

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM ANALİZİ İÇİN BİLGİSAYAR GÖRÜŞÜ TABANLI YENİ BİR
YAKLAŞIM VE UYGULAMASI**

Fatih OKUMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİLGİSAYAR MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİMDALI

MAYIS 2016
MALATYA

Tezin Başlığı: Sperm Analizi için Bilgisayar Görüsü Tabanlı Yeni Bir Yaklaşım ve Uygulaması

Tezi Hazırlayan: Fatih OKUMUŞ

Sınav Tarihi: 20.06.2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Bilgisayar Mühendisliği Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Adnan Fatih KOCAMAZ
İnönü Üniversitesi

Prof.Dr. Ali KARCI
İnönü Üniversitesi

Doç.Dr. Resul DAŞ
Fırat Üniversitesi

Prof.Dr. Alaattin ESEN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Sperm Analizi için Bilgisayar Görüsü Tabanlı Yeni Bir Yaklaşım ve Uygulaması” başlıklı çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Fatih OKUMUŞ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SPERM ANALİZİ İÇİN BİLGİSAYAR GÖRÜŞÜ TABANLI YENİ BİR YAKLAŞIM VE UYGULAMASI

Fatih Okumuş

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bilgisayar Mühendisliği Ana Bilim Dalı

60 + xi sayfa

2016

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Adnan Fatih Kocamaz

Kültür balıkçılığında üreme verimini artırmak uzmanların çözüm aradığı bir konudur. Bu konu hem dişi yumurtalık hücrelerinde hem de erkek sperm hücrelerinde dölleme oranını yükselten faktörlerin tespit edilmesi hususuna dayanır. Dölleme oranını yükselten faktörlerden biri sağlıklı ve güçlü sperm üretimidir. Sperm hücrelerinin sağlıklı ve güçlü olup olmadığının anlaşılması için sperm analizi yapılmaktadır. Sperm analizi ile elde edilen bilgiler; sperm sayısı, mililitredeki sperm yoğunluğu, morfoloji ve hareketlilik gibi parametrelerdir.

Sperm analizinde genel olarak kullanılan üç ayrı yöntem vardır. Bu yöntemler; klasik yöntemle belirleme, spektrofotometrik sistemler ve CASA (Bilgisayar Destekli Sperm Analizörü) sistemleridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün de önerdiği CASA sistemleri diğer yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. CASA, görüntü işleme tekniklerini kullanarak sperm analizi parametrelerini ortaya çıkarmayı hedefleyen bir karar destek sistemidir. İlk olarak insan sperm hücreleri için geliştirilen CASA sistemleri daha sonra diğer canlılar için de geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, gökkuşağı alabalığı sperm hücrelerini analiz eden hızlı ve etkili bir CASA sistemi tasarlanmıştır. Çalışmada mikroskop üzerine bağlanmış video kameradan alınan sperm video görüntüleri OpenCV platformunda C++ ve C#.NET programlama dilleri kullanılarak analiz edilmiştir. Sperm hücrelerinin tespitinde adaptif eşikleme ve dairesel Hough dönüşümü metotlarından faydalanılarak sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu tespit edilmiştir. Hücrelerin hareket parametrelerini ortaya çıkarmak için video üzerinde çoklu hedef takibi yapılmıştır. Çoklu hedef takibinde arka plan çıkarımı VIBE algoritması ile yapılmış, hedeflere etiket atama için Kalman filtresi kullanılmış, farklı hedeflerin yol kesişmesi ile oluşan atama problemleri için Macar algoritması ile çözüm üretilmiştir. Hedef takibi ile elde edilen hareket bilgileriyle sperm kalite parametreleri hesaplanmıştır. Bu parametreler içerisinde yer alan VCL ve VAP hesaplamasında Lagrange interpolasyonu kullanılarak yeni bir yaklaşım önerilmiştir.

Bu tez çalışması ile geliştirilen sistemin, sperm hücrelerinin sayımında ve kalite parametrelerinin belirlenmesinde hızlı ve etkili sonuçlar ürettiği görülmüştür.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından 1512-Girişimcilik Aşamalı Destek Programı 2140052 numaralı ve “Bilgisayar Destekli Sperm Kalite Analizörü Yazılımı Geliştirilmesi-BASA” başlıklı proje olarak desteklenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Sperm Analizi, CASA, Bilgisayar Görüsü, Dairesel Hough Dönüşümü, Lagrange İnterpolasyonu

ABSTRACT

Master Thesis

A NEW APPROACH BASED ON COMPUTER VISION AND ITS APPLICATION FOR SPERM ANALYSIS

Fatih Okumuş

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Computer Engineering

60 + xi page

2016

Supervisor: Asst. Prof. Adnan Fatih Kocamaz

In aquaculture, to improve the reproductive efficiency is a matter that experts seek solutions. This matter is based on the detection of factors that increase the fertilization rate in male sperm cell and in female ovary cells. One factor that increases the fertilization rate is strong and healthy sperm production. Semen analysis is performed for determination of healthy and strong sperm cells. The informations obtained by sperm analysis are; parameters such as the number of sperm, sperm density per milliliter, morphology and motility.

There are three methods commonly used in sperm analysis. This methods are identifying with the conventional method, spectrophotometric systems and CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) systems. The CASA systems, that the World Health Organization also recommends, has begun to take the place of other methods. CASA is a decision support system that aiming to reveal sperm analysis parameters

with image processing techniques. CASA systems, firstly developed for human sperm cells, have been developed for other living things later.

In this study, a fast and efficient CASA system, analyzing the sperm cells of *Oncorhynchus Mykiss*, is designed. In the study, sperm video images, taken from a video camera attached on the microscope, were analyzed in OpenCV platform using C++ and C# .NET programming languages. Sperm count and concentration was determined by utilizing the circle Hough transform and adaptive thresholding on detection of sperm cells. To reveal the movements of sperm cell parameters, tracking multiple targets was made on the video. For Multi-target tracking, background extraction performed by VIBE algorithm, Kalman filter is used to assign labels to targets, Hungarian algorithm is used for assignment problem formed by the intersection of targets path. With the obtained informations target tracking, sperm quality parameters are calculated. For calculation of VCL and VAP, located in these quality parameters, is proposed a new approach using Lagrange interpolation.

Quick and effective results in the determination of quality parameters and count of sperm cells has been shown to be obtained with developed system in this thesis.

This thesis is supported by TÜBİTAK (Scientific and Technological Research Council of Turkey) in 1512-Stage Entrepreneurial Assistance Program's project as numbered of 2140052 and entitled of "Computer Aided Sperm Quality Analyzer Software Development-BASA".

KEYWORDS: Sperm Analysis, CASA, Computer Vision, Circle Hough Transform, Lagrange Interpolation

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi çalışmamda önerileri ve yönlendirmeleri ile akademik gelişmeme büyük katkı sağlayan, bana değerli zamanını ayıran danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Adnan Fatih Kocamaz’a;

Birlikte proje yürüttüğümüz ve bu çok disiplinli çalışmada laboratuvar çalışmalarıyla ve hesaplama yöntemlerindeki önerileriyle destek olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Erkan Özgür’e;

Tez çalışmamda geliştirdiğim yeni yaklaşımlarda bana sunduğu teorik katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali Karcı’ya;

Tez çalışmamın test aşamasında önerdiği metodolojiyle yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. M. Fatih Talu’ya;

Ayrıca bu uzun tez yolculuğunda kendilerine yeterince zaman ayıramadığım halde benden desteklerini esirgemeyen değerli AİLEM’e

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tez Çalışmasının Amaç ve Kapsamı.....	1
1.2. Tezin Organizasyonu.....	2
1.3. Literatür Taraması ve Değerlendirilmesi.....	2
2. SPERM ANALİZİ	6
2.1. Balıklarda Sperm Analizi	7
2.2. Sperm Analizi ile Ortaya Çıkan Parametreler	7
2.2.1. Sperm Sayısı (Konsantrasyon).....	8
2.2.2. Hareketlilik (Motilite)	8
2.2.3. Morfoloji	9
2.2.4. Kalite Parametreleri	9
2.3. Analiz Yöntemleri	11
2.3.1. Klasik Yöntemler	11
2.3.2. Spektrofotometrik Yöntem	12
2.3.3. CASA Sistemleri.....	12
3. MATERYALLER VE METOTLAR	13
3.1. Gauss Filtreleme	13
3.2. Otsu ile Adaptif Eşikleme	15
3.3. Dairesel Hough Dönüşümü	16
3.4. VIBE Algoritması.....	18
3.4.1. Piksel Modeli Oluşturma ve Sınıflandırma İşlemi.....	19
3.4.2. Arka Plan Modelini Başlatma	20
3.4.3. Arka Plan Modelini Güncelleme.....	20
3.5. Kalman Filtresi	21
3.6. Macar Algoritması.....	23
3.7. Lagrange İnterpolasyonu	25

3.8. OpenCV	27
4. SİSTEM TASARIMI	28
4.1. Balık Sperm Örneği Temini	28
4.2. Donanım Tasarımı	28
4.3. Yazılım Tasarımı	29
4.3.1. Sperm Sayımı	32
4.3.2. Çoklu Sperm Takibi	36
4.3.3. Kalite Parametrelerinin Hesaplanması ve Yeni Yaklaşımlar	42
4.4. Sistemin Kullanımı	50
5. SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Sperm Hücresi	6
Şekil 2.2. VCL, VSL, VAP ve ALH Parametreleri	11
Şekil 3.1. Bir Boyutlu Gauss Dağılımı (0 noktasında, $\sigma = 1$) [39]	14
Şekil 3.2. İki-Boyutlu Gauss Dağılımı ((0,0) noktasında, $\sigma=1$) [39]	14
Şekil 3.3. σ Değeri 1 Olan 5X5 Gauss Filtre Matrisi [39]	14
Şekil 3.4. Hough Dönüşümü ile (x,y) Düzleminde r Uzunluğunun Çıkarılması	17
Şekil 3.5. (x,y) Düzlemindeki Çember İçin (a,b) Merkezli Çemberler [42]	18
Şekil 3.6. Birden Fazla ve İç içe Geçmiş Dairelerin Tespiti [42]	18
Şekil 3.7. Piksel Değerinin Bir Örnek Kümesi ile Karşılaştırılması [44]	20
Şekil 3.8. Ayırık Kalman Filtresi Döngüsü	22
Şekil 3.9. Kalman Filtresi Modeli	23
Şekil 3.10. İki Noktadan Uydurulmuş Eğri	26
Şekil 3.11. Üç Noktadan Uydurulmuş Eğri	26
Şekil 4.1. Sistem Tasarımı	28
Şekil 4.2. Sistemin Donanım Yapısı	29
Şekil 4.3. Sistemin Akış Diyagramı	30
Şekil 4.4. Örnek Sperm Video Görüntüsü	32
Şekil 4.5. Gauss Filtresinden Geçirilen Orijinal Görüntü	33
Şekil 4.6. T Eşik Değeri = 0,5	33
Şekil 4.7. T Eşik Değeri 0,75	33
Şekil 4.8. T Eşik Değeri = 0,5882 (Otsu ile bulunan)	33
Şekil 4.9. Dairesel Hough Dönüşümü ile Sayılmış Sperm Görüntüsü	34
Şekil 4.10. Makler Sperm Sayma Kamarasından Alınan Görüntü	35
Şekil 4.11. VIBE Algoritması ile Arka Plan Çıkarımı	38
Şekil 4.12. Kalman Filtresi ile Sperm Numarası Tahmini	39
Şekil 4.13. Etiket Atama Problemi	40
Şekil 4.14. Hareketli Sperm Hücreleri	41
Şekil 4.15. VSL Hesaplama	43
Şekil 4.16. VCL Hesaplama	44
Şekil 4.17. VAP Hesaplama	45
Şekil 4.18. Lagrange İnterpolasyonu ile VAP Eğrisi Uydurma	46
Şekil 4.19. ALH, Ortalama Yoldan Sapma Genliği	47

Şekil 4.20. MAD Hesaplama	49
Şekil 4.21. Sisteme Giriş.....	50
Şekil 4.22. Mikroskoptan Görüntü Alma.....	50
Şekil 4.23. Sperm Analizi Seçenekleri	51
Şekil 4.24. Analiz Ayarları Ekranı.....	51
Şekil 4.25. Analiz Sonuçları	52
Şekil 4.26. Analiz Raporu.....	53



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türlerle Göre Sperm Sayısı	8
Çizelge 3.1. Macar Algoritması 1.Adım.....	24
Çizelge 3.2. Macar Algoritması 2.Adım.....	24
Çizelge 3.3. Macar Algoritması 3.Adım.....	25
Çizelge 4.1. Sperm Hücrelerinin Konumu İçin Örnek Tablosu.....	42
Çizelge 5.1. Bağlı Bileşen Etiketleme İle Segmentasyon Başarımı [52].....	54
Çizelge 5.2. Dairesel Hough Dönüşümü ile Segmentasyon Başarımı.....	54
Çizelge 5.3. VAP hesaplamasında Lagrange ve klasik yöntem karşılaştırması	55



SİMGELER VE KISALTMALAR

μm	Mikrometre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
WHO	(World Health Organization) Dünya Sağlık Örgütü
CASA	(Computer Aided Sperm Analysis) Bilgisayar Destekli Sperm Analizi
FPS	(Frame Per Second) Saniyedeki Görüntü Karesi Sayısı
VCL	(Curvilinear Velocity) Eğrisel Hız
VSL	(Linear Velocity) Doğrusal İlerleme Hızı
VAP	(Average Path Velocity) Ortalama Yol Hızı
ALH	(Mean Amplitude of Lateral Head Displacement) Lateral Baş Hareketi Genliği
BCF	(Frequency of Head Displacement) Çapraz Frekans Sayısı
LIN	(Linearity Coefficient) Çizgisellik
STR	(Straightness Coefficient) Doğrusallık
WOB	(Wobble Coefficient) Yalpalama Katsayısı
MAD	(Mean Angular Displacement) Ortalama Açısal Hareket
DHD	Dairesel Hough Dönüşümü

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde yaşayan birçok canlı türünün nesli tükenmiştir ve bazılarının da neslinin tükenişine şahit oluyoruz. Her geçen yüzyılda nesli tükenen canlıların sayısındaki artış bir önceki yüzyıla göre çok daha fazla olmaktadır. Türlerin devamlılığı, ekolojik denge için büyük önem arz etmektedir. Yaşam piramidinde en üstte yer alan insanlar için piramidin altında yer alan diğer canlıların neslinin devamlı olması gerekmektedir. Yanlış inanışlar, oyun ve eğlence için yapılan avlanmalar, savaşlar, kirli hava, moda ve aksesuar endüstrisi, tarım ilaçları, ormanların yok oluşu, insan nüfusunun artışı, endüstriyel atıklar vb. gibi birçok etkeni, türlerin yok olmasını sağlayan faktörler arasında sayabiliriz. Buradan yola çıkarak türlerin yok olmasına en büyük sebebin insanlar olduğunu söyleyebiliriz. Bununla beraber nesli tükenmekte olan canlıların yaşamlarına devam edebilmelerini sağlayabilecek olan da yine insanlardır. Bu canlıların üreme sistemlerinin hangi ortamda hangi çevresel faktörlerden etkilendiğinin ortaya çıkarılması yaşamı devam ettirebilecek ilk ve en önemli adımdır. Bu durumda bilim insanları doğayı incelemeli ve yok olmaya yüz tutmuş canlıların üreme verimliliğini azaltan faktörleri belirlemelidir. Dişi ve erkek canlıların üreme hücrelerinin analiz edilmesi bu faktörleri belirlemek için bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Erkek canlılar için uygulanan yöntem sperm analizi adı verilmektedir.

1.1. Tez Çalışmasının Amaç ve Kapsamı

Tüm canlılarda olduğu gibi balıklarda da sperm analizi büyük önem taşımaktadır. Balık üremesinde verimliliğin artırılması, hem nesli tükenmekte olan balık türlerinin yaşamlarının devam etmesinde hem de endüstriyel ürün sağlayan balık çiftliklerinin kar oranını artırmasında etkilidir. Türkiye İstatistik Kurumunun 2013 yılında yayınladığı su ürünleri istatistiklerinden yola çıkarak, balıklarda endüstriyel üretim yapılmasının, türlerin yok oluşunu da engelleyen bir role sahip olduğu kanısına varabiliriz. Bu anlamda kültür balıkçılığı yapan işletmelerde sürekli olarak daha verimli üretim yapmak için sperm analizi yapılarak çevresel faktörlerin üremedeki etkisi izlenmelidir.

Bu tez çalışmasında balık sperm hücrelerinin analizi için diğer sistemlerden farklı olarak sperm sayımında farklı ve etkili bir yöntem geliştirilmiş, yeni geliştirilen

algoritmalarla hızlı ve efektif sonuçlar üreten bir hareketli nesne takibi geliştirilmiş, kalite parametrelerinin hesaplanmasında farklı yöntemler önerilmiştir.

Sperm analiz parametreleri arasında bulunan sperm konsantrasyonu için literatürde geçen birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda efektif yöntemler araştırılmış ve hücre tespitinde belirli başarımlar yüzdelere ulaşılmıştır. Geliştirilen yöntemdeyse sperm başlarının şekli yuvarlak olduğu için, dairesel nesne belirleme başarımları yüksek olan dairesel Hough dönüşümü metodu kullanılarak etkili bir yaklaşım sunulmuştur. Sperm hücresi tespitinde dairesel Hough dönüşümü metodunun, diğer yöntemlere nazaran başarımlar yüzdesini artırdığı gözlemlenmiştir. Bu metodun hücre morfolojisi çıkarımında da etkili sonuçlar ürettiği tespit edilmiştir.

Hareketli nesnelerin ve hareket karakteristiklerinin belirlenmesinde çoklu hedef takibi yapan bir yöntem tasarlanmıştır. Bu yöntemde arka plan çıkarımında yeni ve etkili bir yaklaşım sunan VIBE algoritması kullanılmıştır. Arka plan çıkarımı ile beliren hareketli hedeflerin etiketlenmesinde Kalman filtresinden faydalanılmıştır. Görüntülerde hedeflere etiket atama işlemi yaparken aynı anda aynı koordinatta bulunan hedeflerde çakışma problemleri yaşanmış ve bu problemlerin çözümünde ise Macar algoritması kullanılarak en iyi çözümün tahmini yapılmıştır.

1.2. Tezin Organizasyonu

Tez çalışması dört bölüm altında sunulmuştur. Birinci bölümde sperm analizi ile ilgili bilgilere yer verilmiş ve detaylıca anlatılmıştır. İkinci bölümde tezde kullanılan görüntü işleme tekniklerinin literatür çalışmaları sunulmuştur. Üçüncü bölümde tezde yapılan çalışmanın sistem tasarımı ve yapılan uygulamanın çalışma mantığı anlatılmıştır. Son bölümde ise elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

1.3. Literatür Taraması ve Değerlendirilmesi

Balık üretim çiftliklerinde yapılan yetiştirme işlemine kültür balıkçılığı adı verilmektedir. Dünyadaki balık üretiminin büyük bir bölümünü kültür balıkçılığı oluşturmaktadır. Kültür balıkçılığındaki tüketim oranı her geçen yıl artmaktadır. Türkiye’de, 2002 ve 2012 yılları arasında elde edilen istatistiki verilere göre balık üretiminin artmasına karşılık tüketimin de arttığı gözlenmektedir. Yine aynı istatistiki sonuçlara göre doğada avlanan balık oranının gittikçe azaldığını da göz önünde

bulundurursak tatlı su balıklarının neslinin devamı açısından kültür balıkçılığında üretimin önemi ortaya çıkmaktadır. Kültür balıkçılığının en kritik aşaması yavru balık üretimidir. M.E. Özgür'ün [1]'de yaptığı araştırmaya göre yavru balık üretiminde yumurta ve sperm hücrelerinin değişen kalitesi üretim için birinci derecede etkindir. Yavru balıklar sudaki mineral, oksijen, karbon dioksit, sıcaklık vs. gibi birçok çevresel faktörden etkilenerek toplu ölümlere maruz kalmaktadır. Toplu ölümler ile birlikte yavru balık üretiminin yeterli düzeyde olmaması, su ürünleri yetiştiriciliği potansiyeli üzerinde sınırlandırıcı etki göstermiştir. [1]'de yapılan araştırmaya göre sperm analizi, dölleme oranındaki değişimleri izlemekle birlikte dayanıklı bireylerin de karakteristik özelliklerini ortaya çıkarmıştır.

Bilim adamları sperm analizi için birçok yöntem geliştirmiş ve geliştirmeye devam etmektedir. Teknolojinin yetersiz olduğu dönemde yüksek yoğunluktaki sperm hücrelerinin sayılması klasik yöntemlerle gerçekleştirilmekteydi. Klasik yöntemde sperm analizi insan görüşü ile yapılmaktadır. Elbette insan gözü ile analiz etme işlemi araştırmacı için zaman kaybı oluşturmaktadır. Klasik yöntemde hücre hareketlerinin karakteristik özelliklerinin çıkarılması neredeyse imkânsızdır. Teknolojinin ilerlemesi bu alanda yeni fırsatlar elde edilmesine yol açmıştır. Klasik yöntem dışında hücre sayımı için spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır [2]. Ancak bu yöntemle sperm hücresi olmayan nesnelerin sayılması da söz konusu olabilmektedir. Hareketlilik ile ilgili parametreler ise elde edilememektedir.

Sperm analizinde klasik yöntemlerin ve diğer yöntemlerin yetersiz kalması ile birlikte bilgisayar teknolojilerinde kaydedilen ilerlemeler sayesinde CASA (Bilgisayar Destekli Sperm Analizi) sistemleri geliştirilmiş ve diğer yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri mikroskoptan alınan video görüntülerden görüntü işleme teknikleri kullanılarak analiz yapan karar destek sistemleridir. Görüntü işleme teknikleri ile örneklerden alınan video görüntülerle sperm hücre sayısı, hücrelerin morfolojik özellikleri ve hareketlilik parametreleri insan görüşüne gerek kalmadan çıkarılabilir. Elde edilen verilerden istatistiksel çıkarsamalar yapılabilmekte ve saatler süren incelemeler saniyeler mertebesine indirilebilmektedir. Analiz işleminde bilgisayar görüşünden faydalanmak insan görüşü ile yapılan hataların da önüne geçmiştir. Günümüzde spermiogram üzerine araştırma yapan bilim adamları artık bilgisayar destekli analiz sistemlerini tercih etmeye başlamıştır. Bu sistemlerin kullanım oranının artması ile birlikte Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

tarafından 2010 yılında [3]'de yayınlanan bildirgeyle bilgisayar destekli analiz sistemlerine standartlar getirilmiştir.

Sperm hareketlerinin takibi ve hareket bilgisinden anlam çıkarma ile ilk olarak 1950'li yıllarda [4, 5, 6, 7, 8]'de ilgilenilmiş ancak bu çalışmalarda sperm analizi tamamen insan görüşüne dayalı saptamalarla yapılmıştır. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte sperm analizinde mikrogaf (bir nesnenin mikroskop ya da benzeri bir alet altında çekilmiş fotoğrafı ya da dijital resmi) yönteminin kullanılmasına 1970'li yıllarda başlanmıştır. D. Katz ve H. Dott mikrogaf yöntemini [9]'de uygulayarak spermelerin hız karakteristiklerini ölçebilmişlerdir. G. David [10]'de mikrogaf yöntemi ile insan sperm hücrelerinin karakteristik özelliklerini belirleyebilmişlerdir. Sonraki yıllarda analiz işlemleri için mikro-sinemografi ve mikro-videografi yöntemlerinin kullanıldığı görülmüştür. J.W. Overstreet ve arkadaşları [11]'de mikro-sinemografi ile insan sperm hücrelerinin hareket karakteristiklerini belirleyen bir metot geliştirmişlerdir. D.F. Katz ve J.W. Overstreet [12] 'de sperm hücrelerinin hareketlilik sınıflarını mikro-videografi ile belirleyebilmişlerdir. Tüm bu gelişmeler bilgisayar destekli sperm analizi yapabilen uygulamalar geliştirebilmek için zemin oluşturmuş ve 1990'lı yıllarda CASA sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Mortimer [13]'da laboratuvarlar için geliştirilmiş ve sperm hareketliliğini ve kinematik özelliklerini belirleyebilen endüstriyel bir ürünü ortaya atmıştır.

Kruger ve arkadaşlarının 1993'de yayınlandığı [14]'deki çalışma ile sperm hücrelerinin karakteristik özelliklerini anlamaya yönelik analiz kriterleri (kalite parametreleri) belirlenmiştir. Kruger kriterleri olarak bilinen bu parametrelerle sperm analiz yöntemlerine bir standart getirilmiştir. Böylece CASA sistemlerinin geliştirilmesinde bu standartlar kullanılmaya başlanmıştır.

Geliştirilen CASA sistemleri genel olarak insan sperm hücreleri üzerine araştırmalar yapmak için tasarlanmıştır. Farklı canlı türlerinin sperm hücresi bazında sahip olduğu farklı şekiller ve hareketlilik tarzları bilim insanlarını farklı çözümler üretmeye sevk etmiştir. İnsan üzerine yapılan çalışmalarla birlikte diğer canlı türleri için de sperm analizi yapılmaya ve balıklar için de çözümler üretilmeye başlanmıştır. Kime ve arkadaşları [15]'de balıkların sperm kalitesini ölçen bir CASA sistemi yazılım aracı önermişlerdir. Ancak bu çalışma araştırmacılar için uygulaması zahmetli bir süreç sunmaktadır. Zira yazılımın istediği ölçülerde video görüntüler almak çok önemlidir. Wilson-Leedy ve Ingermann 2007 yılında [16]'daki yayın ile zebra balıkları

için açık kaynaklı bir CASA sistemi geliştirmişlerdir. Ancak bu çalışma da video görüntüler için bağımsız bir ortam sunmaktadır.

CASA sistemlerinin doğru sonuçlar üretmesi ve sağlıklı çalışması için endüstriyel bir çözüm sunması beklenmelidir. Mikroskop, kamera ve yazılımın birbiri ile uyum içinde çalışıldığı ve verilerin kaydedilebildiği sonuç olarak da bu verilerden istatistiki sonuçların alınabildiği bir sistem olmalıdır.

Her sistemde olduğu gibi CASA sistemleri de kendini geliştirmeye ve yeni çözümler üretmeye devam etmektedir. Amann ve Waberski'nin 2014 yılında [17]'daki çalışması bu önerme için bir örnek teşkil etmektedir. Yeni algoritmalarla hızlı ve kararlılığı artırılmış sistemlerin gelişmesi teknolojinin gelişmesi ile paralel ilerlemektedir.

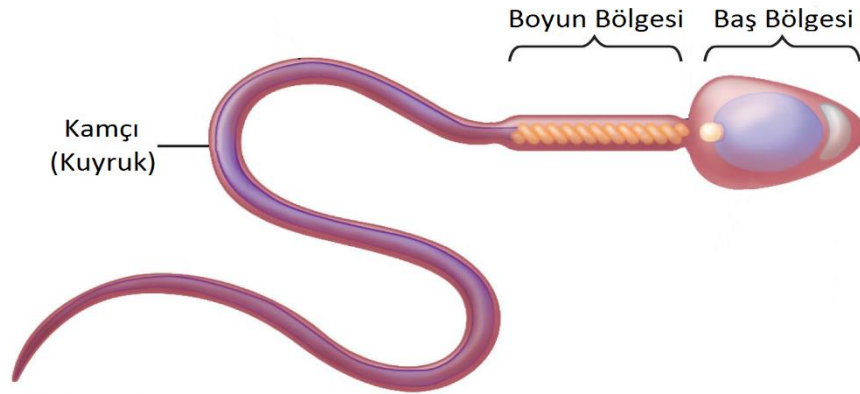


2. SPERM ANALİZİ

Üreme verimliliğinde çevresel faktörlerin etkisini araştırırken, erkek ve dişi gametlerinde (sperm ve yumurtalık hücreleri) kalite parametrelerinin uygun değerde olup olmamasına bakılır. Sperm hücrelerinin ve yumurtalık hücrelerinin üremeye uygun olup olmadıkları farklı yöntemlerle belirlenir. Sperm adı verilen erkek üreme hücrelerinin incelendiği bilim dalı spermiogram (sperm analizi) olarak adlandırılır. Bu bilim dalında spermilerin morfolojik ve hareketlilik bazında kalite parametreleri incelenir.

Sperm hücrelerinde kalite belirlenmesi her zaman pratik metotlara ihtiyaç duymaktadır. Billard ve Cosson'un [18]'de yaptıkları çalışmada sperm kalitesini ölçmek için aktif olan sperm hücresi yüzdesi, motilite süresi, sperm konsantrasyonu, spermatokrit ve seminal plazma kompozisyonu gibi birçok parametreyi kullanmışlardır.

Sperm analizinde hücrelerin şekilsel özelliklerinden faydalanılmaktadır. Her parametre niteliğine göre hücrenin bölgesel özelliklerini baz alır. Analizde kullanılan bölgeler hücrenin baş, boyun ve kuyruk bölgeleridir. Şekil 2.1.'de bir sperm hücresinin bölgeleri gösterilmiştir. Sperm konsantrasyonu ve hızı ile ilgili parametrelerin elde edilmesi için baş bölgesi, morfoloji için ise üç bölge de kullanılmaktadır. Canlı türlerine göre sperm hücreleri şekilsel olarak farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar daha çok baş bölgesinde yaşanmaktadır. Dolayısı ile sperm analizi yöntemsel açıdan türlere göre farklı olmalıdır.



Şekil 2.1. Sperm Hücresi

2.1. Balıklarda Sperm Analizi

Balık üretim ve yetiştiriciliğinde (akua kültür) yaşama kabiliyeti yüksek, hastalıklara dirençli, iyi beslenebilen, hızlı büyüeyebilen vb. özelliklere sahip yavruların elde edilmesi ancak yüksek gamet kalitesine (sperm ve yumurta) sahip damızlıkların kullanılması ile mümkündür [19, 20]. Bununla birlikte, ticari balık kuluçkahanelerinde sperm, hem nitelik hem de nicelik bakımından çoğunlukla yetersiz ve genellikle suni dölleme sırasında yeterli dölleme kabiliyetine sahip olmayabilmektedir. Bu özellik, Afrika'n yaygın balığında (Clarias Gariepinus) yeterli sperm alınamayışı, kalkan balığı (Psetta Maxima) ve Sarı Kuyruk Pisi Balığı (Pleuronectes Ferrugineus) türlerinde yeterli miktarda sperm olmayışı gibi durumlarda sperm kalitesinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir [21, 22]. Türkiye'de yaygın olarak tüketilen gökkuşuğı alabalığı (Oncorhynchus Mykiss) üretiminde de benzer ihtiyaçlar mevcuttur.

Kültür balıkçılığında üretimin artırılması çözölmesi beklenen bir problemidir. Her üretim çiftliği kendi bölgesindeki doğal zenginliklerin fiziksel, kimyasal, biyokimyasal farklılıklarına göre öznel problemlere sahiptir. Balığın üreme verimliliğı yetiştığı ortamdaki çevre kirliliğinden, su oranının azalmasından, iklimsel değışikliklerden fazlasıyla etkilenmektedir [1]. Bu etkileşimlerin belirlenmesi problemin çözölümü için ilk ve en önemli aşamadır.

2.2. Sperm Analizi ile Ortaya Çıkan Parametreler

Sperm analizi sonucunda araştırmacıların bilgisine sunulan parametreler dört ana başlık altında sıralanmıştır:

1. Sperm Konsantrasyonu (Sayısı)
2. Hareketlilik
3. Morfoloji
4. Kalite Parametreleri

Bu parametreler WHO tarafından [3]'de standartlaştırılmıştır. WHO Birleşmiş Milletlere bağı olan ve toplum sağlığıyla ilgili uluslararası çalışmalar yapan örgüttür. WHO tarafından [3]'de sperm analizi ile ilgili yapılan bildirgede insan sperm hücreleri üzerine yapılan çalışmalara değinilmiştir. Ancak genel geçerliliğı tüm canlıları kapsamaktadır.

2.2.1. Sperm Sayısı (Konsantrasyon)

Sperm sayısı veya konsantrasyonu, 1 ml sperm sıvısındaki toplam sperm sayısıdır. Düşük sperm sayımı oligozoospermi hastalığı olarak kabul edilir. Bu hastalık döllenme oranının çok düşük olmasına yol açar. Bir insandaki ortalama sperm sayısı 15 milyondan fazladır [3]. Balıklarda ise bu oran değişmekte ve konsantrasyon sayısı türlere göre değişkenlik arz etmektedir. Bazı türlere göre literatürde geçen sperm konsantrasyonları Çizelge 2.1.'de listelenmiştir. Bu çizelgeden de anlaşılacağı üzere balık sperm konsantrasyonu diğer canlılara göre çok daha fazladır.

Çizelge 2.1. Türler Göre Sperm Sayısı

Canlı Türü	Sperm Konsantrasyonu (1 mililitrede)	Kaynak
Gökkuşağı Alabalığı (Oncorhynchus Mykiss)	11,8 x10 ⁹	[23]
	10,39 x10 ⁹	[24]
	5-17 x10 ⁹	[25]
Sazan Balığı	10-20,82 x10 ⁹	[26]
	17,6-24,6 x10 ⁹	[27]
	20-30 x10 ⁹	[28]
At	349,7 x 10 ⁶	[29]
	178-355 x 10 ⁶	[30]
Boğa	1286 -1858 x 10 ⁶	[31]
	800-1775 x 10 ⁶	[32]
İnsan	15-40 x 10 ⁶	[3]

2.2.2. Hareketlilik (Motilite)

Hareketli hücre oranı sperm kalitesi belirlenmesinde önemli bir parametredir. Sperm hücrelerinde hareketlilik oranının %38 - %42 arasında olması normal olarak değerlendirilmektedir [3]. Sperm analizinde hareketli hücre sınıflandırması genellikle WHO tarafından [3]'de önerilen sistem tercih edilmektedir. Bu sistemde sperm örnekleri 4 dereceyle değerlendirilmiştir:

1. Doğrusal ve ileriye doğru progresif hareket,
2. Doğrusal olmayan ve yavaş hareket,
3. Non-progresif hareket,
4. Hareketsiz.

Progresif hareket eden sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket etmektedir. Nonprogresif hareket eden sperm hücresi ilerleyici hareket etmeyip küçük dairesel veya yerinde hareket etmektedir. Sperm hücresinde hiç hareket gözlenmiyorsa hareketsiz olarak sınıflandırılır. Özçınar'ın [33]'de yaptığı WHO verileri analizine göre sperm hücrelerinin total hareketliliği için en düşük referans değer %40, progresif hareket için ise %32'dir.

Sperm motilitesi iki şekilde ölçülebilir: İnsan görüşü ile veya bilgisayar destekli olarak. Ancak insan görüşü ile ölçülen hareketlilik oranları, insan görüşünün ölçüm yeteneğinin (ölçüm yapan kişi tecrübeli olsa dahi) zayıf ve kusurlu olması dolayısı ile güven telkin etmemektedir. Bilgisayar destekli sistemlerde yapılan ölçümler daha sağlıklı sonuçlar üretmektedir [3].

2.2.3. Morfoloji

Sperm hücreleri yapı itibariyle belirli şekil özelliklerine sahiptir. Hücrelerde görülen şekil bozuklukları WHO'nun 2010 yılı yayınladığı [3]'deki bildirgesine göre en fazla %10 oranında olmalıdır. Bu sayıdan fazla oranda şekil bozukluğu üremedeki verimliliği ciddi düzeyde azaltmaktadır. Bu tez çalışmasında morfolojik özellikler çıkarılmamıştır.

2.2.4. Kalite Parametreleri

Kalite parametreleri hareketlilik verilerinin analizi ile elde edilir. Genel olarak hız ve açısal hareketlerle ilgilenir. Bu parametreler spermin karakteristik özelliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu parametreler CASA sistemlerinin yaygın olarak kullandığı kriterlerdir. Dünya Sağlık Örgütü'nün de önerdiği kalite parametreleri şöyledir:

1 - VSL: Doğrusal İlerleme Hızı. Hız birimi $\mu\text{m/s}$ olarak ifade edilir. Analiz edilen video süresince sperm hücresinin başlangıç noktası ile bitiş noktası arasındaki düz çizgi uzaklığının (kuş bakışı uzaklığı) zamana bölünmesinden elde edilir. Bu parametre spermin hedefe ne kadar hızlı yol aldığının bilgisini verir.

2 - VCL: Eğrisel Hız ($\mu\text{m/s}$). Hız birimi $\mu\text{m/s}$ olarak ifade edilir. Sperm başının videodaki başlangıç noktasından bitiş noktasına kadar geçtiği tüm noktaların birleşmesi ile oluşan uzaklığın zamana bölümünden elde edilen değer. Tüm sperm hücreleri için bu işlem yapılır ve ortalama bir değer elde edilir. Bu parametre ile sperm hücresinin ilerlediği toplam yolda kat ettiği hız bilgisini verir.

3 - VAP: Ortalama Yol Hızı ($\mu\text{m/saniye}$). Eğrisel yolun düzleştirilmesi ile elde edilen ortalama yolun zamana bölünmesi ile elde edilir. VSL ve VCL noktaları arasında ortalama değer alınarak elde edilir.

4 - STR: Ortalama Rotanın Doğrusallığı. VSL değerinin VAP değerine bölünmesi ile elde edilir. STR maksimum 1, minimum 0 değerini alır. Genelde yüzde olarak ifade edilir. Bu bilgi ile sperm hücrelerinin ortalama olarak ne kadar doğrusal ilerlediği bilgisi elde edilir.

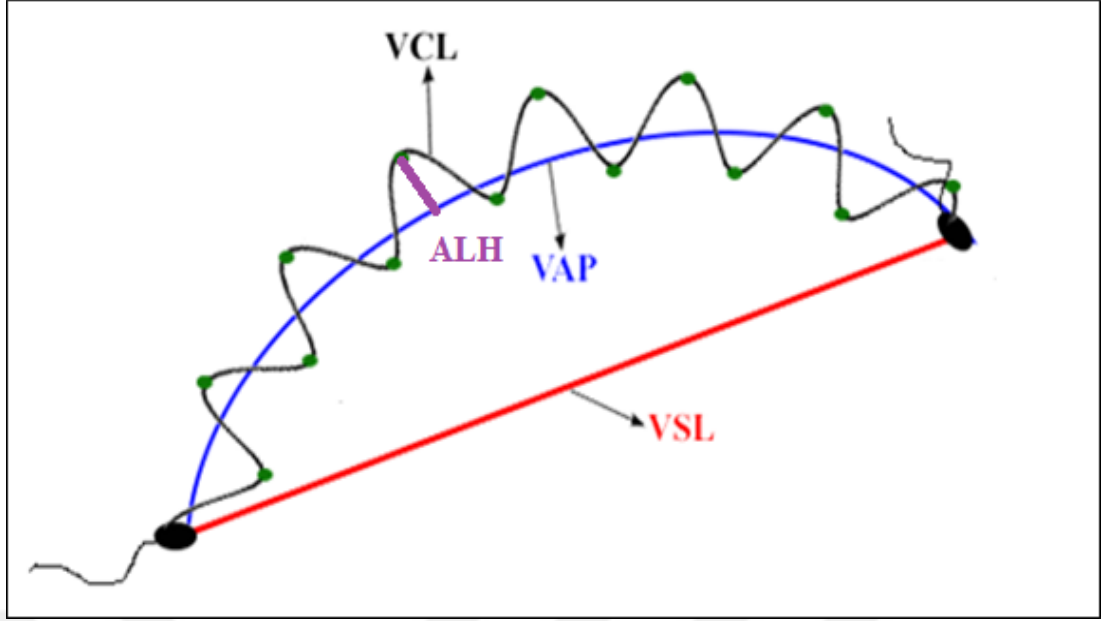
5 - LIN: Çizgisel Rotanın Doğrusallığı. VSL değerinin VCL değerine bölünmesi ile elde edilir. LIN maksimum 1, minimum 0 değerini alır. Bu bilgi ile sperm hücrelerinin doğrusal olarak ilerlediği yoldan ne kadar saptığı bilgisine ulaşılmaktadır.

6 - ALH: Lateral Baş Hareketi Genliği. Sperm başının ortalama hareketinden sapma uzunluğu da denilebilir. Maksimum ya da ortalama olarak ifade edilir. ALH değeri 2'den büyük olmalıdır. 0 'a yaklaştıkça tüm spermilerin doğrusal bir yol takip etmiş olduğu varsayılır.

7 - BCF: Çapraz Frekans Sayısı (kesişme/saniye). Spermin eğrisel çizgi hareketinin ortalama hareketi ile kesişme sayısıdır. BCF ile spermin ilerlediği yol boyunca ne kadar yayılım yaptığı bilgisine ulaşılır.

8 - WOB: Yalpalama Katsayısı. Gerçek yolda ilerlerken izlenen dalgalanmanın ölçüsüdür, VAP değerinin VCL değerine bölünmesi ile elde edilir. WOB değeri ne kadar büyükse sperm hücresinin o kadar kararsız hareket ettiği bilgisine ulaşılır.

9 - MAD: Ortalama Açısal Sapma (derece). Sperm başının eğrisel yolu boyunca yaptığı açısal sapmaların ortalamasıdır.



Şekil 2.2. VCL, VSL, VAP ve ALH Parametreleri

2.3. Analiz Yöntemleri

Balık sperm analizi uzun zaman boyunca motil sperm hücrelerinin yüzdesi, toplam hareket süresi veya her ikisinin bir kombinasyonu şeklinde ifade edilen motilite karakterlerinin sübjektif tahminleri sonucu elde edilen verileri ile değerlendirildi [34]. Yine sperm konsantrasyonlarının belirlenmesinde klasik metotlardan hemastometrik ve spektrofotometrik metotlar izlenmektedir [35]. Günümüz teknolojisi sperm analizi için son yıllarda geliştirilen ve WHO'nun da önerdiği CASA sistemlerinin gelişmesine olanak sağlamıştır. CASA sistemleri klasik ve spektrofotometrik yöntemlerden daha etkili ve daha doğru sonuçlar sunduğu [3]'de belirtilmiştir.

2.3.1. Klasik Yöntemler

Klasik yöntemde araştırmacı elde edilen görüntülerden göz kararı ile sayım yapmaktadır. Hareketlilik verilerinin hiçbir şekilde elde edilemeyeceği bir yöntemdir. Bu yöntem için [36]'de olduğu gibi sperm sayma kamaraları tasarlanmıştır. Sperm sayma kamaraları mikroskop merceğinin gördüğü alandan daha küçük karelere bölünmüş mikrometrelik çizgilerden oluşur. Bu sistemde bir kareye düşen sperm sayısından yola çıkılarak bir mililitrede kaç sperm olduğu tahmin edilir.

2.3.2. Spektrofotometrik Yöntem

Spektrofotometre ya da diğer adıyla tayfölçer, ışığın özelliklerini elektromanyetik spektrumun belirli bir bölümü üzerinde ölçerek spektroskopik analiz yöntemi sayesinde materyalleri belirlemek için kullanılan bir araçtır [2]. Bu araçla çoğunlukla gönderilen ışığın dönüşü ile elde edilen ışığın yoğunluğu ölçülür. Ancak ışığın polarizasyonu da ölçülebilecek bir değerdir. Spektrofotometreler, gama ışınları, X-ışınları ve uzak infrared ışınları gibi çok geniş bir dalga boyu aralığı ile yoğunluk tespiti yapabilir. Sadece sperm hücrelerinin tespitinde kullanılmaz. Sperm hücreleri belirli dalga boyundaki ışınlarla belirli dalgada karşılık vermektedir. Bu da spektrofotometrenin sperm hücresi tespitinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Sperm analizinde de kullanılan spektrofotometre ile belirli dalga boylarında ışığı absorbe eden sperm hücrelerinin ışığı soğurma oranına göre sayı belirlemesi yapılır. Bu sistemde ışık belirli bir açı ile belirli bir yüzeyden geçerek ilerler. Üç boyutlu bir ortamda üst üste binen sperm hücrelerinin aynı dalga boyunda cevap vermesi tespit edilen nesne sayısında hatalı bir durum ortaya çıkacaktır. Bu problemin giderilmesi için literatürde bir çözüm sunulmamıştır. Spektrofotometre ile sadece sperm sayısı bulunabilmektedir ve hareketlilik verileri elde edilememektedir.

2.3.3. CASA Sistemleri

Bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri, birçok türün sperm motilitesinin pratik analizleri için çok popüler bir konumdadır ve geçmişte kullanılan klasik metotlarla analizcinin bireysel duyularına dayalı tahmini metotlarının yerini almıştır. Özellikle balık spermeleri gibi motilite sürelerinin düşük olduğu canlı türlerinin sperm hareketlerinin tespitinde CASA sistemleri oldukça önemli sistemler haline gelmiştir. Analiz işlemleri için görüntü işleme tekniklerinden faydalanan CASA sistemleri ile balık sperm hücrelerinin motilite parametrelerinden VSL: Düz Çizgi Hızı ($\mu\text{m/saniye}$), VCL: Eğri Çizgi Hızı ($\mu\text{m/saniye}$), VAP: Ortalama Rota Hızı ($\mu\text{m/saniye}$), izlediği yol tespitinde kullanılan STR: Ortalama rotanın doğrusallığı, BCF: Çapraz Kesişme Frekansı (kesişme/saniye), ALH: Sperm başının ortalama yolda ilerlerken laterale doğru saptığı uzaklık (μm) ve konsantrasyon gibi bir çok kalite parametrelerini çok kısa sürede tespit edilebilmektedir [37].

3. MATERYALLER VE METOTLAR

CASA sistemleri görüntü işleme tekniklerini kullanarak analiz işlemlerinde bilgisayar görüşünden faydalanma temeline dayanır. Bu bölümde tez çalışmasında analiz işlemleri için kullanılan materyaller hakkında bilgi verilecektir.

3.1. Gauss Filtreleme

Görüntü işlemede sıkça kullanılan Gauss filtreleme, gauss fonksiyonu kullanılarak bir görüntünün bulanıklaştırılması esasına dayanır. Gauss bulanıklaştırmanın amacı görüntü üzerindeki gürültüyü veya önemsiz detayları azaltmaktır. Görüntü işlemede bulanıklaştırma işlemleri genelde bir ön işleme işlevi görür. Bu sayede yapılacak asıl işlemin daha kolay yapılması sağlanır. Segmentasyon işlemlerinden önce kullanılması gereksiz detayların ve pürüzlerin yok edilmesini sağlayarak daha net ve daha doğru sonuçlara varmamızı sağlar. Bu tezde Gauss filtresi, görüntü üzerindeki sperm hücresi olmayan ve segmentasyon işleminde problem oluşturabilecek olan küçük nesnelerin temizlenmesi için kullanılmıştır. Kullanılan lamelin tamamen steril olmaması, sperm hücrelerini hareketlendirmek için kullanılan solüsyonlar içerisinden gelen küçük maddeler veya başka sebeplerden görüntüde kirlilikler oluşabilmektedir.

Gauss filtresi esasen bir fourier dönüşümüdür. Uygulandığı düzleme göre farklı denklemlerle ifade edilir. Tek boyutlu bir düzlemin gauss bulanıklığı ile yumuşatılması Denklem (3.1) 'deki gibi gerçekleşir [38]:

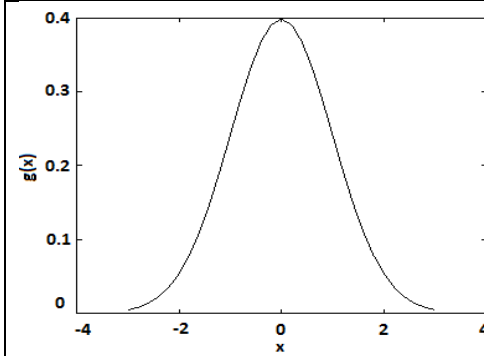
$$g(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{\frac{-x^2}{2\sigma^2}} \quad (3.1)$$

İki boyutlu bir düzlemde gauss bulanıklığı iki tane bir boyutlu Gauss denkleminin çarpımı ile elde edilir ve Denklem (3.2)'deki formül ile ifade edilir [38]:

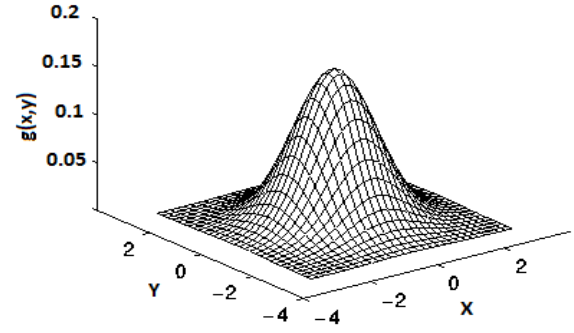
$$g(x,y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{\frac{-(x^2+y^2)}{2\sigma^2}} \quad (3.2)$$

Denklem (3.2)'de g fonksiyonu, x ve y koordinatının Gauss karşılığını vermektedir. σ değeri ise (x, y) koordinatındaki pikselin keskinliğini veya yumuşaklığını belirleyecek

olan Gauss dağılımının standart sapma değeridir. $1/2\pi\sigma^2$ ifadesi ise normalizasyon katsayısıdır.



Şekil 3.1. Bir Boyutlu Gauss Dağılımı (0 noktasında, $\sigma = 1$) [39]



Şekil 3.2. İki-Boyutlu Gauss Dağılımı ((0,0) noktasında, $\sigma=1$) [39]

Bir sinyale filtre uygulamak, ya eldeki filtre ile o sinyali frekans tanım kümesinde çarpmak demek, ya da filtre ile sinyali zaman tanım kümesinde evriştirmek (konvülasyon) demektir. Resim iki boyutlu ayrık olduğu için, aynı şekilde filtremizin de iki boyutlu ayrık olması gerekiyor. Resimdeki "gürültünün" daha aza indirilebilmesi için tercih edilen Gauss niceliği önem kazanmaktadır. Farklı parametrelerle birbirinden farklı Gauss filtreleri oluşturulabilir. Sürekli formda oluşturulan bu filtre ayrık forma dönüştürülüp resme uygulanmaktadır.

$$\frac{1}{273} \begin{bmatrix} 1 & 4 & 7 & 4 & 1 \\ 4 & 16 & 26 & 16 & 4 \\ 7 & 26 & 41 & 26 & 7 \\ 4 & 16 & 26 & 16 & 4 \\ 1 & 4 & 7 & 4 & 1 \end{bmatrix}$$

Şekil 3.3. σ Değeri 1 Olan 5X5 Gauss Filtre Matrisi [39]

Ayrık formdaki filtre çekirdek (kernel) olarak adlandırılır ve genelde kare matris şeklindedir. Şekil 3.3'de 5x5 genişliğinde σ değeri 1 olan gauss filtre maskesi örneği gösterilmektedir.

3.2. Otsu ile Adaptif Eşikleme

Eşikleme kavramı görüntü işlemede genel olarak, görüntü üzerindeki anlamlı verinin ortaya çıkarılması için siyah-beyaz (binary) uzaya çevirmek olarak tarif edilebilir. Bir görüntü üzerinde birbirinden farklı birden fazla anlamlı obje olabilir. Bu farklı objeler nesnel özelliklerine göre belirli bir eşik değeri ile ayırt edilebilirler. Aranılan objenin eşik değeri görüntüye uygulandığında bu objeleri segmente etmek daha kolay olacaktır. Bu tezde sperm video görüntülerindeki hücreleri belirgin hale getirmek için adaptif eşikleme kullanılmıştır. Bu sayede segmentasyon işlemi daha kolay yapılacaktır.

Gri tonlamalı bir görüntü üzerinde 0-255 arasında seçilen bir T eşik değerine göre, siyah-beyaz görüntü Denklem (3.3)'deki gibi oluşturulur.

$$n(x,y) = \begin{cases} 0, & g(x,y) < T \\ 1, & g(x,y) \geq T \end{cases} \quad (3.3)$$

Denklem (3.3)'de "n" fonksiyonu x ve y koordinatındaki pikselin gauss karşılığının T eşik değerine göre siyah-beyaz formdaki karşılığıdır. Burada T değerinin doğru seçilmesi kritik önem taşımaktadır. Eğer T değeri çok büyük seçilirse oluşturulacak yeni görüntüde pek çok piksel beyaz(1), küçük seçilirse de siyah(0) olacağından görüntünün içerdiği bilgi ciddi miktarda azalacaktır. Bu problemi gidermek için eşik değerini görüntü üzerindeki piksellere göre otomatik olarak hesaplayan bir algoritma gerekmektedir. Böyle bir algoritma 1978'de Nobuyuki Otsu tarafından [40]'deki yayın ile geliştirilmiştir.

Algoritma görüntü üzerinde iki ayrı sınıf olduğunu kabul ederek, bu iki sınıf arasındaki varyansı maksimum yapacak değeri bulmaya çalışır. Varyans bir rassal değişken, bir olasılık dağılımı veya örneklem için istatistiksel yayılımın, mümkün bütün değerlerin beklenen değer veya ortalamadan uzaklıklarının karelerinin ortalaması şeklinde bulunan bir ölçüdür [41]. N uzunluklu bir dizi için varyans hesaplama Denklem (3.4)'de gösterilmiştir.

$$\sigma^2 = \sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})^2 \text{Pr}(x_i) \quad (3.4)$$

Sınıflar arası varyans (siyah-beyaz sınıfları) Denklem (3.5)'deki formül ile bulunur.

$$\sigma_w^2(t) = w_1(t) \sigma_1^2(t) + w_2(t) \sigma_2^2(t) \quad (3.5)$$

Denklem (3.5)'de w , t eşikleme değeri ve σ varyansı ile ayrılan iki sınıfın gelme olasılığıdır. Otsu bize sınıf içi varyansın maksimize edilmesi ile minimize edilmesinin aynı olduğunu gösteriyor [40].

$$\sigma_b^2(t) = \sigma^2 - \sigma_w^2(t) = w_1(t)w_2(t) [\mu_1(t) - \mu_2(t)] \quad (3.6)$$

Denklem (3.6)'da w : sınıfların olma olasılığıdır ve Denklem (3.7)'deki formül ile hesaplanır.

$$w_1(t) = \sum_{i=0}^t P(i) \quad (3.7)$$

Denklem (3.6)'de μ : sınıf ortalamalarını temsil etmektedir ve Denklem (3.8)'deki formül ile hesaplanır.

$$\mu_1(t) = \left[\sum_{i=0}^t P(i) x(i) \right] / w_1 \quad (3.8)$$

3.3. Dairesel Hough Dönüşümü

Hough dönüşümü belirli noktaları bilinen şekillerin özelliklerini çıkarma konusunda etkili bir yöntemdir. Dairesel Hough Dönüşümü (DHD) ise yuvarlak veya elipsel nesnelerin tespitinde kullanılan bir özellik çıkarma tekniğidir. Dairesel olması bakımından Hough dönüşümünün özelleştirilmiş halidir. DHD'nin en önemli avantajı görüntü içerisinde daire olma olasılığı olan veya ortalama yarıçapı belli şekilleri kolayca ayırt edebilmesidir. Spermin başları dairel bir şekle sahip olduğu için bu tezde hücre tespiti için dairel Hough dönüşümü ile segmentasyon yapılmıştır.

Harvey Rhody [42]'de dairel Hough dönüşümü ile yuvarlak şekillerin tespiti için aşağıdaki adımları önermiştir:

1. Görüntü üzerindeki kenarlar çıkarılır.

2. Belirli bir eşikleme değeri ile görüntü ikili (siyah-beyaz) forma dönüştürülür.
3. Eşikleme sonrası ortaya çıkan kenarlardaki her piksel için, muhtemel dairedeki merkez koordinat değerleri bir akümülatör matrisi ile hangi daireye ait olduğu ile ilgili yönelik tahmin değeri atanır.
4. Akümülatör matrisindeki tahmin değeri yüksek şekiller belirlenerek özellik çıkarma işlemi tamamlanmış olur.

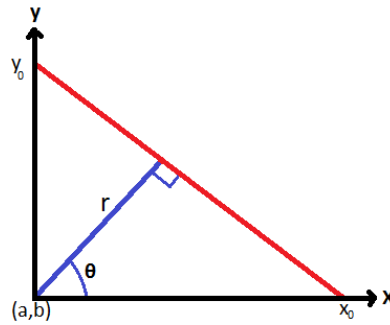
Görüntü üzerinde aranan sperm başlarının şekli genel olarak dairesel olduğu için kullanılan akümülatör matrisini oluşturmada dairenin merkezi noktaları (a,b) ve yarıçapı r olmak üzere üç etken baz alınır. Segmentasyon için yarıçap bilgileri ile hedef, Denklem (3.9)'daki gibi bulunabilir [42]:

$$r^2 = (x_0 - a)^2 + (y_0 - b)^2 \quad (3.9)$$

$$x_0 = a + r * \sin(\theta) \quad (3.10)$$

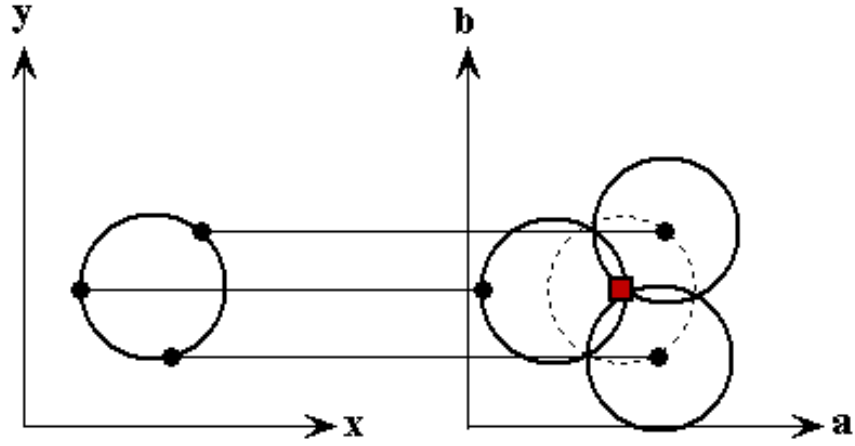
$$y_0 = b + r * \cos(\theta) \quad (3.11)$$

Denklem (3.9)'da a ve b çemberin merkezini, r yarıçapı, x_0 ve y_0 ise görüntüdeki piksellerin konum bilgilerini ifade etmektedir. Açı değeri $0-2\pi$ aralığında değiştirildiğinde bir pikselin herhangi bir yarıçap değeri ile bir dairenin içinde yer alıp almadığı anlaşılabilir [42].



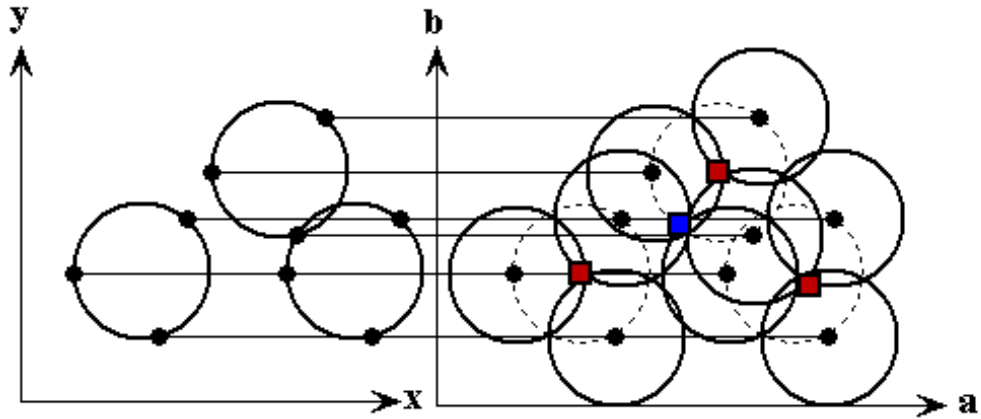
Şekil 3.4. Hough Dönüşümü ile (x,y) Düzleminden r Uzunluğunun Çıkarılması

Şekil 3.4.'de (x,y) düzlemindeki bir dairenin kenarındaki tüm noktalar bir dairenin merkezi olarak belirlendiğinde oluşan (a,b) boyutundaki dairelerin kesişme noktası bize (x,y) düzlemindeki merkez noktayı verecektir. Şekil 3.5'de (x,y) düzlemi için (a,b) düzlemindeki kesişme noktası kırmızı nokta ile belirlenmektedir.



Şekil 3.5. (x,y) Düzlemindeki Çember İçin (a,b) Merkezli Çemberler [42]

Aynı yarıçaplı birden fazla daire de aynı teknikle bulunabilir. Şekil 3.6’da merkez noktalar kırmızı noktalarla temsil edilmektedir. Dairelerin birleşme noktaları merkez nokta olarak alınırken bazı sahte noktalar da belirlenebilir. Şekil 3.6’da mavi nokta ile belirlenmiş bir sahte merkez görülmektedir. Bu sahte noktalar orijinal görüntü ile karşılaştırılarak kaldırılabilir.



Şekil 3.6. Birden Fazla ve İç içe Geçmiş Dairelerin Tespiti [42]

3.4. VIBE Algoritması

VIBE (Visual Background Extractor), ilk olarak IEEE ICASSP 2009 konferansında sunulmuş ve daha sonra yayınlanan makalelerle geliştirilmiş çok güçlü bir arka plan çıkarma algoritmasıdır. Daha kesin ifadeyle, bir videodaki hareketli

nesnelerden arka planı çıkaran bir yazılım modülüdür. Sperm kalite parametrelerinin ölçülmesi için hareketli hedeflerin takibi yapılmalıdır. Bu tez çalışmasında, hareketli hedeflerin takibinde hareketsiz arka planın çıkarımı için VIBE algoritması kullanılmıştır.

VIBE algoritması C programlama dili ile yazılmıştır ve CPU, GPU ve FPGA içerisine gömülebilmektedir [43]. Bu sayede platform bağımsız çalışabilmektedir. Bu da VIBE algoritmasının bu tez çalışması için tercih edilmesindeki temel sebeplerden biridir. Tez çalışmasında geliştirilmiş olan sistem Windows işletim sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir.

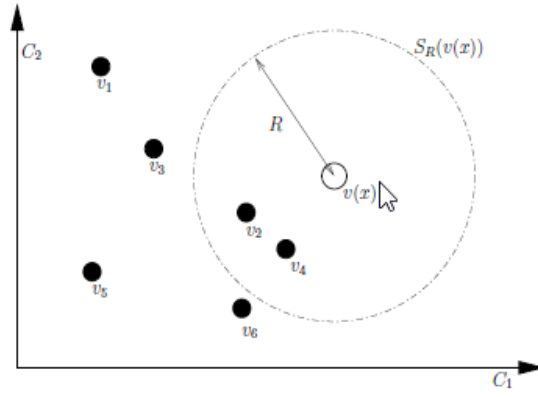
Arka plan çıkarma teknikleri gerçek uygulamalarda başarılı olabilmek için şu üç hususla uğraşmak zorundadır: (1) Model nedir ve nasıl davranır? (2) Bu model nasıl başlatıldı? (3) Bu model zaman içerisinde nasıl güncellendi? VIBE bu soruların hepsine başarılı cevaplar vermektedir [44].

3.4.1. Piksel Modeli Oluşturma ve Sınıflandırma İşlemi

Birçok gelişmiş teknik arka plan çıkarımında olasılık yoğunluk fonksiyonundan faydalanır. Ancak VIBE daha farklı bir yöntem sunmaktadır. Bu yöntemde göre görüntü üzerindeki gerçek piksel değerlerinden bir model oluşturulur. Görüntü üzerinde x noktasındaki pikselin Öklid renk uzayındaki değeri $v(x)$ olarak alalım. Arka plan örnek değerleri olarak i tane örnek için v_i tanımlanmış olsun. Her arka plan pikseli için bir önceki görüntü karesinden N adet arka plan örneği oluşturulur [44]:

$$M(x) = \{v_1, v_2, \dots, v_N\} \quad (3.12)$$

Bir $v(x)$ notasındaki pikseli $M(x)$ 'e göre sınıflandırmak için $v(x)$ 'in merkez nokta olduğu ve R yarıçaplı $S_R(v(x))$ küresi içerisine giren en yakın örnekle karşılaştırılır. Eğer bu kürenin kesişim kümesinin eleman sayısı ve $M(x)$ örnek modelinin toplamı belirli bir eşik değerinden büyükse veya eşitse bu nokta arka plan sınıfına dâhil olur [44].



Şekil 3.7. Piksel Değerinin Bir Örnek Kümesi ile Karşılaştırılması [44]

3.4.2. Arka Plan Modelini Başlatma

Literatürde yer alan birçok popüler arka plan çıkarma tekniği arka plan piksellerinin zamansal dağılımını tahmin etmek için önemli miktarda veri toplamayı gerekli kılar. Böylece kendi modellerini başlatmak için onlarca görüntü karesine ihtiyaç duyarlar [44]. İstatiksel bakış açısı ile bakıldığında bu yaklaşım mantıklıdır. Ancak VIBE arka plan modelini daha kısa bir yolla başlatabilmektedir. VIBE yaklaşımı ile sadece bir görüntü karesi ile model başlatılabilir.

Sadece bir görüntü karesinde zamansal bir bilgi olmadığı için, VIBE komşu piksellerin zamansal dağılımından faydalanır. Her pikselin uzamsal komşuluklarında bulunan değerlerle piksel modeller doldurulur. Böylece ilk görüntü karesi için modelleme başlatılmış olur. Bundan sonraki aşamalar artık güncelleme işlemidir. Arka plan modelini başlatma işlemi $t=0$ anında Denklem (3.13)'de formüle edilmiştir.

$$M^0(x) = \{v^0(y) \mid y \in N_G(x)\} \quad (3.13)$$

Denklem (3.13)'de $v^0(y)$ önceden belirlenmiş örnek sınıfını, $N_G(x)$ x pikselinin uzamsal komşuluk değerlerini temsil etmektedir.

3.4.3. Arka Plan Modelini Güncelleme

Arka plan modeli için $t=0$ olduğu anda ilk görüntü karesi ile bir başlatma işlemi yapıldıktan sonra gelen her görüntü karesi için bir güncelleme işlemi yapılır. Her ne kadar tek görüntü karesi ile başarılı bir başlatma işlemi yapılıyor olsa da birinci

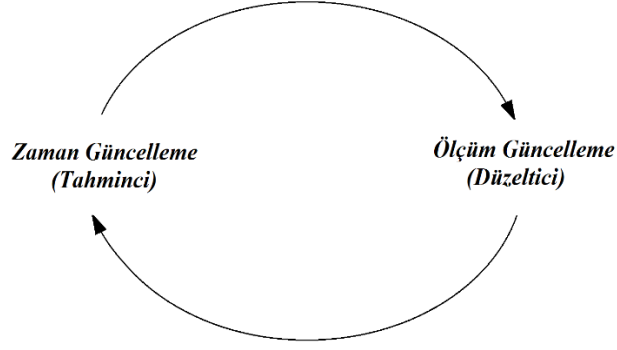
görüntü karesinden sonra gelecek görüntüler için defalarca aynı işlemi yapmak yerine bir güncelleme yoluna gidilebilir. Bu işlem ışık değişimleri ve yeni objelerin sahneye girmesi ile yaşanabilecek problemleri de ortadan kaldırmaktadır. Arka plan modeli güncelleme, ilk görüntüde elde edilen modelin komşuluk değerlerini ikinci görüntüde kullanarak yeni bir model oluşturma esasına dayanır. Oluşturulan yeni model ile sınıflandırma işlemi yapılarak hangi pikselin arka plan pikseli olduğuna karar verilir. Oluşturulan yeni model bir sonraki görüntüde yeni bir model oluşturmak için kullanılır. Bu şekilde son görüntüye kadar devam edilir [44].

3.5. Kalman Filtresi

Kalman filtresi, lineer ikinci dereceden denklem problemleri için bir tahminci algoritmadır. Tahmin algoritması tabanlı bir özyinelemeli durum uzayı modeli de diyebiliriz. 1960 yılında Rudolph E. Kalman tarafından [45]'de ortaya atılmıştır. Bu tez çalışmasında arka plan çıkarımı ile tespit edilen hedeflere etiket ataması işleminde Kalman filtresi kullanılmıştır.

Kalman filtresi temel olarak tek boyutlu ve gerçek zamanlı, beyaz Gauss gürültüsü ile bozulmuş lineer sistemlerle ilişkili sinyaller için geliştirilmiştir. Kalman filtresi yaklaşımı, doğrusal filtreleme problemine en uygun ardışıl çözümü getirmiştir. Ardışıl çözümü hesaplamak için durumun güncellenen kestirimi, önceki durum kestirimi ve yeni giriş verileri kullanılır. Bunun için sadece önceki durum kestiriminin saklanması yeterlidir.

Kalman bir süreci geribildirim kontrolü ile tahmin eder. Kalman filtresi için denklemler iki grup altında incelenir: Zaman güncelleme denklemleri, ölçüm güncelleme denklemleri. Zaman güncelleme denklemleri mevcut durumu yansıtmakla ve mevcut durumun ve hatanın kovaryans matrislerini bir sonraki zaman taşımakla sorumludur. Ölçüm güncelleme denklemleri, önceki durumdan elde edilen yeni ölçümün geribildirimini yapmakla sorumludur. Zaman güncelleme denklemleri kehanette bulunur, ölçüm güncelleme denklemleri ise düzeltici görev üstlenir. Sonuç olarak Kalman filtresi tahminci-düzeltilici döngüsü ile çalışan bir algoritmadır.



Şekil 3.8. Ayırık Kalman Filtresi Döngüsü

Kalman, ayırık zaman kontrollü bir sürecin $x \in R^2$ durumunu Denklem (3.14)'deki lineer fark denklemi ile tahmin eder [45]:

$$x_k = Ax_{k-1} + Bu_{k-1} + w_{k-1} \quad (3.14)$$

z ölçme eşitliği ise aşağıdaki denklem ile ifade edilir:

$$z_k = Hx_k + v_k \quad (3.15)$$

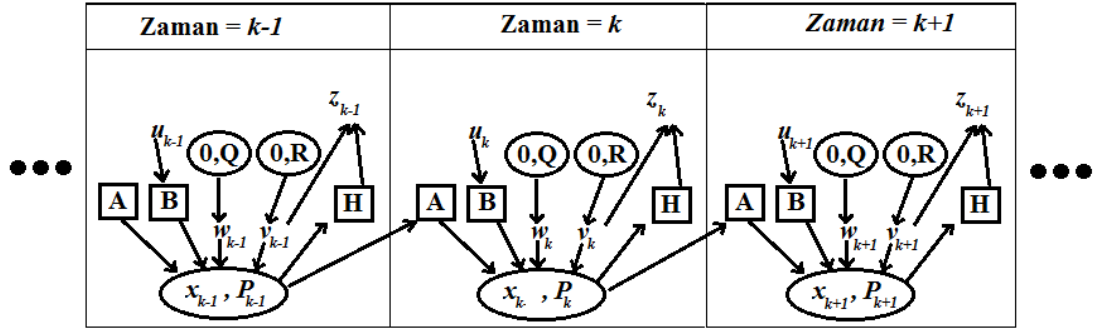
Denklem (3.14)'de w_k süreç için Q_k (kovaryans) ile sistem gürültüsünü (hata) ifade eder ve $w_k \sim N(0, Q_k)$ şeklinde ifade edilir. A matrisi, x_{k-1} durumunu $k-1$ zamandan k zamana taşıyan matristir. B ise opsiyonel kontrol girişi olan u 'nun x durumu ile ilişkisini sağlayan matristir. Denklem (3.15)'de v_k ölçüm değeri için R_k (kovaryans) ile sistem gürültüsünü (hata) ifade eder ve $v_k \sim N(0, R_k)$ şeklinde ifade edilir. z_k , k . zamanda gözlemlenen çıkış vektörüdür. H ölçüm değeri geçiş matrisidir. w_k ve v_k birbirinden farklı ve birbirleriyle ilişkisi olmayan matrislerdir. Önceki (priori) durumun kovaryans matrisi Denklem (3.16)'daki gibidir.

$$P_k^- = E[e_k^- e_k^{-T}] \quad (3.16)$$

Sonraki (posteriori) durumun kovaryans matrisi Denklem (3.17)'deki gibidir.

$$P_k = E[e_k e_k^T] \quad (3.17)$$

Şekil 3.9’da Kalman filtresinin modeli gösterilmiştir. $k-1$. zamandan k . zamana geçildiğinde $k-1$. adımda elde edilen bilgilerin bir sonraki adıma aktarıldığı görülmektedir.



Şekil 3.9. Kalman Filtresi Modeli

3.6. Macar Algoritması

Macar algoritması atama (assignment) veya eşleşme (matching) problemini çözmek için Macar araştırmacı Harold Kuhn tarafından 1955 yılında geliştirilmiş bir algoritmadır [46]. Macar algoritması $2n$ tepeli bir tam iki parçalı (bipartite) graf için atama problemini $O(n^3)$ aritmetik işlemle çözer. Bu tez çalışmasında hareketli hedeflere etiket atama işleminde karşılaşılan çakışma problemlerinde Macar algoritması ile çözüm üretilmiştir.

Macar algoritmasını anlatmadan önce atama probleminden bahsetmek gerekir. Atama problemleri hareket analizi yapan araştırmalarda en çok karşılaşılan problemlerdendir. Atama probleminde, k adet hedef ve bu hedefe ulaşması için de k ayrı birey bulunmaktadır. k birey içinde i . bireyin j . hedefe verilmesi durumunda c_{ij} maliyeti oluşmaktadır. Her hedefe mutlaka bir bireyin atanması ve bir bireyin sadece tek bir hedefe atanması şartıyla toplam maliyeti en az olan bir görevlendirme planı oluşturulması istenir. Başka bir deyişle, en az maliyeti oluşturacak birey-hedef eşleşmesinin bulunması beklenmektedir [47].

Problemin çözümü için ilk olarak mevcut durum $n \times n$ bir matris formunda tanımlanır:

$$\begin{bmatrix} x_1 & x_2 & x_3 & x_4 \\ y_1 & y_2 & y_3 & y_4 \\ z_1 & z_2 & z_3 & z_4 \\ w_1 & w_2 & w_3 & w_4 \end{bmatrix}$$

Yukarıdaki matriste a,b,c,d işçileri ifade eder. 1,2,3,4 değerleri ise görevleri ifade eder. Matris kare olduğu için her işçi sadece bir görev alabilir. Macar algoritması bu problemi dört adımda çözmektedir:

Adım-1: Öncelikli hedef indirgenmiş matris elde etmektir. İndirgenmiş matrisi oluşturmak için maliyet matrisindeki her satırdaki en küçük değere sahip eleman, tüm elemanlardan çıkarılır.

Çizelge 3.1. Macar Algoritması 1.Adım

0	x_2'	x_3'	x_4'
y_1'	y_2'	y_3'	0
z_1'	0	z_3'	z_4'
w_1'	w_2'	0	w_4'

Adım-2: Maliyet matrisinin satırlarındaki çıkarma işlemi bittikten sonra sütunlardaki tüm elemanlardan en küçük değere sahip eleman çıkarılır.

Çizelge 3.2. Macar Algoritması 2.Adım

0	x_2'	x_3'	x_4'
y_1'	y_2'	y_3'	0
0	z_2'	z_3'	z_4'
w_1'	0	w_3'	w_4'

Adım-3: Bu adıma ulaşmış olan matris indirgenmiş matristir. Elde edilen matris üzerinde, sıfır olan elemanların bulunduğu satırlar ve sütunların üzeri çizilir. Çizilen satır ve sütunların en az sayıda olması beklenir. Üzeri çizilen satır ve sütun sayısı k (maliyet matrisinin boyutu) sayısına eşitse en iyi atama yapılmış demektir ve işlem durdurulur, eşit değilse Adım-4'e gidilir.

Çizelge 3.3. Macar Algoritması 3.Adım

$\times$				
$0'$	x_2'	x_3'	x_4'	$\times$
y_1'	y_2'	y_3'	$0'$	
0	z_2'	z_3'	z_4'	$\times$
w_1'	$0'$	0	w_4'	

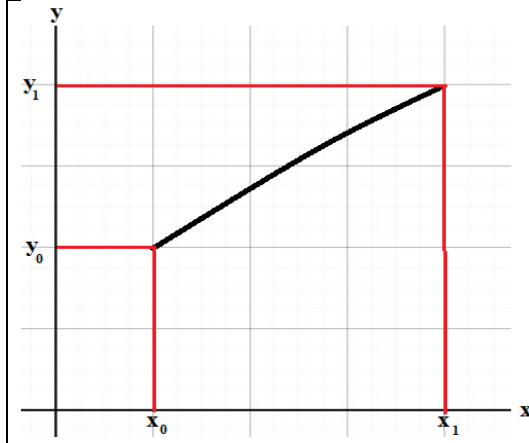
Adım-4: Satır ve sütunların üzeri çizildikten sonra üzeri çizilmeyen elemanlar varsa bunlar bulunur. Bu elemanlar içinde değeri en küçük olan eleman seçilir. Seçilen bu değer üzeri çizilmeyen tüm elemanlardan çıkarılır. Aynı zamanda üzerinden iki defa çizgi geçmiş tüm elemanlara da eklenir. Son adımda yeniden bir indirgenmiş matris elde edilecektir. Elde edilen bu indirgenmiş matris ilemek üzere Adım-3'e dönülür.

Macar yönteminin basit bir yöntemle çözüm üretmesi işlem zamanı ve sayısı açısından çok önemlidir. Bu yöntemle doğrudan maliyet matrisi üzerinde işlem yapılmaktadır. Böylece bilgisayar hafızası ihtiyacını oluşturan sanal değişkenlerin eklenmesi ve dejenerasyon sorunu ile uğraşmaz.

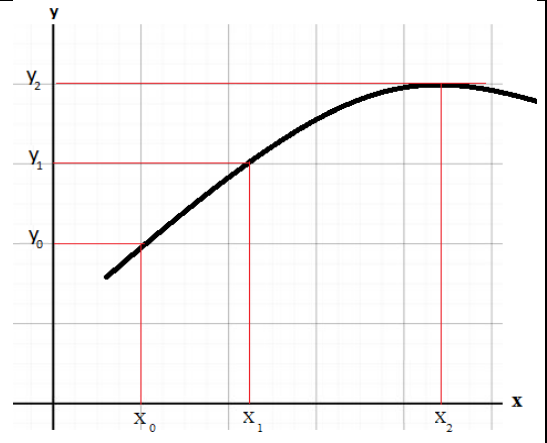
3.7. Lagrange İnterpolasyonu

Lagrange interpolasyonu bir polinom interpolasyonu ve eğri uydurma işlemi olarak ifade edilebilir. Yöntem adını 1795'de yayınlanan bir makale ile Joseph Louis Lagrange'dan almıştır [48]. Bu tez çalışmasında hareketli hedeflerin izlediği yol bilgilerinin ayrık zamandan sürekli zamana çevrilmesi için Lagrange interpolasyonu kullanılmıştır.

Lagrange interpolasyonu ile verilen x_i ve y_i noktalarından geçen bir doğru ya da eğri uydurulur. Uydurma işlemi ile oluşan eşitlik üzerinden istenilen noktaların değerleri hesaplanır. Polinomun derecesi nokta sayısı ile değişir. n adet nokta için uydurulacak polinomun derecesi $n - 1$ olur. Şekil 3.10'de iki noktadan uydurulmuş doğru görülmektedir. Şekil 3.11'de ise üç noktadan uydurulmuş bir eğri görüntülenmektedir.



Şekil 3.10. İki Noktadan Uydurulmuş Eğri



Şekil 3.11. Üç Noktadan Uydurulmuş Eğri

$k + 1$ veri noktası içeren bir küme olsun;

$$(x_0, y_0), (x_1, y_1), \dots, (x_j, y_j), \dots, (x_k, y_k) \quad (3.18)$$

Hiçbir x_j 'nin aynı olmadığı yerde, Lagrange formundaki polinom interpolasyonu, doğrusal bir kombinasyon gibi çalışır. Ayrık noktaların Lagrange karşılığı Denklem (3.19)'daki gibidir.

$$L(x) = \sum_{j=0}^k y_j l_j(x) \quad (3.19)$$

Denklem (3.19)'deki $l_j(x)$ baz polinomu Denklem (3.20)'daki gibi hesaplanır.

$$l_j(x) = \prod_{\substack{0 \leq m \leq k \\ m \neq j}} \frac{x - x_m}{x_j - x_m} = \frac{x - x_0}{x_j - x_0} *** \frac{x - x_{j-1}}{x_j - x_{j-1}} \frac{x - x_{j+1}}{x_j - x_{j+1}} *** \frac{x - x_k}{x_j - x_k} \quad (3.20)$$

Denklem (3.20)'da bütün x_j 'ler birbirinden farklı olduğundan her zaman için; $x_j - x_m \neq 0$ olacak ve eşitlik kusursuz bir şekilde çalışacaktır.

3.8. OpenCV

OpenCV (Open Source Computer Vision – Açık Kaynaklı Bilgisayarlı Görü) gerçek zamanlı görüntü işlemede kullanılan açık kaynak kodlu bir görüntü işleme tekniklerinin fonksiyonlar halinde barındığı kütüphanedir. İlk olarak Intel'in araştırma laboratuvarında geliştirilmiş, daha sonra robotik araştırma laboratuvarı olan Willow Garage tarafından desteklenmiş, son olarak da Itseez tarafından sürdürülmeye devam etmiştir [49]. Kütüphanede 2D ve 3D özellik araçları, görüntü analizi, robotik hareket kestirimi, histogram, renk uzayları, temel dönüşümler, filtreler, eşleştirme, kenar algılama, köşe algılama, şekil algılama, hareket tanıma, nesne algılama, nesne tanıma, hareket takibi, yüz tanıma, mobil robotik, gibi konularına dair genel fonksiyonlar bulunmaktadır.

Görüntü veya videolar üzerinde işlem yapma olanağı sağlayan OpenCV Kütüphanesi ile robotbilim, otomotiv, biyomedikal, tıp, tüketim, güvenlik, üretim ve araştırma alanları gibi birçok alanda gelişmiş uygulamalar yapmak mümkündür.

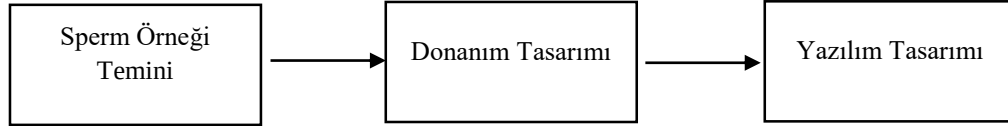
Kütüphane C programlama dilinde geliştirilmiştir. C++, C#.NET, Java, Python, Matlab gibi güncel kullanılan programlama dillerine de uyarlanmıştır. Bütün işletim sistemleri tarafından desteklenmektedir (Windows, Linux, OS, Android, iOS vb.).

Görüntü işleme üzerine çalışma yapmaya olanak sağlayan birçok geliştirme ortamı ve kütüphane mevcuttur. Ancak OpenCV'nin diğer kütüphanelerden farkı şöyle sıralanabilir:

1. Sadece bilgisayarlı görü üzerine çalışıyor olması ile büyük bir işlem ve fonksiyon tecrübesi bulunmaktadır.
2. C ile yazıldığı için endüstriyel tasarımlara da uygun çalışabilmektedir. C programlama dili ile yazılması OpenCV'ye platform bağımsızlığı yeteneği kazandırmıştır.
3. Açık kaynaklı yazılmış olması ile geliştiricilere güvenlik önlemi alma olanağı ve kod hâkimiyeti sağlamıştır.

4. SİSTEM TASARIMI

Bu tez çalışmasında tasarlanan sistem; örnek temini, donanım tasarımı ve yazılım tasarımı olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. Bu bölümde bu üç aşama için detaylı bilgi verilecektir.



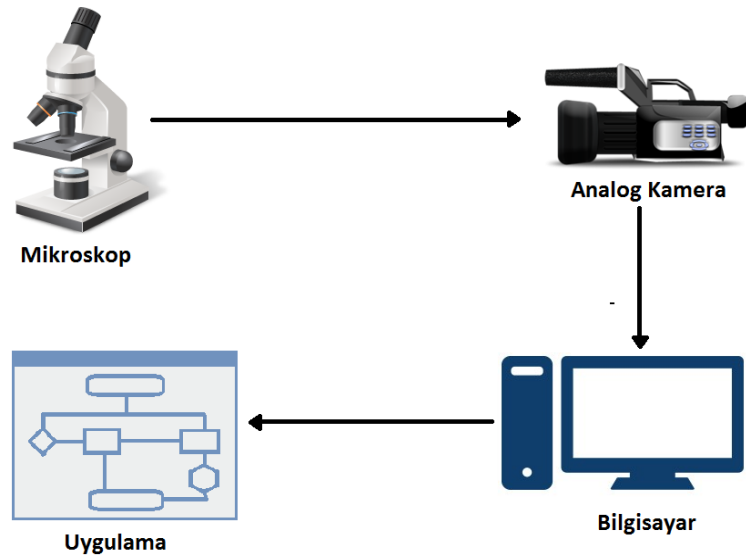
Şekil 4.1. Sistem Tasarımı

4.1. Balık Sperm Örneği Temini

Çalışmada kullanılan sperm örnekleri İnönü Üniversitesi Sürgü Meslek Yüksekokulu Su Ürünleri Araştırma Tesisinde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklardan elde edilmiştir. Üreme mevsiminde sperm örnekleri alınmış ve immotil solüsyon (sperm hücrelerinin hareketlerini engelleyici solüsyon) içerisine bırakılarak soğuk zincirde saklanmıştır. Daha sonra bu örnekler incelenmek üzere mikroskop altında aktivasyon solüsyonu eklenerek hareketlendirilmiş ve görüntü alınmıştır. Sürekli olarak sperm örneği temin edebilen laboratuvar ortamı bu sistemin geliştirilmesine büyük katkı sağlamıştır.

4.2. Donanım Tasarımı

Mikroskopta incelenen örneğin görüntüsünü kameraya aktarmak için kamera mikroskopun üzerine monte edilmiştir. Böylece mercekten gelen görüntü kameradan görüntülenebilmektedir. Montaj işleminin yapılabilmesi için mikroskop kasasının buna uygun olması gerekmektedir. Görüntülerin daha sağlıklı alınabilmesi için de analog kamera kullanılasına karar verilmiştir. Analog kameradan görüntülerin alınması için bir bilgisayara Cat5 kablo ile bağlanmış ve görüntünün bilgisayardan izlenmesi ve bir depolama aygıtına kaydedilmesi sağlanmıştır. Böylece kaydedilen bu görüntülerin bilgisayar üzerinde analizinin yapılabilmesi sağlanmıştır. Şekil 4.2’de sistemin donanım yapısı görsel olarak ifade edilmiştir.



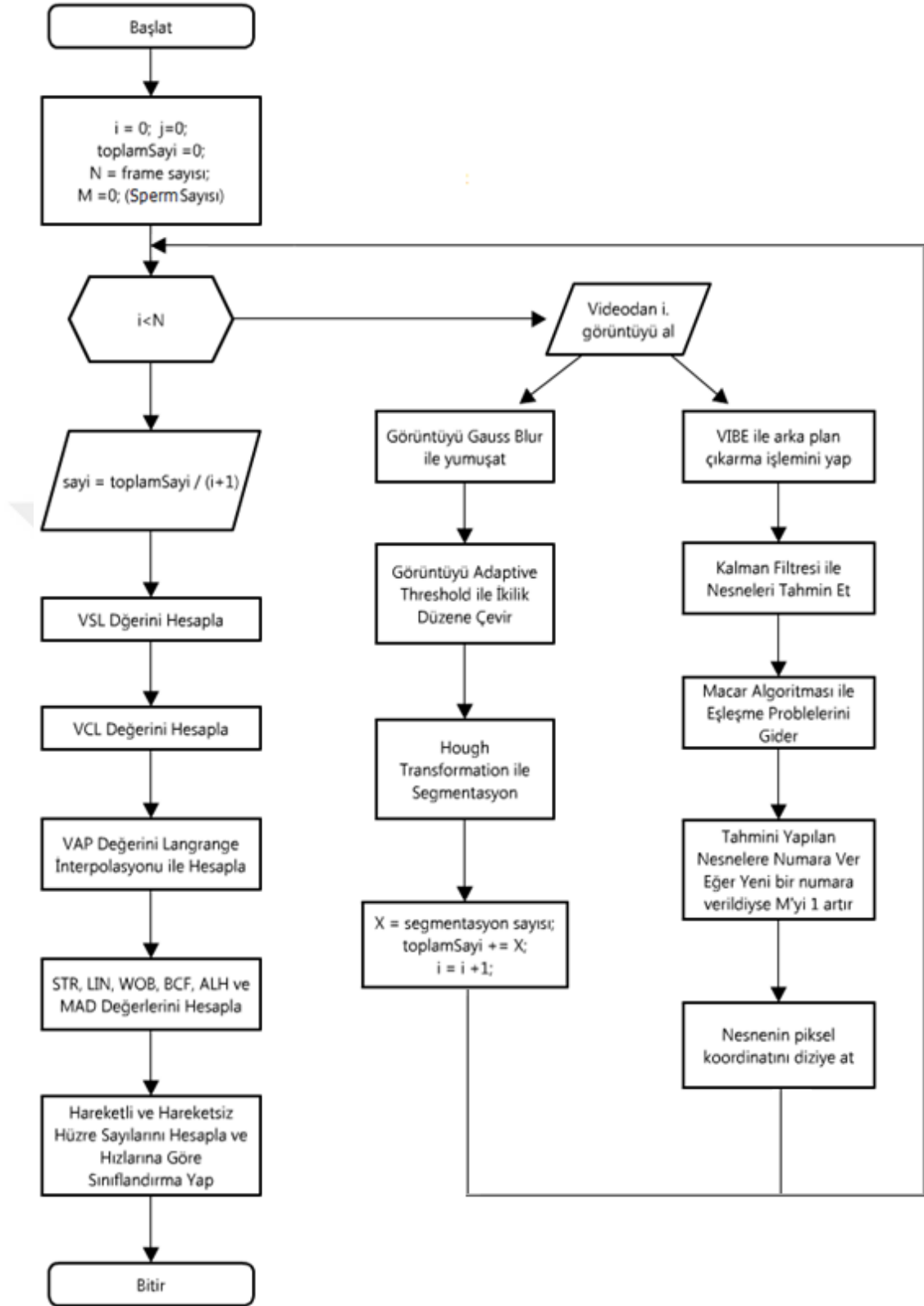
Şekil 4.2. Sistemin Donanım Yapısı

Çalışmada kullanılan mikroskop “Olympus BX53” modelidir. Bu ürünü tercih etmemizin sebepleri; 20000 saat LED aydınlatma sistemi ile ışık yoğunluğunu en iyi şekilde yöneterek parlaklığı kontrol etmesi, floresan, faz kontrastı, polarizasyon ve karanlık alan gibi çeşitli modüler ünitelere sahip olması, büyütme oranını 2x’den 100x’e kadar çıkarabilmesidir. Zira sperm hücrelerini analiz ederken kullanılan mikroskopun karanlık alan aydınlatması ve en az 20x’e kadar büyütme özelliklerinin olması gerekmektedir.

Kullanılan analog kamera “Sony Impela SNC-VB600B” modelidir. Maksimum çözünürlüğü 1280 x 1024, Maksimum kare hızı 60 FPS olabilmektedir. Çalışmada 1280x720’lik ve 30 FPS’lik videolar kullanılmıştır. Bu değerlerin sperm analizi için yeterli olduğu görülmüştür.

4.3. Yazılım Tasarımı

Bu tezle sunulan sistem, C++ ve C#.NET programlama dili ile yazılmış ve Microsoft Visual Studio 2013 ortamında geliştirilmiştir. Görüntü işleme ile ilgili yazılan kodlamalar C++ dilinde geliştirilmiştir. Mikroskoptan görüntü kaydedilmesi işlemleri, raporlama, yardım gibi bölümler C#.NET dilinde geliştirilmiştir. Yazılımın akış diyagramı Şekil 4.3’da gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Sistemin Akış Diyagramı

Yazılımın Sahte Kodu:

1. Başlat.
2. Sperm videosunu Capture metodu ile al.
3. Integer $i = 0$, $j = 0$ ve toplamSayi = 0 değerlerini tanımla.
4. Integer “N = videoda incelenecek görüntü karesi (frame) sayısı” değerini tanımla.
5. Integer M = 0 degerini tanımla.
6. Eğer $i \geq N$ ise 23. Adıma git.
7. $img = \text{Videodaki } i. \text{ görüntü karesi.}$
8. $img = \text{Gauss}(img)$ ile görüntüyü yumuşat.
9. $img = \text{AdaptiveThreshold}(img)$ ile özellik çıkarımı yap ve ikilik formata çevir.
10. $hough = \text{Hough}(img)$ ile segmentasyon yap.
11. $toplamSayi = toplamSayi + hough.size()$ - bulunan daire sayılarını topla.
12. Eğer $i = 0$ ise 22. adıma git.
13. $img2 = \text{Videodaki } i. \text{ görüntü karesi.}$
14. $img2 = \text{BacgroundSubstruction}(img2)$ - arka plan çıkarımı yap.
15. $sperm = \text{Kalman}(img2)$ – nesne tahmini yap.
16. $sperm = \text{Macar}(sperm)$ – atama problemlerini gider.
17. $M = \text{Max}(sperm.numarası)$ – son verilen numara sayısını al.
18. Integer $j = 0$ değerini tanımla.
19. Eğer $j \geq sperm.size()$ ise 22. adıma git.
20. $dizi[i,j] = \{i, sperm[j].numarası, sperm[j].XKoordinat, sperm[j].YKoordinat\}$
21. $j = j + 1$ yap ve 19. adıma dön.
22. $i = i + 1$ yap ve 6. Adıma dön.
23. Ortalama sperm sayısı = $toplamSayi / (i+1)$
24. $VSL = \text{VSLHsapla}(dizi).$
25. $VCL = \text{VCLHsapla}(dizi).$
25. $VAP = \text{VAPHsapla}(dizi).$
26. $ALH = \text{ALHHsapla}(dizi)$, $BCF = \text{tepeNoktaSayısı}.$
27. $MAD = \text{MADHsapla}(dizi).$
28. $STR = VSL / VAP$, $LIN = VSL / VCL$, $WOB = VAP/VCL$ değerlerini hesapla
29. Hareketli hücrelerin sınıflandırmalarını yap.
30. Bitir.

4.3.1. Sperm Sayımı

Sperm sayımı için videodaki tüm karelerden faydalanılmıştır. Tüm karelerdeki hücre sayısı ortalaması alınarak sperm sayımı için bir tahminde bulunulmuştur. Merceğin baktığı noktadaki sperm yoğunluğu lamel üzerindeki örneğin her bölmesinde aynı olmayabilir. Ancak spermiogram ile ilgilenen uzmanlar özel solüsyonlar kullanarak sperm yoğunluğunu olabildiğince dağıtabilmektedirler. Bu sayede bu tahmin gerçeğe daha yakın olabilmektedir. Ayrıca merceğin baktığı açı da genişletilerek (20X yerine 10X mercek ile gözlem yapmak) daha homojen bir yapıda inceleme yapılmış olacaktır.



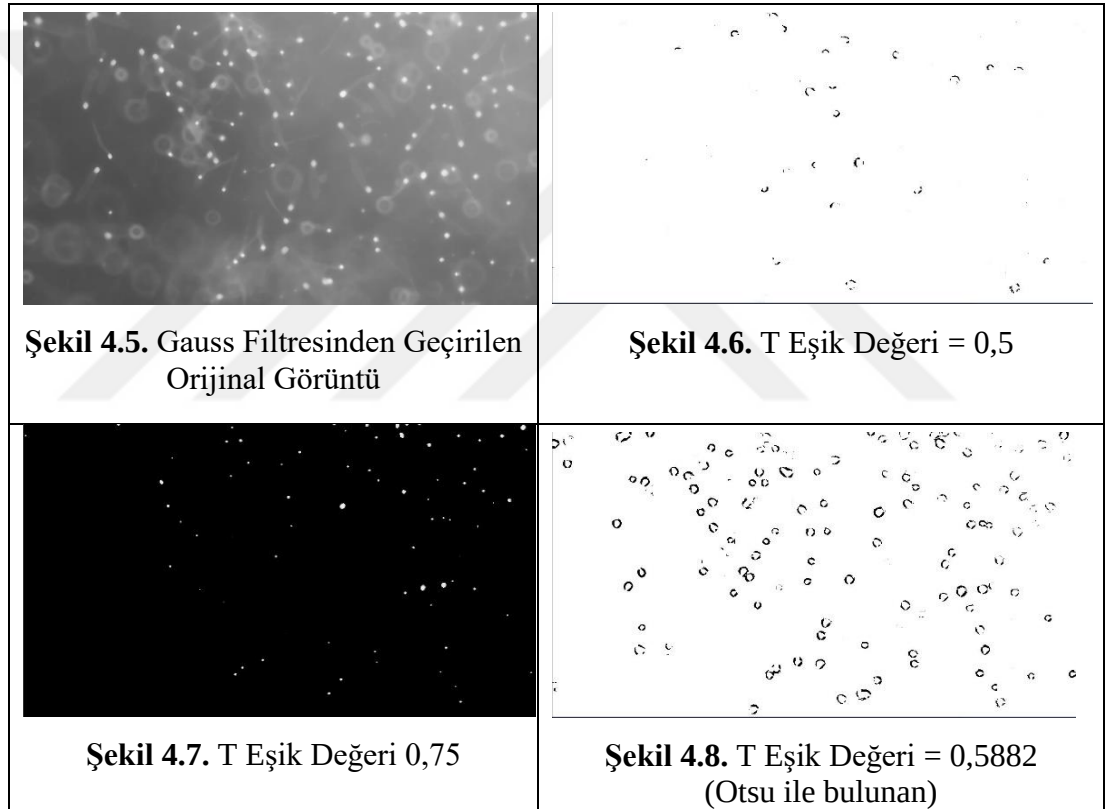
Şekil 4.4. Örnek Sperm Video Görüntüsü

Sperm Sayımı için videodan alınan ve bir örneği Şekil 4.4’de gösterilen her görüntü için aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

1. Görüntü gri formata çevrilmiş ve Gauss filtresi uygulanmıştır. Görüntüye Gauss filtresi uygulanması Şekil 4.5’de gösterilmiştir.
2. Gauss ile filtrelenen görüntü Otsu metodu kullanılarak adaptif eşikleme ile ikilik (binary) formata çevrilmiştir. Eşikleme ile siyah beyaza çevrilen görüntü Şekil 4.8.’de gösterilmiştir.
3. Elde edilen ikilik formattaki resim üzerindeki hücre olamayan nesneleri temizlemek için balık spermine uygun olan karakteristik özelliklere göre Erosion ve Dilation işlemleri uygulanmıştır.

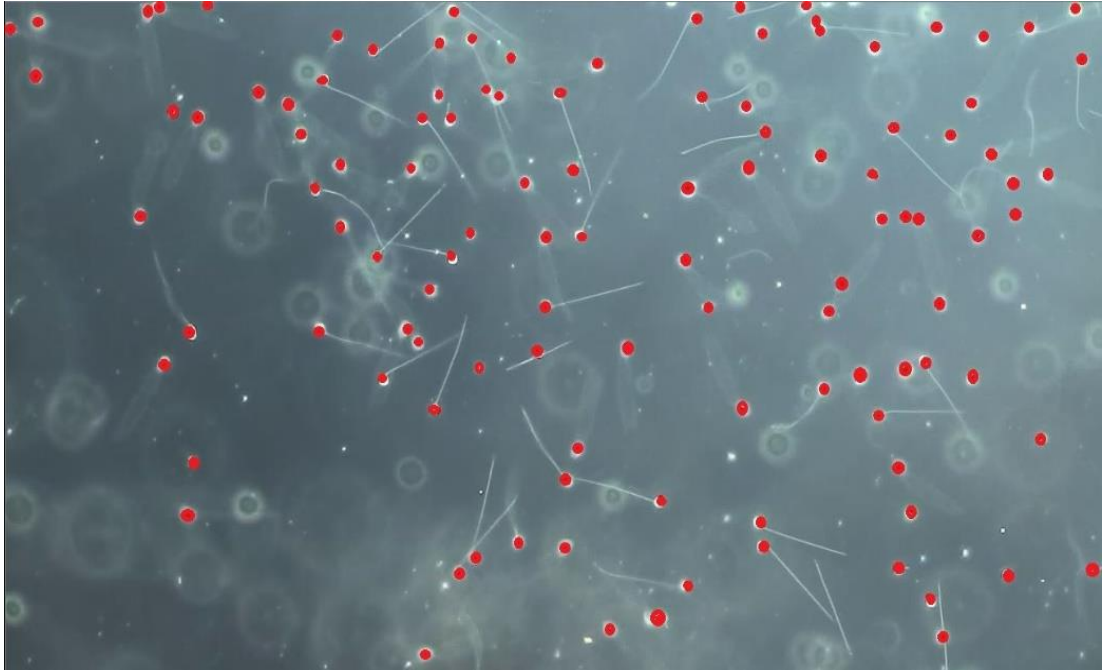
4. Elde edilen görüntü üzerinde Dairesel Hough Dönüşümü ile segmentasyon yapılmış ve sperm başları tespit edilecektir.
5. Segmentasyon sonunda elde edilen daire bilgileri ile sayım yapılmıştır.
6. Tüm karelerde sayım yapıldıktan sonra ortalama alınmış ve nihai sayı elde edilmiştir.

Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gauss filtresinden geçirilmiş sperm hücrelerine ait görüntünün hangi T eşik değerinde nasıl bir sonuçla siyah-beyaz resim formatına dönüştürüldüğünü aşamalı olarak görebiliriz. Adaptif Otsu eşikleme kullanıldığında daha uygun formlar elde edilebildiği görülmektedir.



İkilik formata dönüştürüp, adaptif eşikleme ile hücrelerin daha belirgin hale getirildiği görüntümüz üzerinde artık segmentasyon işlemini yapabiliriz. Sperm hücreleri şekil itibariyle daireseldir. Bu sebeple Hough dönüşümü kullanılarak görüldü üzerinde bölütleme yapılmış ve dairesel noktaların yeri belirlenmiştir. Hough dönüşümünü ile segmente edilen dairelerin yarıçap aralığını belirlemek mümkündür. Bu sayede sperm hücresi olmayan kirli zemin veya solüsyon maddelerinin elenmesi sağlanabilmektedir.

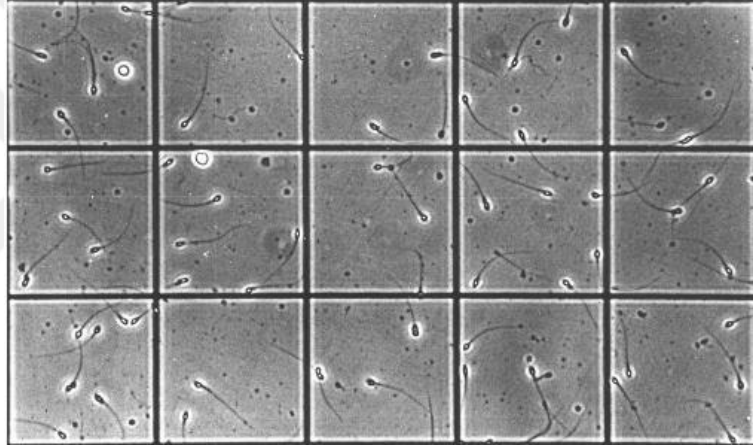
Sperm hücrelerinin baş bölgesi genel olarak belirli aralıklarda yarıçapa sahiptir. Bu aralık deneme yanılma yöntemi ile saptanmış ve dairesel Hough dönüşümünde otomatik tespit için parametrik bir değer oluşturmuştur. Dairesel Hough dönüşümü uygulandıktan sonra görüntü üzerinde, gönderilen parametrik aralığa uyan yarıçaptaki daireler bir liste halinde geri gönderilir. Bu listede her bir satırdaki ilk iki değer dairenin x ve y koordinatında bulunduğu noktanın değerleri, üçüncü değer bulunan dairenin yarıçap değerini, son değer ise daireye benzeme oranını temsil etmektedir. Hough ile elde edilen listede sperm hücresi olmayan çok fazla merkezi noktanın oluştuğu görülmüştür. Bu noktalar aslında aynı daire içinde bulunan pikseller farklı benzeme oranları ile yapılmış segmentasyon bilgileridir. Aslında merkezi noktası kendi daireleri içine giren bu noktaları elemek için bir eşik değeri ile benzeme oranı karşılaştırılmış ve eşik değerden düşük olan benzeme oranına sahip nesneler listeden çıkarılmıştır. Eşik değeri öncelikle rasgele seçilmiş ardından deneysel sonuçlarla belirli bir sayı elde edilmiştir. Benzeme oranı düşük olan bu hücrelerin listeden çıkarılması ile nihai liste elde edilmiş olur. Oluşan listede bulunan şekillerin x ve y düzlemindeki merkez koordinat bilgileri ve dairenin yarıçapı bilgileri bir sonraki aşamada kullanılmak için gönderilir. Son olarak listedeki bilgilerden yola çıkılarak Şekil 4.9'deki gibi gerçek görüntü üzerinde bulunan hücreler renklendirilmiştir.



Şekil 4.9. Dairesel Hough Dönüşümü ile Sayılmış Sperm Görüntüsü

Alınan tek bir kareden toplam sperm sayısı tahmini yapmak her zaman doğru sonuçlar üretmeyecektir. İşlemin doğruluk oranını artırmak için birim kareye düşen sperm sayısının homojen olarak dağılması beklenir. Bu durumu sağlamak için özel karışımlarla elde edilen aktivasyon solüsyonları kullanmak gerekir [1]. Yapılacak bir diğer işlem de görüş açısını genişletmektir. Bu sayede daha çok alana bakarak daha homojen bir sayım sağlanabilir.

Toplam sayı tahmini için öncelikle baktığımız karenin boyutunu bilmeliyiz. Genişlik ve yüksekliği bilinen bu alan için bilinen sayı 1mm²'lik alanda ne kadar sperm hücresi olabileceğine dair bir fikir verecektir. Görüntü alanının boyutunu öğrenebilmek için Makler sperm sayma kamarası kullanılmıştır [36]. Şekil 4.10'da Makler sperm sayma kamarası kullanılarak alınmış bir görüntü bulunmaktadır.



Şekil 4.10. Makler Sperm Sayma Kamarasından Alınan Görüntü

Makler sperm sayma kamarası ile bakılan alanda boyutu sabit kareler görülmektedir. Bu da genişlik ve uzunluk olarak niceliği belirlenmiş bir alana baktığınız anlamına gelmektedir. Makler ile alınan görüntüde her bir kare 25 µm'dir. Bu sayede toplam görüntülenen çerçevenin µm birimi ile genişliği ve uzunluğu belirlenmiştir. Alınan görüntünün 1280x720 piksellik görüntü olduğunu düşünecek olursak bir pikselin boyutu aşağıdaki gibi olacaktır:

$$piksel\ boyutu = \frac{1280}{genişlik} \quad (4.1)$$

Denklem 'de bir pikselin boyutunu elde ettikten sonra görüntülenen alanın derinliğinin de bilinmesi gerekmektedir. Bu derinliği belirlemenin iki yolu vardır: Derinliği sabit

lameller kullanmak veya derinliği sabitleştiren solüsyonlar kullanmak. Bu verilerle bir hacim bilgisi elde edilebilecektir.

$$hacim = Genişlik \times Uzunluk \times Derinlik \quad (4.2)$$

Denklem (4.2)'de genişlik, uzunluk ve derinlik bilgileri milimetreye çevrilerek hesaplama yapılır. Son olarak elde edilen hacim değeri milimetre³ birimi ile ifade edilir. Bu değeri mililitreye dönüştürölerek 1 mililitreye düşen sperm sayısı hesaplanır. Bir mililitreye düşen toplam sperm sayısını etkileyen unsurlardan biri de seyreltme oranıdır. Kullanılan solüsyondaki seyreltme oranı kadar hücre dağılımı yaşanacağı için seyreltme yapılmadığında gözlemlenen bölgede seyreltme oranı katı kadar hücre görölüntölenecektir. Bu da tespit işlemini daha zor hale getirecektir. Seyreltme (S) oranı da denkleme eklendiğinde 1 mililitredeki toplam sperm sayısı tahmini şu şekilde formölle edilebilir:

$$T = \frac{N}{H} \times S \quad (4.3)$$

Denklem (4.3)'de; T toplam tahmini sperm sayısını, N bir karede tespit edilen sperm hücresi sayısını, H görölüntölünen karenin mililitre cinsinden hacmini, S ise aktivasyon solüsyonunda belirlenen seyreltme oranını temsil etmektedir. Örnek olarak; görölüntölünen karenin hacminin 0,00000648 ml olduğu, seyreltme oranının 1000 kat olduğu, görölüntölünen karelerde tespit edilen ortalama sperm hücresi sayısının 200 olduğu bir ortamda toplam tahmini sperm sayısı şöyle olacaktır:

$$T = \frac{200}{0,00000648} \times 1000 \cong 30 \times 10^9$$

Bir mililitrede bulunan toplam sperm sayısı tahmini için yapılan bu çalışma WHO standartlarına uygun olarak geliştirilmiştir [3].

4.3.2. Çoklu Sperm Takibi

Sperm görölüntölülerinden analiz yapabilmek için video görölüntölülerdeki bütün hareketli hücrelerin takip edilmesi gerekmektedir. Bir videoda FPS özelliklerine ve video süresine göre belirli sayıda görölüntöl karesi vardır. Sperm analizi yapabilmek için tüm kareleri incelemek doğru sonuçlar üretmeyecektir. Doğru analiz yapabilmek için

belirli sayıda görüntü incelemek daha net sonuçlar üretecektir. Canlı türüne göre spermiler aktive olduktan sonra çok uzun veya çok kısa bir süre içinde hareketliliklerini kaybetmektedirler. Genel olarak aktivasyonun hemen başında çok hızlıdır. Bu örnekten örneğe değişen bir hâl de alabilir. Kimi örnekte aktivasyondan birkaç saniye sonra hareketlilik artmaya başlamaktadır. Doğru sonuçlar üretebilmek için incelenecek saniye aralığını belirlenebilmelidir. Bununla beraber incelenen kare sayısı arttıkça analiz işlemi de gereksiz bir şekilde uzamaktadır. Bu sorunları gidermek için yazılıma analizin başlanacağı saniye ve kaç görüntünün inceleneceği bilgisi parametrik olarak gönderilmektedir. Böylece kullanıcı istediği aralıkta örnek alabilecektir.

Sperm analizi yapabilmek için kalite parametrelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Kalite parametreleri genel olarak hareketlilik ve hız verilerinin saptanması ile belirlenebilmektedir. Hareket ve hız bilgilerinin elde edilebilmesi için sperm görüntüsündeki her hücre ayrı ayrı takip edilmeli ve geçtiği noktalar belirlenmelidir. Sperm hücresi takibi için bu çalışmada aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

1. Adım: Görüntü üzerinde VIBE algoritması ile arka plan çıkarımı yapılmıştır. Çoklu nesne takibi yapabilmek için arka plan çıkarımının sağlam ve kararlı çalışması gerekmektedir. Bu anlamda VIBE algoritması son yıllarda geliştirilen en iyi arka plan çıkarımı algoritmalarından birisi olması sebebiyle bu çalışmada tercih edilmiştir.

2. Adım: Arka plan çıkarımının ardından Kalman Filtresi kullanılarak nesne tahmini ve etiket atama işlemi yapılmıştır. Nesne tahmininden kasıt bir önceki karedeki bilgilerden yola çıkılarak bir tahmin yapılmasıdır. Yani hareketli nesnelerden x_i , nesne k . karede nerede ve $k+1$. karede nerede sorularına cevap üretilmiştir.

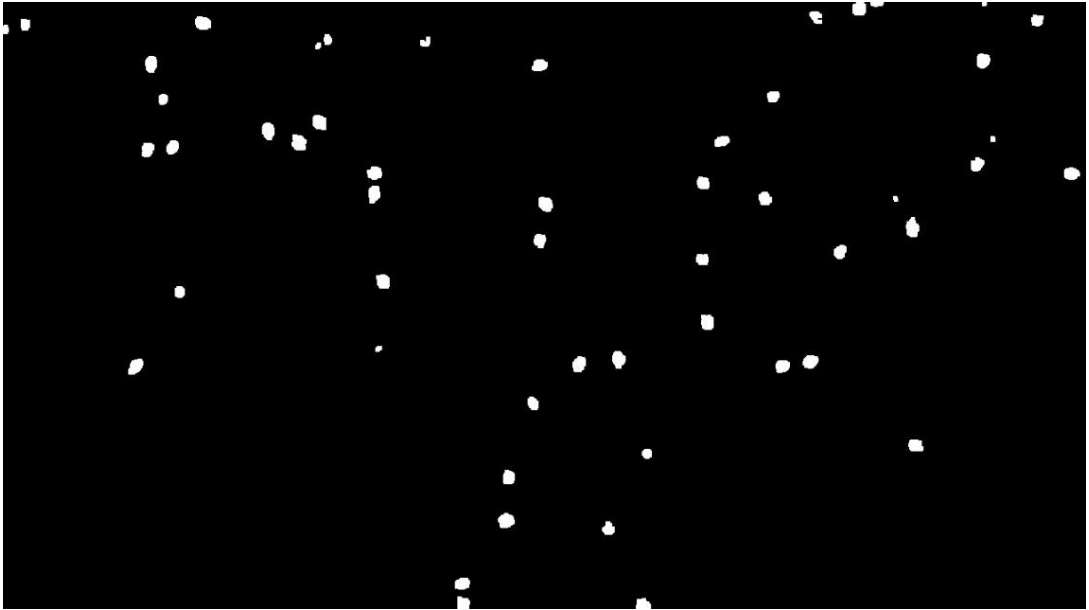
3. Adım: Kalman'dan sonra bazı hatalı etiketlemeler olduğu tespit edilmiştir. Kalman, hareket halindeyken üst üste gelen hücrelerin bir sonraki karede hangi pikselde olacağına karar vermekte zorlanmaktadır. Bu problemi çözmek için eşleşme ve atama problemlerinde iyi sonuçlar üreten Macar algoritması kullanılmıştır. Macar algoritması ile bir son 4 görüntü karesindeki konum bilgilerinden yola çıkılarak eşleştirme tablosu oluşturulmuş ve en uygun etiket atama işlemi yapılmıştır.

4. Adım: Atama işlemi bittiğinde tüm hareketli nesnelere bir numara verilmiş olur. Aynı zamanda bu hareketli nesnelerin hangi karede ve (x,y) koordinat düzleminde hangi konumda olduğu bilgisi de hafızaya alınır.

5. Adım: Tüm görüntü kareleri bu şekilde işlendikten sonra elde edilen ve içerisinde görüntü karesi numarası, nesne numarası, x koordinatı ve y koordinatı bilgilerini barındıran bir tablo hesaplama yapılmak üzere oluşturulur.

4.3.2.1. VIBE Algoritması ile Arka Plan Çıkarma

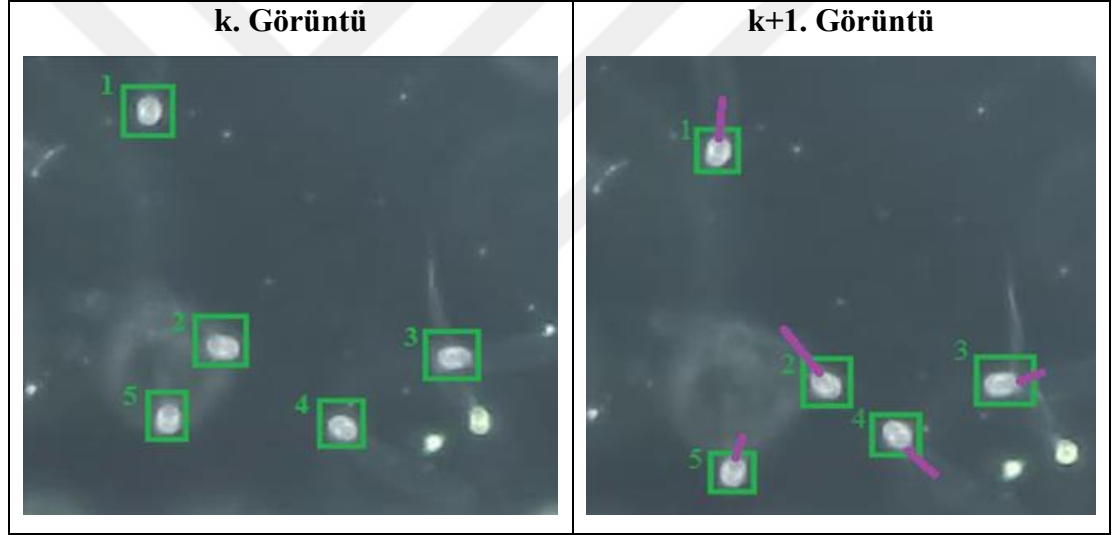
İyi bir nesne takibi yapabilmek için iyi bir arka plan çıkarımı yapılmalıdır. VIBE algoritması ile arka plan çıkarımı yapabilmek için öncelikle piksel bazlı bir model sınıfı oluşturulmuş ve görüntüdeki her piksel için bu model türetilerek bir piksel modeli listesi elde edilmiştir. Bu piksel modeli; pikselin x koordinatı, y koordinatı, güncelleme faktörü, karşılaştırma eşiği gibi bilgileri barındırır. İlk görüntü karesinden sonra gelen diğer görüntü karelerindeki her piksel için bir önceki piksel değerlerinin farkı alınarak bir karşılaştırma eşiği değeri ile karşılaştırma yapılır. Eğer fark bu eşik değerden küçükse üzerinde değerlendirme yapılan bu piksel arka plana aittir. Eğer fark eşik değerden büyük ve eşitse piksel hareketli bir nesneye aittir. Pikselleri bu şekilde iki sınıfa ayırdıktan sonra görüntü, arka plan rengi siyah ve hareketli hücre rengi beyaz olacak şekilde tekrar oluşturulur. Şekil 4.11’de alınan bir video görüntüdeki bir videodaki herhangi bir görüntü karesinde arka plan çıkarımı resmedilmiştir.



Şekil 4.11. VIBE Algoritması ile Arka Plan Çıkarmı

4.3.2.2. Kalman Filtresi ile Etiket Tahmini

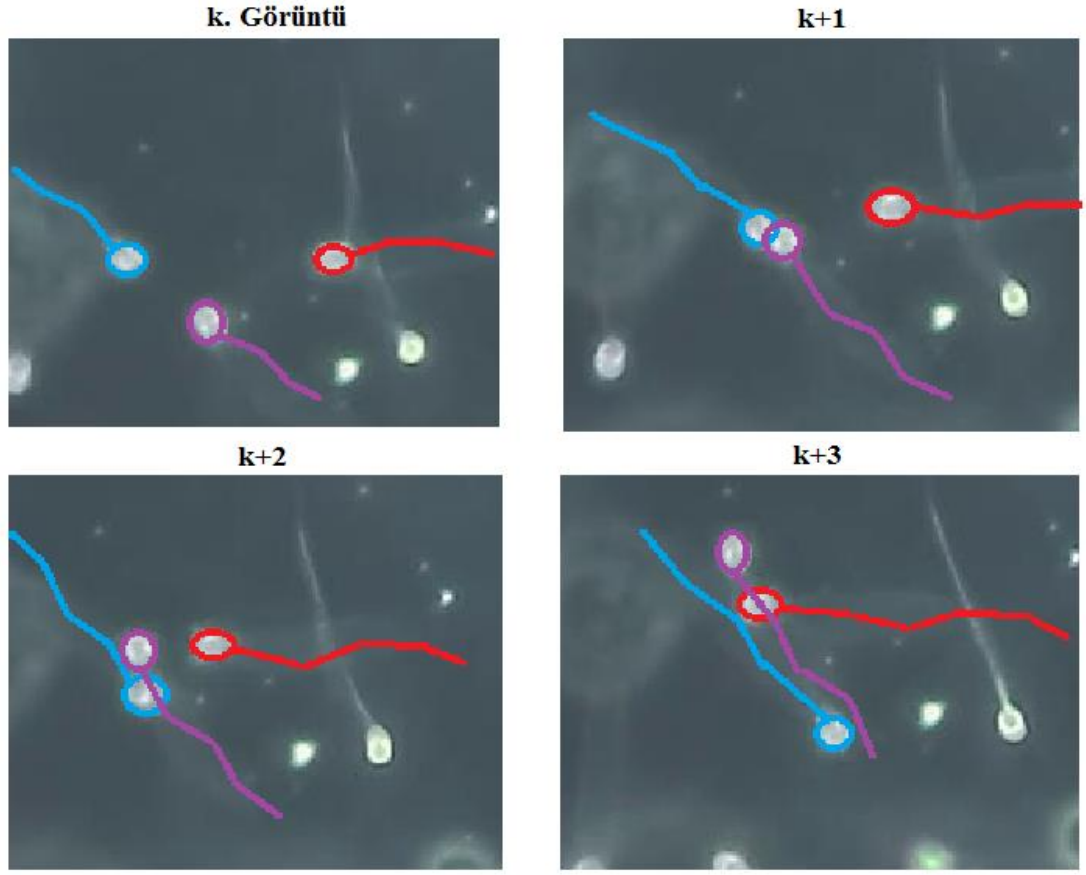
Arka plan çıkarımı yapıldıktan sonra bir sonraki görüntüde karşılaştırma yapmak üzere bir güncelleme işlemi yapılır. Piksellere ait modeller yeni değerleri ile güncellenir. Bu aşamadan sonra artık görüntü üzerinde etiket atama işlemi yapılabilir. Etiket atama işlemi, hareket halindeki bir sperm hücresinin zaman çizelgesindeki konum bilgisi için gereklidir. Etiket atama işleminde bir önceki görüntüden gelen veriler de değerlendirilmelidir. Etiket atanacak sperm hücresinin bir önceki görüntüde var olup olmadığı ve varsa hangi etiketle atandığı bilgisi ile ya yeni numara verme işlemine tabi tutulacak ya da daha önce numara verilen hücrelerden birinin devamı olduğu tahmin edilerek o hücrenin numarası atanacaktır. Kalman filtreleme ile tahmini etiket atama işlemi Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Kalman Filtresi ile Sperm Numarası Tahmini

4.3.2.3. Macar Algoritması ile Atama Problemlerini Giderilmesi

Kalman Filtreleme ile etiket atama işlemi özellikle üst üste binen sperm hücrelerinde hatalı sonuçlar üretebilmektedir. Tahmin işleminde bir pikselin hangi etiket gurubuna dâhil olduğunu anlamak için Kalman bir önceki görüntüdeki piksel modeline ait verilerden faydalandığına göre bu durumda yanlış karar vermesi muhtemeldir. Burada bir etiket atama problemi oluşmaktadır. Şekil 4.13.’de etiket atama problemine bir örnek gösterilmiştir.

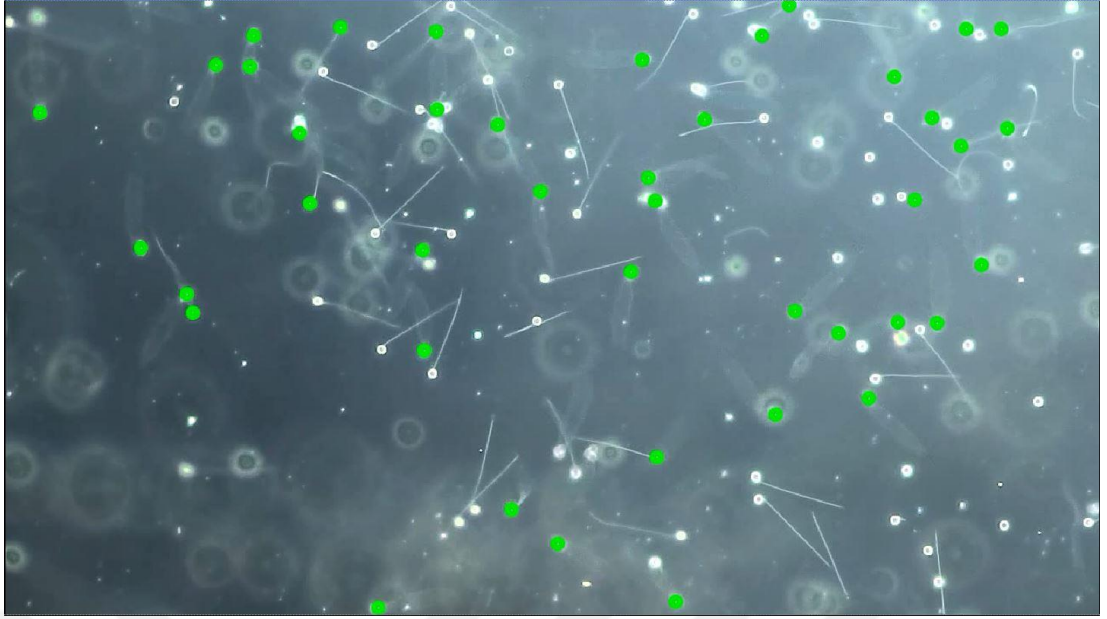


Şekil 4.13. Etiket Atama Problemi

Etiket atama problemini gidermek için bu tür problemlerde oldukça başarılı sonuçlar üreten Macar algoritmasından faydalanılmıştır. Şekil 4.13’de k. zamanda alınan görüntüde farklı koordinatlarda mavi, mor ve kırmızı renkle boyanmış farklı spermiler gösterilmiştir. Bu sperm hücrelerinden mavi ve kırmızı renkte olanları k+1. zamanda üst üste bindiği görülmektedir. k+1. zamanda mavi ve mor hücrelere bir etiket atanabilmesi için bir önceki kareden gelecek bilgiler yeterli olacaktır. Ancak k+2. zamanda bir önceki kareden gelen veriler çakışma problemini oluşturacaktır. Bu problemin giderilmesi için Macar algoritması ile önceki 4 karedeki koordinat bilgileri yardımıyla en uygun seçenek atanır.

4.3.2.4. Hareketli Spermilerin Konumsal İşaretlemesi

Son adımda hareket halinde oldukları tespit edilen bütün hücreler Şekil 4.14’deki gibi işaretlenmiştir. Bütün görüntü kareleri bu şekilde incelenmiş ve hücrelerin özellikleri hesaplanmak üzere kayıt altına alınmıştır.



Şekil 4.14. Hareketli Sperm Hücreleri

Her bir karedeki hücre özelliklerini saklamak için bir analiz modeli sınıfı oluşturulmuştur. Analiz modeli aşağıdaki özelliklerden oluşmaktadır:

1. Görüntü Numarası: Parametrik olarak gönderilen başlangıç saniyesindeki görüntü karesi ilk olacak şekilde ardışık gelen görüntünün sırasıdır.
2. Hücre Numarası: Her görüntüde etiketlenen hücreye verilen tanımlayıcı sayıdır.
3. Piksel Konumu (X)
4. Piksel Konumu (Y)

4.3.2.5. Hesaplama Tablosunun Oluşturulması

Her görüntü incelendikten sonra o görüntü için yukarıdaki bilgileri içeren bir model oluşturulur ve bu model analiz modeli listesine eklenir. Çizelge 4.1.'de örnek bir model listesi gösterilmiştir. Çizelge 4.1.'de iki görüntü karesinden alınmış 10 adet sperm hücresine ait takip bilgileri yer almaktadır. Bu listedeki satır sayısını incelenecek görüntü karesi sayısı ve her görüntüdeki hareketli sperm hücresi sayısı belirlemektedir.

Çizelge 4.1. Sperm Hücrelerinin Konumu İçin Örnek Tablosu

Görüntü Numarası	Hücre Numarası	Piksel Konumu (X)	Piksel Konumu (Y)
3	1	238	713
3	2	633	558
3	3	217	709
3	4	367	710
3	5	347	706
3	6	535	655
3	7	646	656
3	8	664	649
3	9	498	613
3	10	6	632
..	..	..	..
4	1	238	714.235
4	2	628.129	539.491
4	3	216.026	709.974
4	4	383.561	711.948
4	5	347.974	706.974
4	6	535	655
4	7	630.413	662.819
4	8	664	649.974
4	9	505.793	615.922
4	10	6	632

4.3.3. Kalite Parametrelerinin Hesaplanması ve Yeni Yaklaşımlar

Çizelge 4.1.’deki gibi elde edilen hesaplama tablosu ile sperm kalite parametreleri olan VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, MAD, BCF ve WOB değerleri hesaplanmıştır. Her bir parametre için literatürde belirlenmiş olan hesaplama yöntemleri uygulanmıştır. VCL, VAP ve ALH hesaplama yöntemlerine yeni yaklaşımlar önerilmiştir.

4.3.3.1. VSL Hesaplama

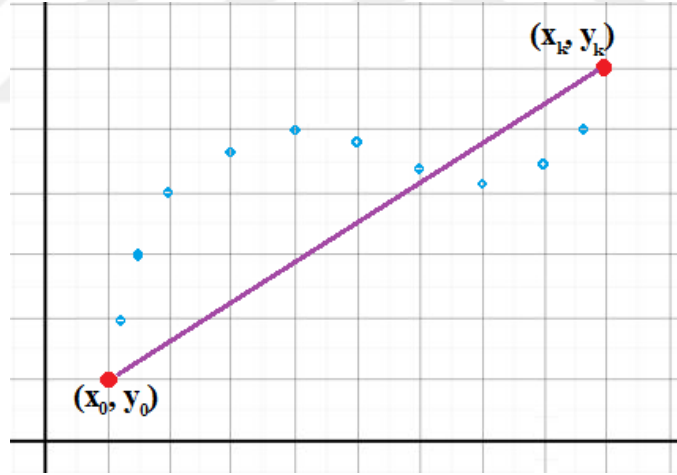
Düz Çizgi Hızı. Her bir sperm hücresi için başlangıçtaki görüntü karesi ile bitiş görüntü karesinde bulunduğu noktaların arasındaki düz çizgi uzaklığının zamana bölünmesinden elde edilir. Tüm hareketli hücreler için VSL hesaplaması yapıldıktan sonra toplanır ve hücre sayısına bölünür. Böylece ortalama bir VSL değeri elde edilmiş olur [50, 51]. VSL hesaplama Denklem (4.4)’deki gibidir.

$$VSL = \frac{\sum_{i=0}^n \left(\frac{\sqrt{(x_k - x_0)^2 + (y_k - y_0)^2}}{p * \Delta t} \right)}{n} \quad (4.4)$$

Denklem 'de x ve y 2 boyutlu piksel uzayındaki enlem ve boylam koordinat düzlemini ifade eder. n , video takibi boyunca tespit edilen toplam hareketli sperm hücresi sayısıdır. (x_k, y_k) , hücrenin son karedeki konumunu ifade eder. p , sperm hücrelerinin geçiş yaptığı (x,y) noktalarının toplam sayısıdır. Δt , incelenen görüntü karesi boyunca geçen zamanı temsil etmektedir ve Denklem (4.5)'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\Delta t = \frac{K}{S} \quad (4.5)$$

Denklem (4.5)'de K, analiz edilen toplam görüntü karesi sayısını ifade eder. S ise videonun saniyedeki kare hızı bilgisidir. Örnek bir VSL değeri hesaplaması Şekil 4.15.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. VSL Hesaplama

Çizelge 4.1'de saniyede 30 görüntü karesi ile alınan videodaki 2 numaralı hücrenin hareketi için başlangıç görüntü karesinin 3 ve bitiş görüntü karesinin 4 olduğunu varsayalım, bu durumda 2 numaralı hücrenin VSL değeri;

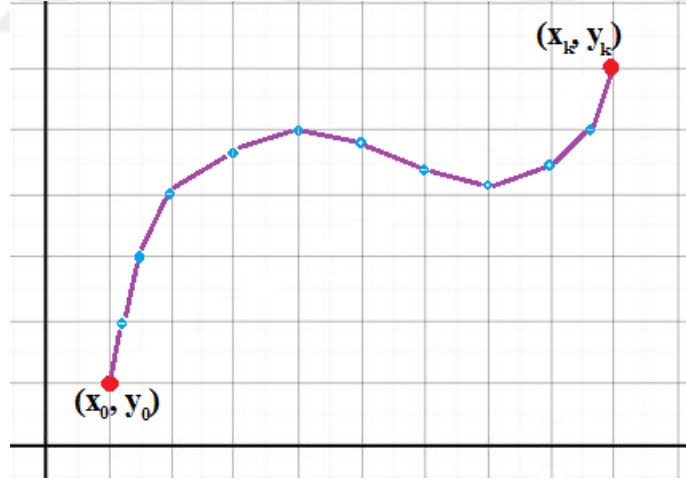
$$\frac{\sqrt{(628,129 - 633)^2 + (539,491 - 558)^2}}{2 * (\frac{2}{30})} = 143,544 \text{ olacaktır.}$$

4.3.3.2. VCL Hesaplama

Eğri Çizgi Hızı ($\mu\text{m/s}$). Sperm başının videodaki başlangıç noktasından bitiş noktasına kadar geçtiği tüm noktaların birleşmesi ile oluşan uzaklığın zamana bölümünden elde edilen değer. Her sperm hücresi için VCL hesaplaması yapıldıktan sonra ortalama bir VCL değeri elde edilir [50, 51]. VSL hesaplama Denklem (4.6)'deki gibidir.

$$VCL = \frac{\sum_{j=0}^n \left(\frac{\sum_{i=0}^{k-1} (\sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2})}{p * \Delta t} \right)}{n} \quad (4.6)$$

Denklem (4.6)'de iç toplam, sperm hücresinin geçtiği noktaların birbirlerine olan uzaklıklarının toplanması ile ilk kareden son kareye kadar aldığı toplam yolun hesaplanmasıdır. Dış toplam ise hızlarının (VCL) toplamını ifade eder. Örnek bir VCL değeri hesaplaması Şekil 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. VCL Hesaplama

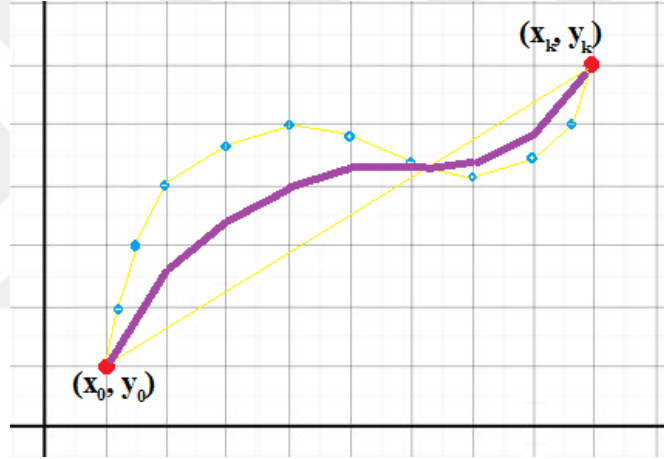
4.3.3.3. VAP Hesaplama

Ortalama yol hızı ($\mu\text{m/s}$). Eğrisel yolun düzleştirilmesi ile elde edilen yolun zamana bölünmesi ile elde edilir. Her bir noktada VSL ve VCL değerinin ortalaması alınarak hesaplanır [50, 51]. Bu parametre araştırmacıya hücrelerin hedefine hangi meyille gittiğinin bilgisini vermektedir. VAP değeri her bir hücre için hesaplandıktan

sonra ortalama bir değer üretilir. Denklem (4.7)'da VAP hesaplaması formüle edilmiştir.

$$VAP = \frac{\sum_{j=0}^n \left(\frac{\sum_{i=0}^{k-1} \left(\sqrt{(\bar{x}_{i+1} - \bar{x}_i)^2 + (\bar{y}_{i+1} - \bar{y}_i)^2} \right)}{p * \Delta t} \right)}{n} \quad (4.7)$$

Denklem (4.7)'da $\bar{x}$ ve $\bar{y}$ ifadeleri VSL ve VCL koordinatlarının ortalamasıdır. Ortalama yol çizgisini hesaplamak için her hücrenin t . zamanındaki VSL ve VCL konumları kayıt altına alınmış ve VAP hesaplamasında kullanılmıştır. Örnek bir VAP hesaplaması Şekil 4.17'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. VAP Hesaplama

VSL her zaman için düz bir çizgidir. Ancak aynı durum VAP ve VCL için geçerli değildir. Ayırık zamanlı konum birleştirme yapıldığı için gerçek uzunluk elde edilememektedir. Elde edilen ayırık zamanlı çizgiden sürekli zamanlı ve gerçeğe daha yakın bir bilgi elde edebilmek için Lagrange eğri uydurma yöntemi kullanılmış ve sistem daha kararlı hale getirilmiştir.

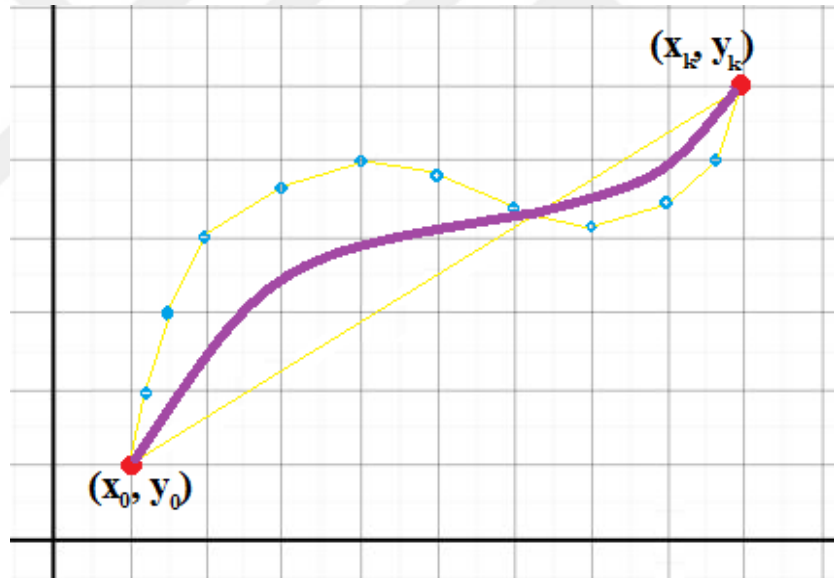
4.3.3.4. Lagrange ile VCL ve VAP Hesaplamada Yeni Bir Yaklaşım

Literatürde VAP ve VCL hesaplaması ayırık zamanlı koordinat düzlemi üzerinde yapılmaktadır [50]. Eğer incelenen video üzerinde hareket halindeki sperm hücreleri

çok hızlı hareket ediyorsa ve kameranın FPS'si düşükse yakalanacak görüntülerde iki zaman aralığındaki konum farklılığı çok fazla olacaktır. Bu konum farklılığı aynı zamanda VAP ve VCL değerlerinin gerçek değerinden uzaklaşmalarına sebep olacaktır. Bu durumu önlemek için eğri uydurma yöntemi ile sürekli zamanlı sisteme geçiş yapılabilir. Her bir hücrenin geçtiği noktadaki $(VCL + VAP) / 2$ noktasındaki (x, y) koordinatlarının listesi Denklem (4.8)'deki formül ile sürekli zamana dönüştürülür.

$$L(x) = \sum_{j=0}^k y_j l_j(x) \quad (4.8)$$

Şekil 4.17'da gösterilen ayırık zamanlı noktaların birleştirilmesi ile elde edilen doğru Lagrange interpolasyonu ile sürekli zamana geçirilmiş ve Şekil 4.18'deki gibi bir doğru elde edilmiştir.



Şekil 4.18. Lagrange İnterpolasyonu ile VAP Eğrisi Uydurma

Lagrange ile alınan sonuçlar klasik yöntemle göre farklılıklar göstermiştir. Bir videodan alınan 10 adet farklı hücrenin VAP hesaplamasında klasik yöntem yerine Lagrange yöntemi kullanıldığında ortaya çıkan farklılıklar sonuçlar bölümünde gösterilmiştir.

4.3.3.5. LIN Hesaplama

LIN, Çizgisel rotanın doğrusallığı, VSL parametresinin VCL parametresine bölümü ile elde edilir [50, 51].

$$LIN = \frac{VSL}{VCL} \quad (4.9)$$

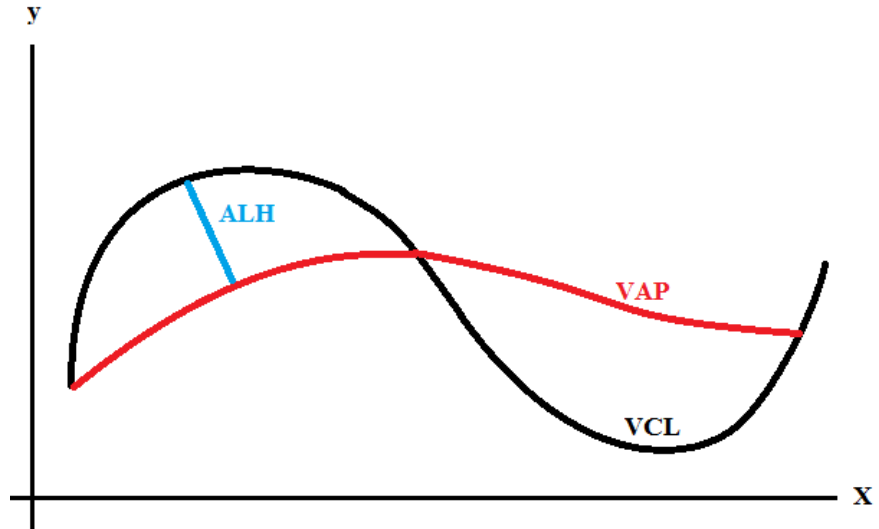
4.3.3.6. STR Hesaplama

STR, Ortalama rotanın doğrusallığıdır. VSL parametresinin VAP parametresine bölümü ile elde edilir [50, 51].

$$STR = \frac{VSL}{VAP} \quad (4.10)$$

4.3.3.7. ALH Hesaplama

ALH, sperm başının lateral yer değiştirme genliğidir [50, 51]. Aynı zamanda bir sperm başının ortalama rotası boyunca yana sapma uzunluğu da (yalpalama) denilebilir.



Şekil 4.19. ALH, Ortalama Yoldan Sapma Genliği

ALH bilgisi hesaplanmadan önce sperm hareketliliği ile oluşan dalgalanmaların tepe noktalarının belirlenmesi gerekir. Yayılımın tepe koordinatlarını tespit edebilmek

için öncelikle VAP ve VCL doğrularının zamansal boyuttaki (x, y) karşılıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu sayede tepe noktaları belirlendiğinde t zamanındaki VAP değerinden çıkarılarak ALH değerleri elde edilebilir. Tepe noktalarını belirlemek için VCL doğrusunun VAP doğrusundan uzaklaşma ve VAP doğrusuna yaklaşma anlarından faydalanılmıştır. Tepe noktası hesaplama 2 adımdan oluşmaktadır:

Birinci Adım: VAP doğrusundan uzaklaşarak devam eden bir VCL doğrusu için T tepe noktası Denklem (4.12)'deki gibi hesaplanır. İlk hareket VAP çizgisinin VCL çizgisinden uzaklaşarak devam ettiği bir ilerleme hareketidir. Bu hareketten sonra $T_k = 1$ olduğu noktada yaklaşma işlemi başlar.

$$U_k = (VCL(x_k) - VAP(x_k))^2 + (VCL(y_k) - VAP(y_k))^2 \quad (4.11)$$

$$T_k = \begin{cases} 0, & U_k - U_{k-1} \geq 0 \\ 1, & U_k - U_{k-1} < 0 \end{cases} \quad k \in \mathbb{R} \quad (4.12)$$

İkinci Adım: VAP doğrusuna yaklaşarak devam eden bir VCL doğrusu için T tepe noktası Denklem (4.13)'deki gibi hesaplanır. Yakınlaşma hareketi boyunca $T_k = 1$ olduğu noktada uzaklaşma hareketi başlamış olur ve 1. adıma dönülür.

$$T_k = \begin{cases} 0, & U_k - U_{k-1} \leq 0 \\ 1, & U_k - U_{k-1} > 0 \end{cases} \quad k \in \mathbb{R} \quad (4.13)$$

Tepe noktaları belirlendikten sonra, T_k değerinin 1 olduğu tüm k noktaları için hesaplanan bütün U_k değerlerinin ortalaması alınarak her bir sperm hücresinin ALH değeri hesaplanır.

$$ALH_i = \frac{\sum_{k=0}^p (U_k)}{p} \quad (4.14)$$

Tüm hareketli sperm hücreleri için ALH değeri hesaplandıktan sonra ortalama ALH değeri elde edilir:

$$ALH = \frac{\sum_{i=0}^n (ALH_i)}{n} \quad (4.15)$$

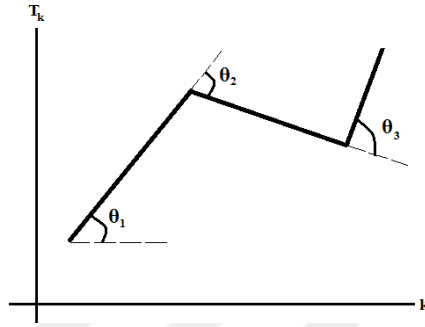
4.3.3.8. MAD Hesaplama

Ortalama açısal hareket (derece). Sperm başının anlık dönüşleri sırasında yaptığı açısal değişikliğin ortalamasıdır. ALH hesaplaması yaparken elde edilen tepe

noktalarının birbiri arasında yaptığı açısal hareketlere bakılır [51]. Çalışmada bir sperm hücresine ait MAD hesaplaması Denklem (4.16)'deki gibi yapılmıştır.

$$MAD_i = \frac{\sum_{k=0}^m (\theta_k)}{p} \quad (4.16)$$

MAD hesaplamasında tepe noktalarının kendi aralarındaki yaptıkları açılar Şekil 4.20'da gösterilmiştir.



Şekil 4.20. MAD Hesaplama

Tüm hareketli sperm hücreleri için MAD değeri hesaplandıktan sonra ortalama MAD değeri Denklem (4.17)'daki gibi elde edilir:

$$MAD = \frac{\sum_{i=0}^n (MAD_i)}{n} \quad (4.17)$$

4.3.3.9. BCF Hesaplama

Çapraz Kesişme Frekansı (kesişme/saniye). Spermin eğrisel çizgi rotasının ortalama rotasıyla kesişme sıklığı ortalamasıdır. VAP ve VCL çizgilerinin birbirini kestiği noktaların sayısı alınarak elde edilmiştir [51].

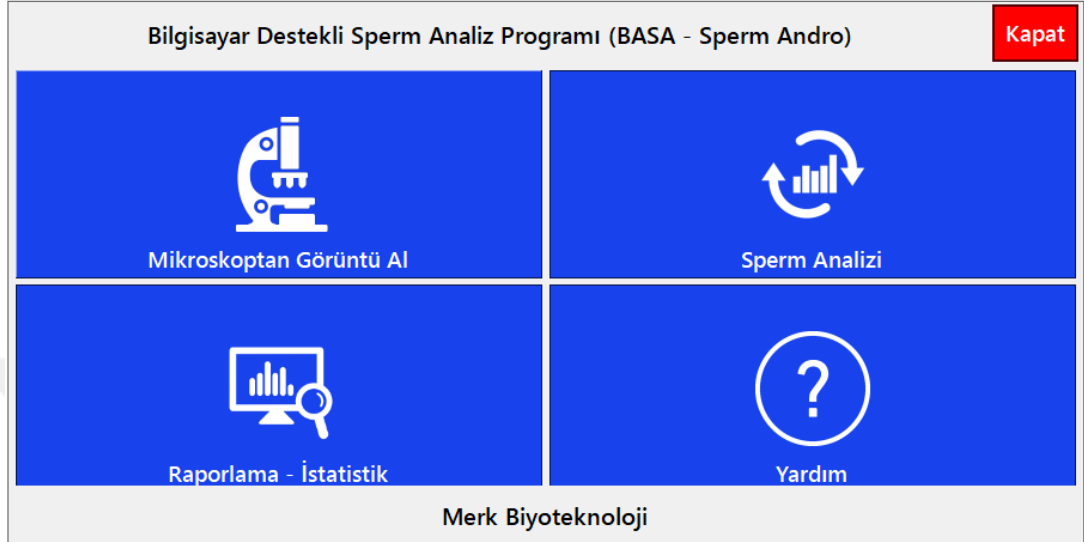
4.3.3.10. WOB Hesaplama

Spermin ilerleme kararsızlığıdır. VCL yolunda ilerlerken izlenen dalgalanmanın ortalama yola oranı ile hesaplanır ve VAP değerinin VCL değerine oranı ile elde edilmiştir [50, 51].

$$WOB = \frac{VAP}{VCL} \quad (4.18)$$

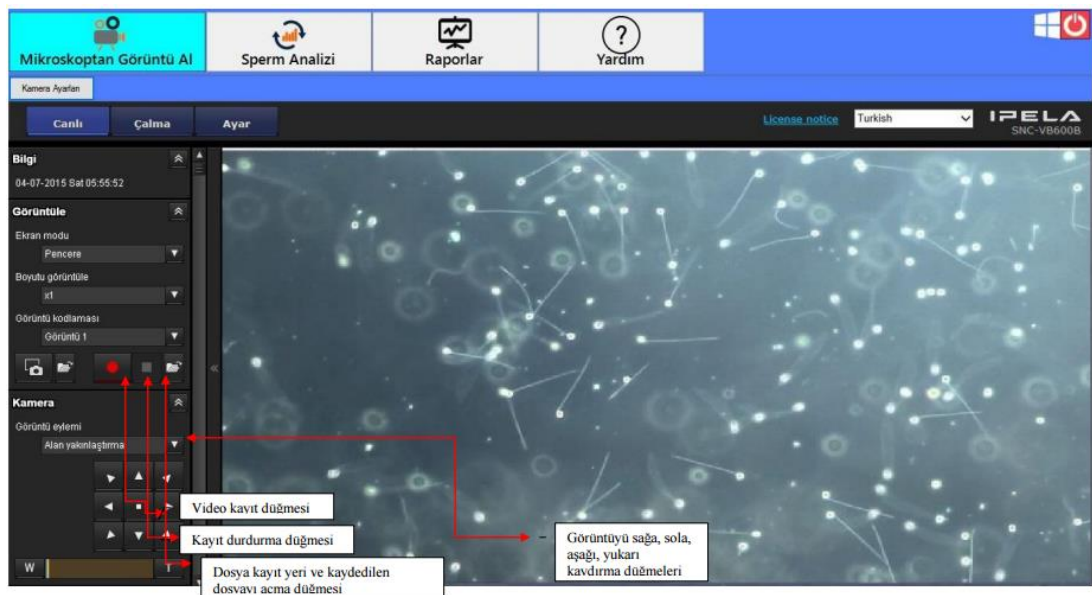
4.4. Sistemin Kullanımı

Gerçekleştirilen sistem dört ana menü altında toplanmıştır. Bu menüler: Mikroskoptan görüntü alma, sperm analizi, raporlama-istatistik ve yardım ekranlarına yönlendirilmektedir.



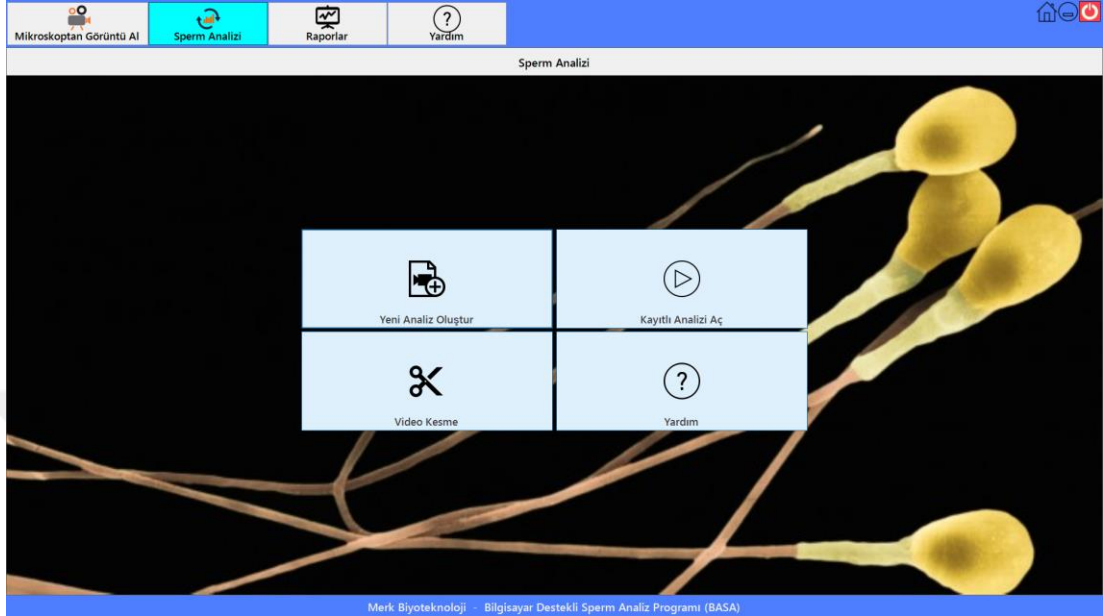
Şekil 4.21. Sisteme Giriş

Mikroskoptan görüntü alma işlemi için analog kameranın video kayıt arayüzünün sisteme entegre edilmesi sağlanmıştır. Kameradan alınan görüntü belirlenmiş olan bir klasöre yine belirlenmiş bir isim formatı ile otomatik olarak kaydedilmektedir. Şekil 4.22’de mikroskoptan görüntü alma ekranı gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Mikroskoptan Görüntü Alma

Sperm analizi menüsü ile açılan ekranda yeni analiz oluşturma, daha önceden kaydedilen bir analizi açma, üzerinde işlem yapılacak bir videodan belirli kesitleri alma gibi işlemler yapılabilmektedir. Şekil 4.23’de analiz seçenekleri gösterilmiştir.



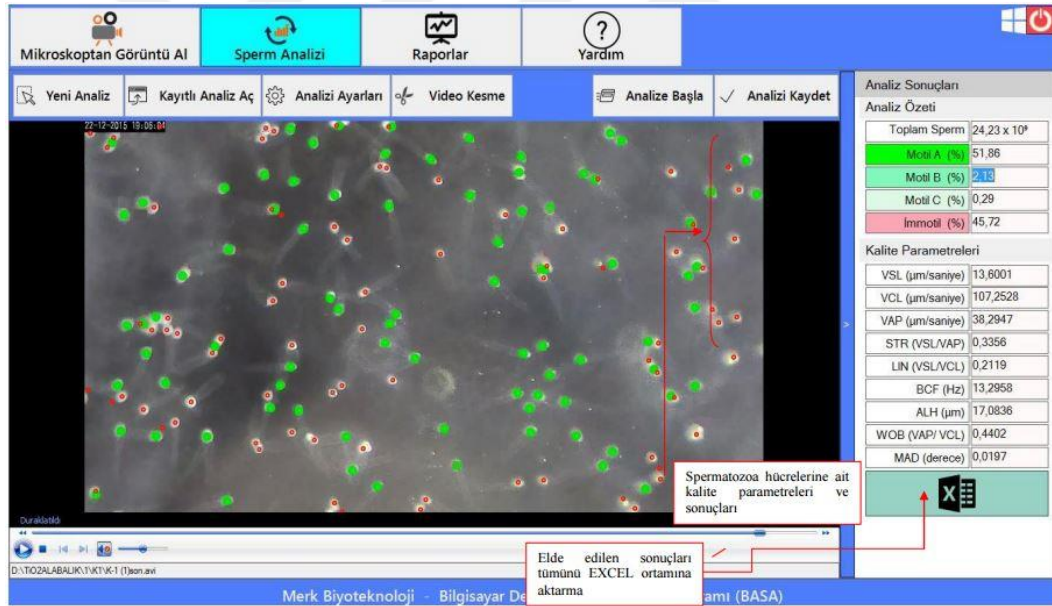
Şekil 4.23. Sperm Analizi Seçenekleri

Yeni bir sperm analizi yapılmak istendiğinde önce analiz ayarlarının yapılması istenmiştir. Bu ayarlar; analiz edilecek videonun seçilmesi, analiz edilecek canlı türünün seçilmesi, alınan örneğin hangi oranda seyreltiği bilgisinin girilmesi, kaç görüntü karesi üzerinde işlem yapılacağına belirtilmesi, hangi saniyeden itibaren analiz yapılacağına belirlenmesi, piksel boyutunun, hız bilgisinin ve hacimsel verilerin girilmesi işlemleridir. Şekil 4.24’de analiz ayarları ekranı gösterilmiştir.

Şekil 4.24. Analiz Ayarları Ekranı

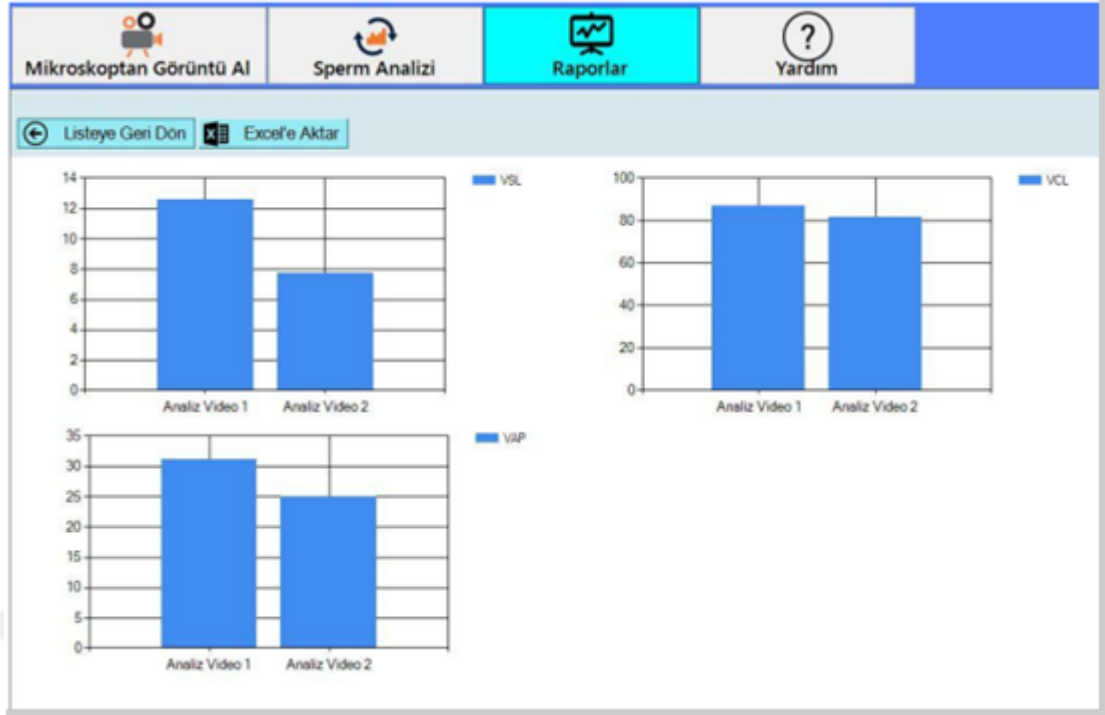
Analiz edilecek balık türleri arasında alabalık, sazan balığı, mersin balığı, çipura ve levrek bulunmaktadır. Her türün sperm hücresi farklı şekillerde ve farklı büyüklüktedir. Dolayısı ile farklı ayarlarla analiz edilmelidir. Canlı türüne göre yapılan ayarlar “gelişmiş ayarlar” sekmesi ile yapılabilmektedir. Analiz edilecek görüntü karesi sayısı da önemlidir. Bu sayı çok olduğunda hareket halindeki hücrelerin çakışma oranı artacak ve doğru analizden uzaklaşılacaktır. Sayı az olduğunda da aynı sonuç olacaktır. Bu yüzden analiz için en uygun sayı belirlenmelidir.

Analiz ayarları yapıldıktan sonra analize başla butonuna basıldığında analiz sonuçları ekranı açılır. Bu ekranda istemin analiz sonuçları gösterilir. Sonuçlar arasında; motilite yüzdeleri, 1 ml’deki toplam sperm sayısı ve hareketlilik parametreleri vardır. Bu sonuçların sperm hücresi bazında ve toplamsal bazda sonuçları Excel’e aktarma butonu ile raporlanabilmektedir. Şekil 4.25.’de analiz sonuçları ekranı gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Analiz Sonuçları

Analiz sonuçları alındıktan sonra bir analiz grubu altında yazılımın veri tabanına kaydedilebilmektedir. Bu sayede belirlenen analiz grubu için istatistiksel raporlama yapılabilmektedir. Bu istatistiksel raporlama hem liste olarak hem de VSL, VCL ve VAP bazında grafik olarak elde edilebilmektedir. Şekil 4.26.’da analiz raporu ekranı gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Analiz Raporu

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında spermiogram bilimi ile ilgilenen uzmanlar ve araştırmacılar için analiz yöntemlerini otomatikleştiren ve daha sağlıklı sonuçlara ulaştıran, verimli ve başarıyı yüksek karar destek yazılımı (bilgisayar destekli sperm analizörü) geliştirilmiştir.

Geliştirilen sistemde sperm analizi için donanımsal ve yazılımsal tasarım yapılmış ve başarıyla gerçekleştirilmiştir. Yazılımsal tasarım sperm sayımı, çoklu sperm takibi ve kalite parametrelerinin belirlenmesi adı altında üç ana başlıkta incelenmiştir.

Sperm sayımında başarılı sonuçlar üretebilen bir yöntem uygulanmıştır. Segmentasyon için bağlı bileşen etiketleme yöntemi ile yapılan [52]'deki çalışmada 90 adet sperm görüntüsü içerisinde toplam 8331 adet hücrenin var olduğu ve hücre tespiti başarımlarının %92,8 olduğu gözlemlenmiştir. Ancak aynı veri setinde dairesel Hough dönüşümü ile yapılan segmentasyonda %98,48'lik bir başarımlar sağlandığı görülmüştür. Bu da dairesel Hough dönüşümünün bu konu için ne kadar isabetli bir yöntem olduğunu göstermektedir. Karşılaştırma sonuçları Çizelge 5.1. ve Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Bağlı Bileşen Etiketleme İle Segmentasyon Başarımları [52]

Görüntü Numarası	Bulunan Sperm Sayısı	Tespit Edilemeyen	Yanlış Tespit Edilen
1	131	15	4
2	115	11	4
3	79	8	2
4	120	10	5
5	201	16	11
...	...	...	...
Toplam 90 Adet	7734	597	468
Başarımlar Yüzdesi	%92.8		

Çizelge 5.2. Dairesel Hough Dönüşümü ile Segmentasyon Başarımları

Görüntü Numarası	Bulunan Sperm Sayısı	Tespit Edilemeyen	Yanlış Tespit Edilen
1	144	2	1
2	123	3	0
3	88	0	1
4	128	2	2
5	214	3	2
...	...	...	...
Toplam 90 Adet	8205	126	89
Başarımlar Yüzdesi	%98,48		

Çoklu sperm takibinde, arka plan çıkarımı için yeni bir algoritma olan ve başarılı sonuçlar üreten VIBE kullanılarak hızlı ve etkili nesne takibi sağlanmıştır. Takip edilen nesnelere etiket ataması yapmak için sıklıkla kullanılan bir tahmin yöntemi olan Kalman filtresi kullanılmıştır. Hareket halindeyken çakışan hücrelerin Kalman filtresi ile tahmininde karşılaşılan atama probleminin çözümü için Macar algoritması kullanılmıştır.

Kalite parametrelerinin belirlenmesinde literatürde geçen hesaplama yöntemleri uygulanmış, ilaveten yeni yaklaşımlar sunulmuş ve karşılaştırmalar yapılarak Çizelge 5.3.'de gösterilmiştir. Karşılaştırma sonucunda yeni yöntemin farklılıkları vurgulanmıştır.

Çizelge 5.3. VAP hesaplamasında Lagrange ve klasik yöntem karşılaştırması

Hücre No	Klasik Yöntem	Lagrange ile
1	17,8489	19,2748
2	11,9151	13,1174
3	17,4323	18,8122
4	14,072	16,1998
5	15,0292	17,5512
6	16,971	18,932
7	15,7994	18,8795
8	10,5968	12,8718
9	19,5965	21,8489
10	19,031	21,9151
Ortalama	15,82922	17,94027

Tez çalışması ile gerçekleştirilmiş olan CASA sitemi endüstriyel anlamda Türkiye’de bir ilk olma niteliği taşımış ve TÜBİTAK tarafından 1512-Girişimcilik Aşamalı Destek Programı 2140052 numaralı ve “Bilgisayar Destekli Sperm Kalite Analizörü Yazılımı Geliştirilmesi-BASA” başlıklı proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışma ile birlikte edinilen bilimsel kazanımlarla birlikte, insan sperm analizine yoğunlaşmak ve sperm hücrelerinin DNA fregmantasyonu üzerine araştırma ve geliştirme yapılması hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] M. E. Özgür, *Balıklarda Gamet Hücreleri, Kaliteleri ve Üretime Etkileri*, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 4:2 (2011) 17-24.
- [2] L. Butler ve K. Laqua, *Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-IX. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation of optical radiation (IUPAC Recommendations 1995)*, Pure Appl. Chem. (IUPAC), 67:10 (1995) 1725–1744.
- [3] WHO, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Geneva: World Health Organization, 2010.
- [4] J. Gary, *The movement of sea-urchin spermatozoa*, J. Exp. Biol., 32:1 (1955) 775-801.
- [5] J. Gray, *The movement of spermatozoa of the bull*, J. Exp. Biol., 35:1 (1958) 96-108.
- [6] R. Rikmenspoel ve G. Van Herpen, *Photoelectric and cinematographic measurements of the motility of bull sperm cells*, Phys. Med. Biol., 2:1 (1957) 54-63.
- [7] L. Rothschild ve S. M.M., *The fertilization reaction in the sea-urchin egg; a propagated response to sperm attachment*, J. Exp. Biol., 26:1 (1949) 164-76.
- [8] L. Rothschild, *A new method of measuring sperm speeds*, Nature, 171:1 (1953) 512-515.
- [9] D. Katz ve H. Dott, *Methods of measuring swimming speed of spermatozoa*, J. Reprod Fertil, 45:1 (1975) 263-272.
- [10] G. David, C. Serres ve P. Jouannet, *Kinematics of human spermatozoa*, Gamete Res., 4:1 (1981) 83-95.
- [11] J. Overstreet, D. Katz, F. Hanson ve J. Fonseca, *A simple inexpensive method for objective assessment of human sperm movement characteristics*, Fertil Steril, 31:1 (1979) 162-172.
- [12] D. Katz ve J. Overstreet, *Sperm motility assessment by videomicrography*, Fertil Steril, 35:1 (1981) 188-193.
- [13] D. Mortimer, *Objective analysis of sperm motility and kinematics*, Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility, Boca Raton, CRC Press, 1990, pp. 97-133.
- [14] T. F. Kruger, T. C. DuToit, D. R. Franken, A. A. Acosta, S. C. Oehninger, R. Menkveld ve C. J. Lombard, *A new computerized method of reading sperm*

morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading, Fertility and Sterility, 59:1 (1993) 202-209.

- [15] D. Kime, K. Van Look, B. McAllistera, G. Huyskensb, E. Rurangwab ve F. Ollevierb, *Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish*, Comparative Biochemistry and Physiology, 130:4 (2001) 425–433.
- [16] J. Wilson-Leedy ve R. Ingermann, *Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters*, Theriogenology, 67:3 (2007) 661–672.
- [17] R. Amann ve D. Waberski, *Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments*, Theriogenology, 81:1 (2014) 5-17.
- [18] R. Billard ve M. P. Cosson, *Sperm motility in rainbow trout, *Parasalmo mykiss*; effect of pH and temperature; reproduction in fish. Basic and applied aspects in endocrinology and genetics*, INRA, 1986, pp. 161-176.
- [19] E. Kjørsvik, A. Mangor-Jensen ve I. Holmefjord, *Egg quality in fishes*, Adv. Mar. Biol., 26:1 (1990) 71-113.
- [20] N. R. Bromage ve R. J. Roberts, *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, Blackwell Science Ltd., Oxford, p. 424 pp, 1995.
- [21] M. Suquet, M. H. Omnes, Y. Normant ve C. Fauvel, *Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot (*Scophthalmus maximus*)*, Aquac. Fish. Manage, 23:1 (1992) 217-225.
- [22] S. J. Clearwater ve L. W. Crim, *Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus**, Fish Physiol. Biochem., 19:1 (1998) 349-357.
- [23] A. Ciereszko ve K. Dabrowski, *Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique*, Aquaculture, 109:1 (1993) 367-373.
- [24] J. Glogowski, M. Kwasnik, B. Piros, K. Dabrowski, K. Goryczko, S. Dobosz, H. Kuzminski ve A. Ciereszko, *Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: Semen parameters and cryopreservation success*, Aquacult. Res., 31:1 (2000) 289-296.
- [25] G. Dietrich, R. Kowalski, M. Wojtczak, S. Dobosz, K. Goryczko ve A. Ciereszko, *Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia*, Fish Physiology and Biochemistry, 31:1 (2005) 1-9.

- [26] M. Nahiduzzaman, S. Akter, M. M. Hassan, A. K. M. Azad Shah ve M. A. R. Hossain, *Sperm biology of artificially induced common carp, Cyprinus carpio (Linnaeus, 1758)*, International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 1:6 (2014) 27-31.
- [27] M. Aliniya, H. Khara, S. B. Noveiri ve H. Dadras, *Influence of Age of Common Carp (Cyprinus carpio) Broodstock on Reproductive Traits and Fertilization*, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13:1 (2013) 19-25.
- [28] K. Malgorzata ve M. Tadeusz, *Effects of Quantity And Quality of Carp Sperm on Egg Fertilisation Success*, Acta Ichthyologica Et Piscatoria, 12:2 (1983) 83-91.
- [29] F. Crespo, J. Gosálvez, S. D. Johnston ve J. de la Torre, *Stallion sperm quality after combined ejaculate fractionation and colloidal centrifugation*, Spanish Journal of Agricultural Research, 13:4 (2015) 1-6.
- [30] C. Ververs, M. van Zijl Langhout, J. Govaere ve A. Van Soom, *Features of reproduction and assisted reproduction in the white (Ceratotherium simum) and black (Diceros bicornis) rhinoceros*, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2015, pp. 175-187.
- [31] M. Hossain, M. Khatun, M. Islam ve O. Miazi, *Semen characteristics of breeding bulls at the Central Cattle Breeding and Dairy Farm of Bangladesh*, Bang. J. Anim. Sci., 41:1 (2012) 1-5.
- [32] M. Rahman, N. Juyena, J. Ahmed, R. Ferdousy, S. Chakma, M. Rine ve T. A.M., *Evaluation of semen for breeding soundness of four different breeds of bull used for artificial insemination*, Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS), 7:9 (2014) 28-34.
- [33] E. Özçınar, *Semen analizi: 2010 Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre spermiyogram*, İzmir Üniversitesi Tıp Dergisi, 2014, 1: 48-51.
- [34] W. Guest, J. Avault Jr. ve J. Roussel, *Preservation of Channel Catfish Sperm*, Transactions of the American Fisheries Society, 1976, 469-474.
- [35] M. Wühr, E. Tan, S. Parker, H. Detrich ve T. Mitchison, *A Model for Cleavage Plane Determination in Early Amphibian and Fish Embryos*, Current Biology, 20:22 (2010) 2040–2045.
- [36] I. Scientific, "Makler Counting Chamber For Rapid Sperm Analysis" http://www.irvinesci.com/uploads/technical-documentations/Makler_Counting_Chamber-Rev0.pdf (on-line access on 20May, 2016)
- [37] D. Kime, M. Ebrahimia, K. Nystenb, I. Roelantsb, E. Rurangwab, H. Moorec ve O. F, "Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals" *Aquatic Toxicology*, pp. 36/ 3-4 p223–237, 1996.

- [38] R. Jain, R. Kasturi ve B. Schunck, "Image Filtering" *Machine Vision*, New York, McGraw-Hill, 1995, pp. 112-139.
- [39] R. Fisher, S. Perkins, A. Walker ve E. Wolfart, *Gaussian smoothing*, 2003. <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/gsmooth.htm> (on-line access on 20May, 2016)
- [40] N. Otsu, *Discriminant and least square threshold selection*, In: *Proc 4IJCPR*, pp. 592-596, 1978.
- [41] A. Kagan ve L. Shepp, *Why the variance?*, *Statistics and Probability Letters*, 38:4 (1998) 329–333.
- [42] H. Rhody, *Lecture 10: Hough Circle Transform*, Rochester Institute of Technology, 2004.
- [43] T. Kryjak ve M. Gorgon, *Real-time implementation of the ViBe foreground object segmentation algorithm*, *Computer Science and Information Systems (FedCSIS)*, Kraków, 2013.
- [44] O. Barnich ve M. Van Droogenbroeck, *ViBe: A Universal Background Subtraction Algorithm for Video Sequences*, *IEEE Transactions on Image Processing*, 20:6 (2011) 1709–1724.
- [45] R. Kalman, *A new approach to linear filtering and prediction problems*, *Journal of Basic Engineering*, 82:1 (1960) 35–45.
- [46] H. W. Kuhn, *The Hungarian Method for the assignment problem*, *Naval Research Logistics Quarterly*, 2:1 (1955) 83–97.
- [47] A. Öner ve F. Ülengin, *Atama problemi için yeni bir çözüm yaklaşımı*, *itüdergisi mühendislik*, 1:2 (2003) 73-79.
- [48] E. Meijering, *A chronology of interpolation: from ancient astronomy to modern signal and image processing*, *Proceedings of the IEEE*, 90:3 (2002) 319–342.
- [49] Anonymous (2016), *Itseez leads the development of the renowned computer vision library OpenCV*, <http://itseez.com> (on-line access on 20May, 2016)
- [50] P. Hidayatullah, I. Awaludin, R. D. Kusumo ve M. Nuriyadi, *Automatic sperm motility measurement*, 2015 International Conference on Information Technology Systems and Innovation (ICITSI), pp. 1 - 5, 2015.
- [51] E. Nieschlag ve H. Behre, *Andrology: male reproductive health and dysfunction* (ed. 2.), Berlin, Germany: Springer-Verlag, 2001.
- [52] F. Okumus, A. F. Kocamaz ve M. E. Ozgur, *Gökkuşağı Alabalığı Sperm Hücrelerinin Algılanması ve Sayılması*, *Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU)*, 2015.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Fatih OKUMUŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: Arapgir-1983

Adres: İnönü Üniversitesi Sürgü Meslek Yüksekokulu Bilgisayar Teknolojileri Bölümü, Doğanşehir/MALATYA

E-Posta: fatih.okumus@inonu.edu.tr

Lisans: Fırat Üniversitesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü (2002-2006)

Mesleki Deneyim: Obisis Yazılım, Elazığ (2006-2007)

Fonet Yazılım, Ankara (2008-2010)

TÜRKSAT, Ankara (2011-2013)

İnönü Üniversitesi (2013- Devam Ediyor)

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR/PROJELER

- **F. Okumus**, A. F. Kocamaz ve M. E. Ozgur, “Gökkuşuğu Alabalığı Sperm Hücrelerinin Algılanması ve Sayılması” *Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU)*, 2015.
- Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 1512-Girişimcilik Aşamalı Destek Programı 2140052 numaralı ve “Bilgisayar Destekli Sperm Kalite Analizörü Yazılımı Geliştirilmesi-BASA” başlıklı proje.