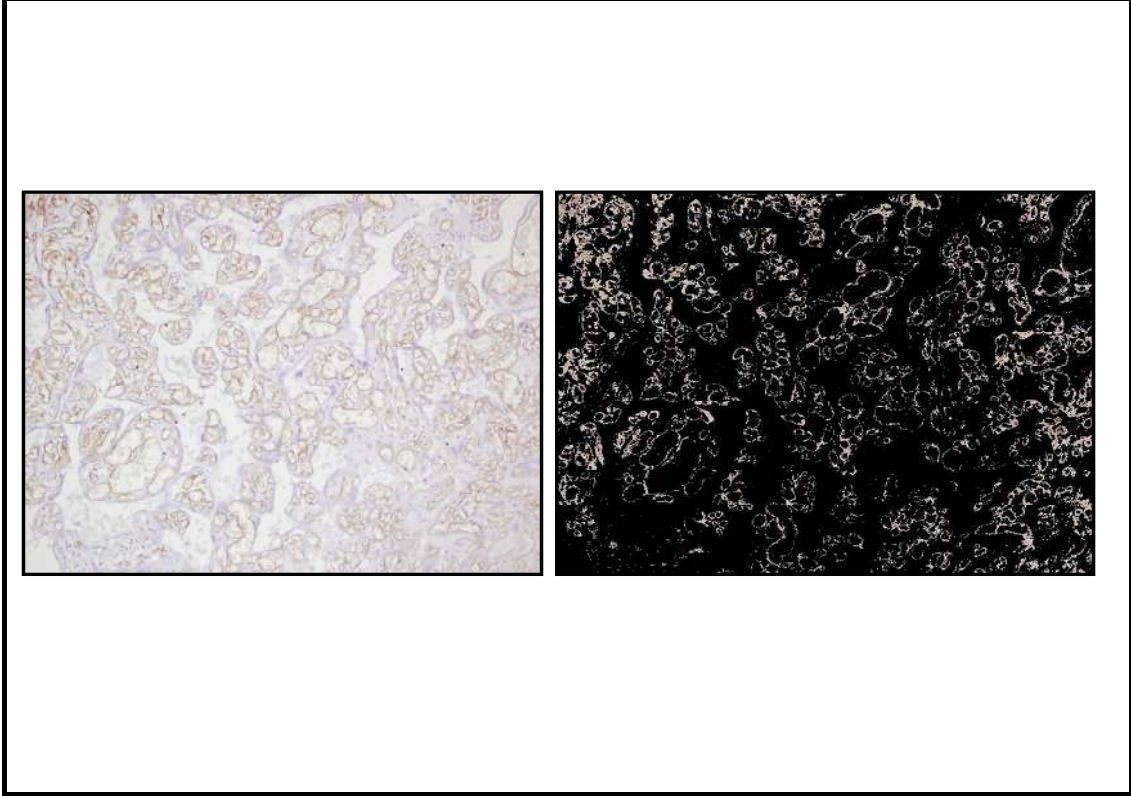
Şekil 3. H&E boyaması, standart kontrol doku görüntüsü sirotik karaciğer ve örnek doku görüntüsü kolon normal mukozası, hematoxilen skorlaması (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)



Şekil 4. Van Gieson boyaması, standart kontrol doku görüntüsü sirotik karaciğer ve örnek doku görüntüsü kolon submukozası (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)



Şekil 5: CD34 boyaması, standart kontrol doku görüntüsü plasenta ve örnek doku görüntüsü kolon submukozası (sÖDG: Standart örnek doku görüntüsü, aÖDG: Farklı kesitteki örnek doku görüntüsü, sKDG: Standart kontrol doku görüntüsü, aKDG: Farklı kesitteki kontrol doku görüntüsü)



Şekil 6 a: CD34 boyalı plasenta örneği, **6b:** CD34 boyalı plasenta örneğinde DAB pozitif kahverenkli alanların seçimi

6. İstatistiksel Analiz: İki gözlemcinin semikantitatif skorları ağırlıklı Kappa analizi (wKappa) ile karşılaştırıldı (MedCALC).

SONUÇLAR:

1. İki Gözlemcinin Gözlemciler Arası Uyumu: Tüm görüntüler için iki gözlemci için Weighted kappa değeri 0,59 (orta uyum, 0,41-0,60) olarak hesaplandı (MedCALC).

2. İki Gözlemcinin Semikantitatif Skorları:

2a. Tüm görüntüler (474):

- sÖDG ile aynı semikantitatif skoru alan ÖDG %23,5 iken, sÖDG ile aynı skoru alan dÖDG % 76,34' e yükseldi.

2b- H&E boyamaları:

- *Karaciğer görüntüsüne göre düzeltme, kolonik mukoza görüntüleri:*

- Hematoksilen için skorlandığında, ÖDG nin % 11,1'i sÖDG ile aynı skoru aldığı görüldü. Bu ÖDG'leri düzeltildiğinde elde edilen dÖDG'leri ise sÖDG ile %66,6 oranında aynı skoru aldı (Tablo 5a).

Tablo 5a: H&E boyalı karaciğer görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin hematoksilen için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-1	4 (% 44,4)	-
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	1 (% 11,1)	6 (%66,6)
1	4 (% 44,4)	3 (%33,3)

- Eozin skorlamasında, ÖDG' nin %33,3' ü sÖDG ile aynı skoru almışken, dÖDG' nin ise hiçbir standart ile aynı skoru alamadı (Tablo 5b).

Tablo 5b: H&E boyalı karaciğer görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-1	6 (%66,6)	-
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	3 (%33,3)	-
1	-	9 (%100)

- Kolon görüntüsüne göre düzeltme, karaciğer görüntüleri

- Kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilen karaciğer kesitlerinin hematoksilin değerlendirilmesinde, %33,3 ÖDG, sÖDG ile aynı skoru aldı. dÖDG' nin standart ile aynı skoru alma oranı ise %22,2' ye geriledi (Tablo 6a).

Tablo 6a: H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş karaciğer görüntülerinin hematoksilin için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-1	6 (%66,6)	-
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	3 (%33,3)	2 (%22,2)
1	-	5 (%55,5)
2	-	2 (%22,2)

- Aynı görüntülerin eozin skorlamasında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup ÖDG' nin oranı %44,4 iken dÖDG' de oran %22,2 bulundu (Tablo 6b).

Tablo 6b: H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş karaciğer görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-1	5 (%55,5)	-
0 (sÖDG ile aynı skor alan grup)	4 (%44,4)	2 (%22,2)
1	-	4 (%44,4)
2	-	3 (%33,3)

Kolon görüntüsüne göre düzeltme, kolon görüntüleri

- Kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilen kolon görüntülerinde hematoksilin boyası skorlandı. ÖDG' nin %22,2' si sÖDG ile aynı skorda bulundu. dÖDG' nin %100' ü sÖDG ile aynı skoru aldı (Tablo 7a).

Tablo 7a: H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin hematoksilin için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-2	2 (%22,2)	-
-1	3 (%33,3)	-
0 (sÖDG ile aynı skor alan grup)	2 (%22,2)	9 (%100)
1	2 (%22,2)	-

- Bu görüntülerin eozin skorlamasında ise aynı başarı elde edilemedi. ÖDG' nin %22,2'si sÖDG ile aynı skoru aldı, dÖDG' nin ise hiçbiri standart ile aynı skoru alamadı (Tablo 7b).

Table 7b: H&E boyalı kolon mukoza görüntülerine göre düzeltilmiş kolon mukoza görüntülerinin eozin için semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-2	3 (%33,3)	7 (%77,7)
-1	4 (%44,4)	2 (%22,2)
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	2 (%22,2)	-

2c- CD34 boyamaları:

Tüm çalışmalarda kontrol plasenta olmak üzere; kolonik submukoza görüntülerinde, sÖDG ile aynı semikantitatif skoru alan ÖDG %17,6 olup dÖDG’ de bu oran %64,7 olduğu görüldü (Tablo 8). Plasenta ÖDG’ de, sÖDG ile aynı skoru alma oranı %17,6 iken, dÖDG nin sÖDG ile aynı semikantitatif skoru alma oranı %88 bulundu (Tablo 9).

Tablo 8: CD34 boyalı kolonik submukoza görüntülerinin semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
-3	2 (%11,7)	-
-2	2 (%11,7)	1 (%5,9)
-1	5 (%29,4)	1 (%5,9)
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	3 (%17,6)	11 (%64,7)
1	5 (%29,4)	4 (%23,5)

Tablo 9: CD34 boyalı plasenta görüntülerinin semikantitatif skorları (ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

Skorlar	ÖDG	dÖDG
Düşük	10 (%58,8)	-
0 (sÖDG ile aynı skoru alan grup)	3 (% 17,6)	15 (%88)
Yüksek	4 (% 23,4)	2 (%12)

3. Görüntülerin Kantitatif Analizi:

Kolon görüntüsüne göre düzeltme, kolon görüntüleri:

H&E boyalı kolon mukozası görüntülerinin hematoksilen değerlendirmesinde, düzeltmeden sonra, sadece MOD değerlerinde önemli bir gelişim kaydedilmiş olup yakın kategorilere yükselme gözlemlendi (Tablo 10). Bu görüntülerin eozin değerlendirilmesinde, standart MOD değerine sahip görüntü oranı düzeltmeden sonra %22,2' den %77,7' ye yükseldi. TOD ise %22,2' den %88,8' e yükseldi. İntensite değerleri de ilerlemiş olup ancak komşu gruplara yükseldi (Tablo 11).

Tablo 10: Hematoksilen eosin boyalı kolonik mukoza görüntülerinin hematoksilen için MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması (MOD: Mean optik dansite, TOD: Toplam optik dansite, ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

MOD GRUP	MOD ÖDG	MOD dÖDG	TOD GRUP	TOD ÖDG	TOD dÖDG	İntensite GRUP	İntensite ÖDG	İntensite dÖDG
1 (116,68-134,305)	4 (%44,4)	0 (%0)	1 (1068214,8-2773807,5)	3 (%33,3)	4 (%44,4)	1 (2,25-5,4)	4 (%44,4)	5 (%55,5)
2 (134,305-151,93)	0 (%0)	6 (%66,6)	2 (2773807,5-4479400,2) standart	6 (%66,6)	4 (%44,4)	2 (5,4-8,6) standart	4 (%44,4)	3 (%33,3)
3 (151,93-169,555) standart	3 (%33,3)	3 (%33,3)	3 (4479400,2-6184992,9)	0 (%0)	0 (%0)	3 (8,6- 11,8)	1 (%11,1)	0 (%0)
4 (169,555-187,18)	2 (%22,2)	0 (%0)	4 (6184992,9-7890585,6)	0 (%0)	1 (%11,1)	4 (11,8- 15,1)	0 (%0)	1 (%11,1)

Tablo 11: Hematoksilen eosin boyalı kolonik mukoza görüntülerinin eozin için MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması (MOD: Mean optik dansite, TOD: Toplam optik dansite, ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

MOD GRUP	MOD ÖDG	MOD dÖDG	TOD GRUP	TOD ÖDG	TOD dÖDG	İntensite GRUP	İntensite ÖDG	İntensite dÖDG
1 (168,88-180,085)	2 (%22,2)	0 (%0)	1 14809956-23541922)	3 (%33,3)	1 (%11,1)	1 (22,3-33,65)	3 (%33,3)	0 (% 0)
2 (180,085-191,29)	2 (%22,2)	2 (%22,2)	2 23541922-32273888) standart	3 (%33,3)	8 (%88,8)	2 (33,65-45)	5 (%55,5)	7 (%77,7)
3 (191,29-202,495) standart	3 (%33,3)	7 (%77,7)	3 (32273888-41005854)	0 (%0)	0 (%0)	3 (45-56,35) standart	0 (%0)	1 (%11,1)
4 202,495-213,7)	2 (%22,2)	0 (%0)	4 (41005854-49737820)	3 (%33,3)	0 (%0)	4 (56,35-67,7)	1 (%11,1)	1 (%11,1)

Plasenta görüntüsüne göre düzeltme, plasenta görüntüleri: CD34 ile boyalı plasenta görüntüleri düzeltildiğinde TOD ve intensiteleri belirgin olarak iyileşti (Tablo 12).

- Standart görüntünün TOD ile aynı grupta yer alan ÖDG' lerinin oranı %17,6 iken, bu görüntüler düzeltildiğinde oran %52,9' a yükseldi.

- İntensite için de benzer sonuçlar elde edilmiş olup %17,6'lık oran, görüntüler düzeltildiğinde %47' ye ulaştı.

- MOD değerlerinde ise önemli bir düzelme sağlanamadı. Ancak çoğu görüntünün kantitatif değerleri standart görüntünün değerlerinin bulunduğu gruba erişemese de yakın komşu gruplara ulaşabildi.

Tablo 12: CD34 boyalı plasenta görüntülerinin MOD, TOD ve intensite değerlerinin gruplandırılması (MOD: Mean optik dansite, TOD: Toplam optik dansite, ÖDG: Örnek doku görüntüsü, dÖDG: Düzeltilmiş örnek doku görüntüsü)

MOD GRUP	MOD ÖDG	MOD dÖDG	TOD GRUP	TOD ÖDG	TOD dÖDG	İntensite GRUP	İntensite ÖDG	İntensite dÖDG
1 (165,65-173,825)	2 (%11,7)	0 (%0)	1 (1790959,5-3810807,7)	8 (%47)	3 (%17,6)	1 (2,68-5,86)	8 (%47)	3 (%17,6)
2 (173,825-183)	2 (%11,7)	5 (%29,4)	2 (3810807,7-5830656)	4 (%23,5)	3 (%17,6)	2 (5,86 -9,04)	4 (%23,5)	3 (%17,6)
3 (183-192,175) (standart)	11 (%64,7)	10 (%58,8)	3 (5830656-7850504,3)	2 (%11,7)	2 (%11,7)	3 (9,04- 12,2)	2 (%11,7)	3 (%17,6)
4 (192,175-201,35)	2 (%11,7)	2 (%11,7)	4 (7850504,3-9870352,6) (standart)	3 (%17,6)	9 (%52,9)	4 (12,2- 15,4) (standart)	3 (%17,6)	8 (%47)

TARTIŞMA

Histopatolojideki görüntü analiz uygulamaları sıklıkla segmentasyon ve/veya dekonvolüsyona bağlıdır ve segmentasyon, görüntülerin ön işlemlerini gerektirir. Görüntü segmentasyonunun amacı görüntüdeki objeler hakkında ek bilgi kullanmaksızın, görüntüyü homojen ve birbirine bağlı parçalara bölmektir. Renkli görüntü segmentasyonunda homojenlik, renkleri ve bazen de renk özelliklerini içerir. Segmentasyon bir görüntünün farklı bölgelere bölünmesidir. Her bölüm kendi içinde homojenken yan yana olan herhangi iki bölge homojen değildir (13, 18). Dijital görüntülerde, renkler ışığın yönü, ışık kaynağının yoğunluğu ve parlaklığa fazlasıyla bağlıdır. Yoğunluktaki küçük bir farklılık da, aydınlatmadaki değişimler de objelerin rengini önemli ölçülerde değiştirebilir. Işıktan kaynaklanan problemlerin üstesinden gelebilmek için, ön işlemede bir renk istikrarı veya normalizasyon algoritması kullanılması tavsiye edilir (17). Segmentasyon gibi, renk dekonvolüsyonu algoritması, dijital bir görüntüdeki boyanma paterninin değerlendirilmesindeki yaklaşımlardan bir tanesidir. Dekonvolüsyonun amacı, görüntüyü, kullanılan boyaların gerçek renklerine eş kanallara ayırmaktır. Bu da; aynı lokalizasyonda birden fazla boyanma olsa bile, patoloğun bu alanda her boya değeri için doğru bir ölçüm yapmasına izin verir (20).

Farklı normalizasyon algoritmaları öngörülse de, görüntülerin boyanma özellikleri, doku takibi ve boyanması gibi pek çok sebebe bağlı olduğundan, bu algoritmaların hiçbirisi dört dörtlük bir imaj analizi için tatmin edici değildir (2). Bu konuların sayısal metodlarla üstesinden gelinmesi adına bazı değerli girişimler vardır, ancak Magee'nin (2) de bahsettiği gibi, bu metodların çoğu, histopatologların rutin olarak kullandığı, renk betimlemeleri konusundaki bilgi zenginliğini göz ardı eder. Normalizasyon için farklı yaklaşımlar vardır. Bunlardan biri seçilmiş bir görüntüden yapılan renk transferi, diğer yaklaşımlar ise boya vektörü dağılımındaki diferansiasyonlar ile ilişkilidir.

Bunlardan ilki 2001 yılında Reinhard ve ark. (6) sunduğu yöntemle dayanmaktadır. Bu yöntem ile bir görüntüden diğerine “renk transferi” yaparak yeni bir görüntü elde etmişlerdir. Bu yeni görüntü, diğer görüntüye benzemektedir. Bir görüntünün görünüşü bir başkasına aktarılırken, birlikte çalışmaları uygun olabilecek kaynak ve hedef görüntüler seçilmiştir. Orijinal çalışmada, birkaç manzara resmi çalışmanın denenmesi amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların kalitesinin görüntülerin bileşimindeki benzerliğe bağlı olduğu vurgulanmıştır. Uygun bir renk uzayı seçerek basit bir algoritma sunmak hedeflenmiştir. İlk adım RGB gö-

rüntülerin $\lambda\alpha\beta$ renk uzayına dönüştürülmesidir. Daha sonra, görüntüdeki çimen, gökyüzü gibi piksel kümeleri ayrılmıştır. Görüntüdeki tüm pikseller, her küme çiftinin istatistiklerine bağlı olarak ölçeklendirilmiş ve değiştirilmiştir. Ardından, kaynak kümelerin her birinin merkeze uzaklığı hesaplanmış ve kümenin standart sapması hesaplanmıştır. Her üç aks için ortalama ve standart sapmaların yeterli olması amaçlanmıştır. Bu ölçümler, hem kaynak hem de hedef görüntüler için hesaplanmıştır. Ortalama ve standart sapmaları $\lambda\alpha\beta$ renk uzayındaki her aks için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu metod daha sonra çeşitli histopatolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu yaklaşımlara bir örnek Wang ve arkadaşlarının (10) çalışmasıdır. Bu çalışmada, bir tümör dokusu sınıflandırması taslağının ön işleme safhasında, doku görüntüleri örnekleri arasındaki kalite farkını azaltmak için bir normalizasyon şeması uygulanmıştır. Bu amaçla, Reinhard ve arkadaşlarının (6) ifade ettiği renk transferi metodu, karsinom görüntüleri setinden seçilmiş herhangi bir görüntüye dayandırılarak tüm görüntülere uygulanmıştır.

Macenko ve arkadaşları (1) ise sundukları bir metod ile, referans görüntüden hesaplanmış hedef boya vektörleri ile orijinal boya vektörlerinin yerini değiştirmişlerdir ve piksellerin OD değerlerini yeniden hesaplamışlardır. H&E boyalı kesitlere ait görüntülerde bulunan her iki boyayı karşılayan özel bir boya vektörünün olduğu ve her pikselin sonuç renginin (OD uzayında), bu boya vektörlerinin lineer kombinasyonları olduğunu varsayılmıştır.

Magee ve arkadaşları (2), aynı veri grubuna farklı metodlar uygulamışlardır. Bu metodlar; otomatik görüntü segmentasyonu metodu kullanarak $\lambda\alpha\beta$ renk uzayında lineer normalizasyon, verilen bir görüntüde dekonvolüsyon ve renk vektörünün otomatik belirlenmesinden sonra belirli bir renk uzayında normalizasyondur. Bu çalışmada birkaç yeni metod sunulmuştur. Bunlardan biri Reinhard'ın renk transfer tekniğine (6) eklenen bir otomatik segmentasyon metodudur. Bu metod $\lambda\alpha\beta$ renk uzayındaki lineer normalizasyon üzerine kuruludur ve olasılıklı (Gaussian Karıştırma Modeli temelli) renk segmentasyonu metodu kullanılarak çoklu piksel sınıflarıyla geliştirilmiştir. Lineer normalizasyon her piksel sınıfına (sınıf üyeleri pikselin belirli bir kimyasal boya tarafından renklendirilmiş olmasıyla veya arka plan gibi renksiz olmasıyla belirlenmiştir) ayrı ayrı uygulanmıştır.

Magee, Reinhard'ın metodunun iki türevini üretmiştir;

1-VB-Reinhard-Hard, her piksel sınıfı için ayrı ayrı orijinal metodu uygulamak.

2-VB-Reinhard-Weighted, renk ortalaması tahminine ağırlık vererek, standart sapma ortalaması ve hesaplama dönüşürme uygulamak (2).

Tüm bu kıymetli çalışmalar, histopatolojik görüntülerdeki renk değerleriyle ilgili sorunları düzeltmeyi ve bu görüntüleri nicel yöntemlerle analiz ederek doğru bilgiyi edinebilmeyi amaçlamaktadırlar. Bu metotlar, ideal bir görüntü seçmek suretiyle, görüntüyle ilgili ana tanımlamalarda yer alan görüntülerde ideal bir renk dağılımı olduğu kanaatindedirler. Ancak, mühendislikteki matematiksel yaklaşımlar için görüntüdeki renklerin homojen dağıldığını varsaymak bu renkli görüntülerde çalışmaya olanak tanıyorsa da bu gerçekte doğru değildir. Özellikle histopatolojik görüntülerde, görüntünün renk dağılımı sonsuz bir çeşitlilik gösterir. Ayrıca bu özellik tanıya ulaşma sürecinde gereklidir. Örneğin, normal kolonik mukoza ve kolon adenokarsinomu görüntülerinin renk bileşimlerini karşılaştırsak, adenokarsinomda bazofilinin belirgin olduğu dikkat çekicidir. Bu da neoplazinin morfolojik olarak tanımlayıcı ve karakteristik bir özelliği olan DNA anöploidisinden kaynaklanan hiperkromaziyle ilişkilidir (25). Histopatolojik bir görüntüdeki boyanma özelliklerinin muhtemel çeşitliliği, daha önceki çalışmalarda olduğu gibi, tatmin edici bir çözüm olarak ideal bir görüntünün seçilmesine müsaade etmemektedir.

Biyokimya gibi pek çok alanda, bir testin sonuçları, bilinen bulguları içeren bir numuneyle eş zamanlı yapılan bir testte elde edilen değerlere bağlı olarak düzeltilmektedir (26). Histopatolojik değerlendirmede, sıklıkla histokimya ve immünohistokimyada, kontrol dokusu kesiti, araştırılan örnek doku kesiti ile aynı şekilde boyanmaktadır. Bu çalışmada, boyama sürecinde kontrol dokusu kesiti kullanılmıştır ve renk düzeltmesi için kontrol doku görüntüleri arasındaki histogram farkı transfer edilmiştir. Kabaca bu metod, Reinhard ve arkadaşları tarafından tanımlanan metodun aritmetik işlem (kontrol görüntüler arasındaki fark) ile birlikte uygulanışdır ve buna en yakın histopatolojik yöntem, Wang (10) ile Maggie ve arkadaşları (2) tarafından kontrol doku görüntüsü olmadan uygulanmıştır.

Renk normalizasyonu metodlarının çeşitliliği gibi, bu metodların performans değerlendirmeleri de güvenilir bir karşılaştırmaya müsaade etmeyecek kadar çeşitlidir.

Bu metodların değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan boyamalar H&E ve Van Gieson' dur. Aynı şekilde immunhistokimya için ise Her2, MIB1 ve CD34 gibi primer antikörlerin kullanıldığı ve kromojen olarak DAB uygulanmış boyamalar değerlendirilmiştir. Perfor-

mansı test etmek için farklı boyama süreleri veya boya soldurma uygulanmıştır. Sirotik karaciğer, kolorektal, meme, akciğer, oral karsinom, melanom ve benign nevüs kesitleri kullanılmıştır (1-10). Önceki çalışmaların bazılarında olduğu gibi, bu çalışmadaki renk transfer metodumuzun performansını test etmek amacıyla kolon mukozası ve adenokarsinomu, sirotik karaciğer ve plasenta kesitleri, değişik sürelerde ve yoğunluklarda H&E, CD34 ve Van Gieson ile boyanmıştır. Ancak boya soldurma uygulanmamıştır.

Önceki çalışmalarda görüntü grupları, görüntüde pozitif veya negatif olarak seçilmiş noktalarının pozitivitesi, boya soldurma ve/veya dekonvolüsyon öncesi veya sonrasını karşılaştırarak değerlendirilmiştir (2,4,7,10). Bazı çalışmalarda pozitif boyanmış çekirdeklerin manuel veya imaj analiz metodları tarafından sayımı kullanılmıştır (1). Performans, bazı serilerde segmentasyon uygulamalarının başarısıyla değerlendirilmiştir (2,10). Manuel olarak sayılan MIB-1 pozitif hücrelerinin sayısı, görüntü analizi yazılımı NIH Image Version 1.2 tarafından hesaplanan sayı ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma hem orijinal görüntülerde hem de renk dekonvolüsyonuyla elde edilen görüntülerde uygulanmıştır. Manuel sayım ve yazılımın yaptığı sayımın sonuçlarının arasındaki benzerlik artan performans olarak kabul edilmiştir (7). Bütün bu çalışmalar göz önüne alındığında performans belirleme için standartlaşmış bir yöntemin bulunmadığı görülmektedir.

Macenko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1) önerilen renk normalizasyonu şemasının etkisi, düzeltme öncesi ve sonrası durumlar için, melanom ve nevüs kesitlerinden hesaplanan şekil ve boya temelli özelliklerin ayrılmasıyla analiz edilmiştir. Bu çalışmada dekonvolüsyonun performansını belirlemek için melanoma ve nevüslerin nükleer özellikleri, bir görüntü analizi yazılımı tarafından nükleusların seçimi öncesi ve sonrası karşılaştırılmıştır. Uzaklık Ağırlıklı Ayırcılık (Distance Weighted Discrimination- DWD) metodu, melanom ve nevüs özellikleri arasındaki optimal ayırım yönlerini bulmak için kullanılmıştır ve gerçek ile normalize edilmiş durumları arasındaki fark grafiğe dökülmüştür. Renk normalizasyonu uygulanmış görüntülerdeki fark, tüm kullanılabilir sınıflandırma yöntemlerinin arttırabileceği şekilde daha büyük görünmektedir. Ancak performansı değerlendirme metodlarından detaylı olarak bahsedilmemiştir. Farklı histolojik boya ve dokular da kullanılabilmeyle birlikte, H&E boyalı melanom ve nevüs görüntüleri kullanılmıştır ancak sonuçların bir preparatta üç veya daha fazla boya bulunduğunda tutarsız olabildiği bildirilmiştir. Ölçüm yöntemlerinin, NMF

temelli yöntemlerden daha gelişmiş olduğu vurgulanmıştır, ancak herhangi bir karşılaştırma verisi sunulmamıştır (1).

Bu çalışmadan sonra, Niethhammer (8) bu normalizasyon metodolojisini birkaç yeni katkıyla raporlamıştır ve üç metod birbiriyle karşılaştırılmıştır:

- 1- Dik düzlem önceliği olmadan yapılan değerlendirme (Macenko 2009'daki metoda eş)
- 2- Dik düzlem önceliğiyle, ama kümeleme safhası olmadan yapılan değerlendirme
- 3- Çalışmanın bütün algoritması

Bu metodların performansının değerlendirilmesi için boya vektörlerinin ortalama sapması bir izotropik Gaussian dağıtıcısı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu yaklaşım sentetik örnekler ve 13 gerçek histolojik set kullanılarak uygulanmıştır ancak detaylı bilgi verilmemiştir. Sağlama, sonuçların matematiksel olarak karşılaştırmasıyla yapılmıştır ve sunulan metodolojinin değişik biçimleriyle daha büyük bir gelişim saptandığı vurgulanmıştır (8).

Magee ve arkadaşları, Hematoksilen, eozin veya DAB (veri grubuna bağlı olarak) ilişkili alanları ve arka planı interaktif bir segmentasyon aracı kullanarak tanımlamıştır. Her görüntü için, her piksel tipinden 1000-2000 piksel tanımlanmıştır. RGB görüntülerdeki her bölgenin ortalama ve kovaryans matrisi hesaplanmıştır ve Hotelling'in T-kare istatistikleri (T2-T-test'in çok değişkenli bir versiyonu) değerlendirme amacıyla hedef dağılımına karşı hesaplanmıştır. Özetle, CDV-MM metodu dışındaki tüm metodlar, başarısız bulunmuştur. Bu değerlendirme yaklaşımı sadece Hematoksilen, eozin veya arka plan gibi üç vektörden biriyle gruplanmış piksel varsa göz önüne alınmış olup yoğunluk faktörü değerlendirilmemiştir (2).

Bizim çalışmamızda, görüntüler, sadece seçilmiş piksellerdeki pozitif veya negatif sonuçlar ile değil, yoğunluğun da önemli olduğu düşünülerek, tüm görüntüyü kapsayan semikantitatif ve kantitatif metodlar kullanılarak analiz edilmiştir. Sunduğumuz bu çalışmada, görüntüler semikantitatif olarak skorlanmış bu skorlar için gözlemciler arası uyum değerlendirilmiş ve konsensus skorları belirlenmiştir, ek olarak daha önce tanımlanmış yöntemler kullanılarak manuel seçilmiş segmentasyon sonrası, ortalama ve toplam optik dansite ve intensite (22-24) ölçümü yapılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda öncekilere göre daha kapsamlı performans değerlendirme yöntemleri kullanıldığı söylenilebilir.

Çalışmamızda, preparatlardaki kesitlerin boyanma özelliklerinin benzer olduğu varsayılmıştır. Laboratuvarımızın standart boyama protokolü ile boyanmış kontrol ve örnek doku kesiti bulunan bir preparat altın standart olarak seçilmiştir. Bu çalışmada sunulan yeni metod, altın standart kontrol görüntüsüne göre araştırılan örnek görüntülerin düzeltilmesi için kontrol doku kesiti görüntüleri arasındaki farklılıkların kullanılması üzerine kurulmuştur. Yazılım, iki kontrol doku görüntüsü arasındaki histogram farkının saptanması ve farkın örnek doku görüntüsüne aktararak düzeltilmiş bir örnek doku görüntüsü elde edilmesi için hazırlanmıştır. Sistemin performansı, düzeltilmiş örnek doku görüntüsü ile standart örnek doku görüntüsü arasındaki benzerlikle değerlendirilmiştir. Daha önce, Reinhard ve arkadaşları tarafından, iki görüntü arasındaki renk transferi detaylı bir biçimde tanımlanmıştır (6). Bu çalışmada, kontrol görüntüsünün renk özellikleri yerine, KDG' leri arasındaki histogram farkı ÖDG' ne aktarılmıştır.

Çalışmamız, kontrol dokularıyla renk düzeltmesine dayalı tek çalışmadır. Kolon-kolon gibi kontrol dokusu ile aynı dokudaki ve kolon-karaciğer gibi kontrol ile farklı dokulardaki uygulamanın etkilerini görmek için deneyler yapılmıştır.

Tüm görüntüler için, sÖDG ile aynı semikantitatif skoru alan ÖDG %25,5 oranındayken, dÖDG' nin %76,35' i sÖDG ile aynı semikantitatif skoru almıştır. Bu sonuçlar tatmin edici görünmeyebilir ancak bu seride test edilen görüntülerin deneysel amaçlarla aşırı bir çeşitlilik gösterdiği de unutulmamalıdır. Örneğin yalnızca bir dakika süre ile 1/3000 dilüsyonda CD34 boyası uygulanmış ve soluk bir boyanma elde edilmiştir. Ya da daha doğru sonuçlar elde edebilmek için, 1/200 dilüsyonda 60 dakika süreyle boyanma uygulanmıştır. Benzer şekilde H&E için, sadece 5'er saniyelik ya da 6-10 dakikalık uygulamalar yapılmıştır. Metodun performansının aşırı silik boyalı preparatlarda tatmin edici olmadığını gözlemlenmiştir.

CD34 boyamaları ele alındığında plasentaya göre plasenta düzeltmelerinde semikantitatif skorlamada, %17,6 % dan % 88 doğru gruba geçiş izlenmişken bu oran kolon submukozası için % 17,6 dan %64,7 olmuştur. H&E boyamalarında da hematoksilen için kolon mukozasına göre kolon mukozası düzeltmelerinde %22,2'lik oran %100'e yükselmiştir. Karaciğere göre kolon düzeltmelerinde ise %11,1'lik oran %66,6'ya yükselmiştir. Kolona göre karaciğer düzeltmelerinde ise %33,3 olan oran %22,2'ye gerilemiştir. Görüldüğü gibi, en başarılı sonuçlar, kontrol dokularının test dokularıyla aynı olduğunda elde edilmiştir. Bu durum farklı dokuların boyanmalarının renk uzayları aralarındaki fark ile açıklanabilir. Örneğin karaciğer hücre-

lerindeki güçlü eozinofili ve kolon adenokarsinomundaki bazofili, kolon mukozası veya sub-mukozası görüntülerindekinden çok daha farklı renklerle sonuçlanır. Bu çalışma sonuçları, daha iyi sonuçlar için kontrol dokusunun incelenen dokuya yakın herhangi bir doku olmasının verimi arttıracığı lehinedir.

Bu çalışmada plasentaya göre plasenta düzeltmelerinde TOD için %17,6'lık oran %52,9'a yükselmiştir ve intensite için de %17,6'lık oran %47 olmuştur. H&E boyamalarında da kolon mukozasının yine kolon mukozasına göre düzeltilmesi ile eozin için MOD'un doğru grupta yer alması %22,2'den %77,7'ye yükselmiş, TOD ise %22,2'den %88,8'e ilerleme olmuştur. Hematoksilen için yapılan ölçümlerde MOD için kontrol doku ile aynı grupta yer alma %33,3 olarak düzeltme sonrası da aynı kalmıştır. Bununla birlikte önceki görüntülerde ideal gruba en yakın değerde hiç olgu yokken düzeltme sonrası bu değer %66,6'ya yükselmiştir ki bu da önemli bir iyileşme olarak kabul edilebilir. Bu verilerde de görüldüğü gibi aynı grupta kontrol doku kullanılması ve yöntemin uygulanması, semikantitatif değerlendirmede olduğu gibi kantitatif değerlerde de en iyi düzelmeyi sağlamıştır.

Eozin boyamalarında semikantitatif skorlama verilerinde belirgin düzelme sağlanamamıştır. Bunun nedeni çoğu zaman patologların DAB ve hematoksilen boyanmalarının yoğunluklarını değerlendirme konusunda, eozinofiliye göre daha deneyimli olmalarından kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuçlar, tüm boyalar için daha çok bilgi veren her görüntünün dekonvolüsyonu sonrasında değerlendirilebilir ancak bu kombine boyanmaların boyanma karakteristiklerini yorumlayan patologların esas uygulamasını yansıtmamaktadır.

Sonuçlarımızı, kontrol doku görüntüleri arasındaki farklılıklara göre histogram transferine dayalı olmayan eski normalizasyon ya da renk düzeltme metodlarıyla elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak ideal bir seçenek olabilir. Ancak önceki çalışmalarda veri öbeklerinin ve sonuçların ifade edilişlerinin tatmin edici olmaması nedeniyle mümkün olamamıştır. Büyük olasılıkla aynı gerekçelerle, bu alandaki önceki makalelerde de, elde edilen sonuçlar birbiri ile karşılaştırılamamıştır (1,2,4-10).

KDG' ne dayanan histogram transferi doku kesiti görüntülerindeki renk düzeltmeleri için değerli bir yöntem olabilir. Kontrol dokusu uygulamasındaki farklılık başka renk normalizasyonu metodlarıyla da kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Macenko M, Niethammer M, Marron J, Borland D ve ark. A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. In: Proceedings of the Sixth IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI). 2009; 1107-1110.
2. Magee D, Treanor D, Crellin D, Shires M ve ark. Colour Normalisation in Digital Histopathology Images. Proc. Optical Tissue Image analysis in Microscopy, Histopathology and Endoscopy (MICCAI Workshop) , 2009; 100-111.
3. Tadrous PJ. Digital stain separation for histological images. Journal of Microscopy 2010; Vol. 240: 164–172.
4. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. Anal. and Quant. Cytology and Histology. 2001; vol. 23: 291–299.
5. Rabinovich A, Agarwal S, Laris CA, Price JH, Belongie S. Unsupervised color decomposition of histologically stained tissue samples. Adv. in Neural Inf. Proc. Systems, 2003.
6. Reinhard E, Adhikhmin M, Gooch B, Shirley P. Color transfer between images. IEEE Computer Graphics and Applications 2001; 21(5): 34–41.
7. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA. Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2003;11(1): 85-91.
8. Niethammer M, Borland D, Marron JS, Woosley J, Thomas NE. Appearance Normalization of Histology Slides. MICCAI, International Workshop Machine Learning in Medical Imaging, 2010
9. Tek FB, Dempster AG, Kale I. A Colour Normalization Method for Giemsa-Stained Blood Cell Images. Signal Processing and Communications Applications. 2006 IEEE 14th, 1-4.
10. Wang YY, Chang SC, Wu LW, Tsai ST, Sun YN. A Color-Based Approach for Automated Segmentation in Tumor Tissue Classification. Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale. 2007; 23-26.

11. Yılmaz İ. Renk Sistemleri, Renk Uzayları Ve Dönüşümler. Selçuk Üniversitesi Jeodezi ve Fotogrametri Mühendisliği Öğretiminde 30. Yıl Sempozyumu, 16-18 Ekim 2002.
12. Plataniotis KN, Venetsanopoulos AN. Color Image Processing and Applications. Engineering, 2000.
13. Lukac R, Plataniotis KN. Color Image Processing- Methods and applications. University Of Toronto, Canada, 2007.
14. Kuehni RG. Color Space and Its Divisions Color Order from Antiquity to the Present. 2003.
15. Otsu N. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Transactions On Systems, Man, And Cybernetics, 1979; Vol. SMC-9.
16. Sakar M, Lebe B, Akkan T, Sarioglu S. A Quantitative Description of Immunofluorescein Images Using Mathematical Morphology. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2010; Vol 18, Number 1.
17. Cheng HD, Xiaopeng Cai, Rui Min. A Novel Approach To Color Normalization Using Neural Network. Neural Computing and Applications. 2009; Volume 18, Issue 3: 237-247.
18. Skarbek W, Koschan A. Colour Image Segmentation- A Survey. Institute of Computer Science Polish Academy of Sciences and Andreas Koschan Institute for Technical Informatics Technical University of Berlin, 1994.
19. Cheng HD, Jiang XH, Sun Y, Wang J. Color image segmentation: advances and prospects. Pattern Recognition, 2001; Volume 34, Issue 12: 2259–2281.
20. Aperio Technologies, Color Deconvolution Algorithm User's Guide MAN-0023, Revision A, 2007
21. Gurcan MN, Member S, Boucheron LE, Member, Can A, Madabhushi A, Rajpoot NM, Yener B. Histopathological Image Analysis: A Review. IEEE Reviews In Biomedical Engineering, 2009; Vol. 2: 147-171.

22. Sarioglu S, Unlu M, Sakar M, Camsari T, Turkmen M, Ellidokuz H. Quantification of immune deposits in renal diseases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Oct; 19(5):470-7.
23. Sarioglu S, Celik A, Sakar M, Sonmez D, Tekis D. Methenamine silver staining quantitative digital histochemistry in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*. 2004 Dec; 36(10):2991-2.
24. Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, Kupelioglu A, Fuzun M. Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005 Jan; 58 (1):32-8.
25. Laurence A L, Raouf NG N, Elmer PD, Jose Maria C. Analysis of colonic histopathological images using pixel intensities and Hough Transform. *Philippine Science Letters*, 2010, Vol:3, No:1
26. Miller WG, Mc Pherson & Pincus: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Quality Control, Chapter 10, 21st ed., 2006