

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ İÇİN
GÖRÜNTÜ ANALİZİ**

ALEV KAKAÇ MEŞE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017

**TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ İÇİN GÖRÜNTÜ
ANALİZİ**

**IMAGE ANALYSIS FOR SINGLE CELL GEL
ELECTROPHORESIS**

ALEV KAKAÇ MEŞE

Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2017

“Tek Hücre Jel Elektrofözezi İçin Görüntü Analizi ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 08/02/2017 tarihinde, **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Prof. Dr. Recep DEMİRCİ

Üye : Prof. Dr. Erkan YURTÇU

Üye (Danışman) :Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR

ONAY

..../02/2017

Prof. Dr. Emin AKATA
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 10/ 02/ 2017

Öğrencinin Adı, Soyadı : Alev KAKAÇ MEŞE

Öğrencinin Numarası :21420114

Anabilim Dalı :Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Programı : Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksel Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR

Tez Başlığı : Tek Hücre Jel Elektroforezi İçin Görüntü Analizi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 55 sayfalık kısmına ilişkin, 10 / 02 / 2017 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

Onay

10 / 02 / 2017

Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR

TEŐEKKÜR

Sayın Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR'a (tez danışmanı), çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle her zaman destek olup, karşılaşılan zorlukların aşılmasında daima yol gösterici olduğu için,

Sayın Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ'ye (eş danışmanı), bu çalışmada kullanılan görüntülerin sağlanmasında ve tezin sonuca ulaştırılmasında her zaman sonsuz destek sağladığı için,

Sayın Araş. Gör. Tansel Uyar'a tez sürecimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım için,

Ayrıca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen kıymetli aileme ve eşime en derin sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

ÖZ

TEK HÜCRE JEL ELEKTROFOREZİ İÇİN GÖRÜNTÜ ANALİZİ

Alev KAKAÇ MEŞE

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için deoksiribonükleik asit (DNA) yapısının korunması son derece önemlidir. Ancak, hücrenin normal metabolik süreçlerinde ya da fiziksel veya kimyasal etkilerle DNA'da hasar oluşabilmektedir. Yaşam bilimlerinin çeşitli alanlarında ve bazı patofizyolojilerin klinik tanısında DNA hasarının tespiti oldukça önemlidir. Tek hücre jel elektroforezi (THJE) veya diğer adıyla Comet analizi fiziksel ve kimyasal etkilerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesinde kullanılan güvenilir ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Yöntem genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA'nın, ince bir agaroz jel içine yerleştirilip elektroforetik ortamda yürütülmesini temel alır. Comet protokolü ile elde edilen DNA görüntüleri gözle değerlendirilebileceği gibi günümüzde çeşitli yazılımlar kullanılarak da analiz edilmektedir. Bu tür yazılımlar sayesinde kısa sürede ve araştırmacının deneyimine bağlı kalınmayarak objektif sonuçlar elde edilebilmektedir. Literatürde bulunan mevcut çalışmalar, Comet analiz sistemlerinin yarı otomatik ve otomatik olarak ikiye ayrıldığını göstermektedir. Yarı otomatik yazılımlar çoğunlukla kullanıcıdan bir eşik değeri, DNA'yı seçme ve Comet görüntüsünün baş kısmını seçmelerini ister. Otomatik yazılımlar ise kullanıcı tarafından seçilen veya görüntü boyunca yer alan Comet analiz görüntülerini otomatik olarak analiz edip ölçüm sonuçlarını sunar. Bu çalışmada, HepG2 (ATCC HB-8065) hepatosellüler karsinom karaciğer kanser hücrelerinden elde edilen Comet analiz görüntüleri kullanılmıştır. Kullanıcı tarafından seçilen bu görüntülerde, ölçüm sonuçlarının hesaplanması ve kullanıcıya parametrik veriler sunulması amaçlanmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Comet Analizi, DNA Hasarı, Görüntü Analizi, Otsu Metodu

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aykut ERDAMAR, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

Eş Danışman: Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ, Başkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm

ABSTRACT

Alev KAKAÇ MEŞE

Baskent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

Preservation of the structure of deoxyribonucleic acid (DNA) is crucial so that genetic information can be transmitted in a healthy way from generation to generation. However, DNA could be damaged by metabolic processes of a cell or by chemical or physical activity. Detection of DNA damage is very crucial in various areas of life sciences and in the clinical diagnosis of some pathophysiological conditions. Single cell gel electrophoresis, also called Comet Assay, is a reliable and easily applicable method to measure/detect level of DNA damage which is an indicator of a genotoxic and cytotoxic effect on living organisms caused by chemical and physical activity. The method is generally based on the fact that the DNA in the nucleus isolated from living tissues is placed in a thin agarose gel and run on an electrophoretic medium. DNA images obtained with the Comet protocol can be evaluated visually as well as can be analyzed using various software today. With such software, objective results can be obtained in a short period of time and without adhering to the researcher's experience. Current studies in the literature show that Comet analysis systems are categorized into two as semi-automatic and automatically. Semi-automated software often requires the user to select a threshold value, the DNA, and the head of the Comet image. The automatic software automatically analyzes the Comet analysis images selected by the user or located throughout the image and presents the measurement results. In this study, Comet analysis images obtained from HepG2 (ATCC HB-8065) hepatocellular carcinoma liver cancer cells were used. Calculation of measurement results of these user-selected images and presenting parametric data to the user are intended.

KEYWORDS: Comet Assay, DNA Damage, Image Analysis, Otsu Method

Advisor: Asst. Prof. Aykut ERDAMAR, Baskent University, Department of Biomedical Engineering

Co-advisor: Assoc. Prof. Özlem DARCANSOY İŞERİ, Baskent University, Department of Molecular Biology and Genetics

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Çalışmanın Konusu.....	1
1.2 Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	2
1.3 Literatür Özeti.....	2
1.4 Genel Bakış.....	4
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Deoksiribonükleik Asit (DNA).....	6
2.1.1 DNA hasarı.....	7
2.1.2 DNA onarımı eksiklikleri ve hatalarının sonuçları.....	9
2.2 Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Analizi) Nedir?.....	9
2.2.1 THJE basamakları.....	11
2.2.1.1 <u>Hücrelerin hazırlanması</u>	11
2.2.1.2 <u>Lamlarının hazırlanması</u>	11
2.2.1.3 <u>Hücre patlatma</u>	13
2.2.1.4 <u>Alkali ortamda DNA yapısının açılması</u>	13
2.2.1.5 <u>Elektroforez</u>	13
2.2.1.6 <u>Nötralizasyon</u>	13
2.2.1.7 <u>DNA boyama ve comet görüntüleme</u>	13
2.2.1.8 <u>Comet değerlendirme</u>	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1 Comet Analiz Görüntülerinin Elde Edilmesi.....	15
3.2 Analiz Yöntemine Genel Bakış.....	15
3.3 Görüntünün Sayısallaştırılması.....	16
3.4 Renkli Görüntünün Gri Skala Görüntüye Çevrilmesi.....	16
3.5 Görüntü İyileştirme Yöntemleri.....	17
3.5.1 Gri seviyeli morfolojik geriçatma.....	18
3.5.1.1 <u>Kesel (Geodesik) genişletme</u>	18

3.5.1.2	<u>İki boyutlu görüntüde piksel komşulukları</u>	19
3.5.1.3	<u>Görüntünün sınır yapılarının temizlenmesi</u>	19
3.5.2	Kontrast sınırlı uyarlamalı histogram eşitleme (KSUHE)	20
3.5.3	Filtreleme işlemleri	25
3.5.4	Kenar belirleme	25
3.5.4.1	<u>Görüntüde kenar</u>	25
3.5.4.2	<u>Kenar tipleri</u>	25
3.5.4.3	<u>Sobel operatörü</u>	27
3.6	Çapraz İlinti Fonksiyonu ve Eşikleme	28
3.7	Görüntü Eşikleme	28
3.7.1	İkili eşikleme	29
3.7.2	Çoklu eşikleme	29
3.7.3	Otsu eşik belirleme yöntemi.....	30
3.7.3.1	<u>Otsu metodu ile çoklu eşikleme</u>	33
3.8	Comet Ölçüm Parametreleri	33
3.8.1	Comet ölçüm parametrelerinin hesaplanması	34
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	38
4.1	İkili Eşik Belirleme Yönteminin Uygulanması	38
4.1.1	'Baş' kısmı için ikili eşik belirleme yöntemi	39
4.1.2	'Kuyruk' kısmı için ikili eşik belirleme yöntemi.....	41
4.2	Çapraz İlinti Fonksiyonu	42
4.2.1	'Kuyruk' kısmı için çapraz ilinti fonksiyonu	42
4.3	Sınır Yapılarının Temizlenmesi.....	43
4.4	Comet Analiz Görüntülerinde Seçim.....	44
4.5	Kontrast Sınırlı Uyarlamalı Histogram Eşitleme	45
4.6	Gauss Filtreleme	46
4.7	Otsu Metodu ile Uyarlamalı Çoklu Eşikleme.....	46
4.8	Kenar Belirleme	49
4.9	Hesaplanan Comet Ölçüm Parametreleri Sonuçları	51
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6.	ÖNERİLER	55
	KAYNAKLAR LİSTESİ	56

Şekil 2.1	(a) DNA'nın ikili sarmal yapısı. (b) Çift ikili sarmalın, şeker, fosfat grupları ve hidrojen bağları (c) Zincirlerin antiparalel düzeninin ve bazların yatay gösterilmesi.	6
Şekil 2.2	DNA hasarı kaynakları ve DNA'da gelişen olaylar	8
Şekil 2.3	Serbest Oksijen Radikallerinin hücredeki etkileri	8
Şekil 2.4	Comet Analizi ile elde edilen örnek mikrografı	10
Şekil 2.5	Comet analizi basamakları	12
Şekil 3.1	(a) Floresan mikroskopu (b) Görüntü analiz sistemi	15
Şekil 3.2	Algoritmanın blok diyagramı	16
Şekil 3.3	Algoritmanın akış diyagramı	17
Şekil 3.4	Yapısal eleman	19
Şekil 3.5	f (x, y) Pikselinin komşulukları (a) 4'lü piksel komşuluğu (b) 8'li piksel komşuluğu	19
Şekil 3.6	Sınır temizleme işlemi (a) Orijinal görüntü (b) Sınır temizleme işlemi sonrasında görüntü	20
Şekil 3.7	Görüntünün eş bölgelere ayrılması	21
Şekil 3.8	KSUHE eşiği ve eşik üzeri bölgelerin dağıtılması	22
Şekil 3.9	(a) IR bölgesi ve komşuları (b) (i,j) bölgesinin 1.çeyreği ve ona en yakın dört bölge ile ilişkileri	23
Şekil 3.10	(a) BR bölgesi ve komşuları (b) (i,j) bölgesinin 2.çeyreği ve ona en yakın iki bölge ile ilişkisi	24
Şekil 3.11	CR bölgesi ve komşuları	24
Şekil 3.12	Kenar tipleri (a) adım (b) rampa (c) çizgi (d) çatı	26
Şekil 3.13	Gürültü binmiş kenar tipleri (a) adım veya rampa (b) çizgi veya çatı ..	26
Şekil 3.14	(a) (b) Sobel operatörleri (c) Maske altında kalan görüntü pikselleri..	27
Şekil 3.15	Örnek görüntü histogramı ve ikili eşikleme işlevine ilişkin giriş ve çıkış görüntüsü	29
Şekil 3.16	Çoklu eşikleme işlevine ilişkin giriş ve çıkış görüntü örnekleri	30
Şekil 3.17	(A) Comet analizine ait DNA'nın piksellerden oluşan görüntüsü. (B) Her pikselin parlaklık değeri gösterimi. (C) DNA yoğunluğu ile gri skala değerleri arasındaki ilişki	34
Şekil 3.18	Farklı kuyruk uzunlukları	35
Şekil 3.19	Hesaplanan bazı Comet ölçüm parametrelerinin gösterimi	36
Şekil 4.1	'0' Derece görüntü	38
Şekil 4.2	'0' Derece görüntüye ait histogram grafiği	38
Şekil 4.3	'4' Derece görüntü	39
Şekil 4.4	'4' Derece görüntüye ait histogram grafiği	39
Şekil 4.5	Farklı hasar derecelerinde DNA görüntüleri.....	40
Şekil 4.6	55 Eşik değeri ile eşiklenmiş görüntü.....	40
Şekil 4.7	25 Eşik değeri ile eşiklenmiş görüntü.....	41
Şekil 4.8	Kuyruk için çapraz ilinti uygulaması sonuçları	42
Şekil 4.9	Gri skala görüntü	43
Şekil 4.10	Sınır yapılarının temizlenmesi işlemi	44
Şekil 4.11	DNA seçme görüntüsü.....	45
Şekil 4.12	Seçilen görüntü.....	45
Şekil 4.13	KSUHE uygulanmış görüntü.....	46
Şekil 4.14	Gauss filtre uygulanmış görüntü	46

Şekil 4.15	(a) ve (b) '0' Derece Analiz Görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve Otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü (c) ve (d) '1' Derece Analiz Görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve Otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü	47
Şekil 4.16	(a) ve (b) '2' Derece analiz görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü (c) ve (d) '3' Derece analiz görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü	48
Şekil 4.17	"4" Derece analiz görüntüleri a) gri skala görüntüsü b)otsu metodu uygulanmış görüntü	49
Şekil 4.18	Sobel Operatörü Uygulanmış Görüntüler (a) '0' derece (b) '1' derece (c) '2' derece (d) '3' derece (e) '4' derece	50
Şekil 5.1	Manuel ölçüm. (a) Baş uzunluğu (b) Kuyruk uzunluğu	53
Şekil 5.2	Tasarlanan algoritmanın eşikleme görüntüsü	53
Şekil 5.3	Manuel ölçüm. (a) Baş uzunluğu (b) Kuyruk uzunluğu	54
Şekil 5.4	Tasarlanan algoritmanın eşikleme görüntüsü	54

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. Comet sınıflandırmaları	14
Çizelge 2. Hesaplanan Comet ölçüm parametreleri	35
Çizelge 3. Hesaplanan Comet ölçüm parametreleri sonuçları.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
THJE	Tek Hücre Jel Elektroforezi
MATLAB	Matrix Laboratory
KSUHE	Kontrast Sınırlı Uyarlamalı Histogram Eşitleme
CR	Corner Region
BR	Boarder Region
IR	Inner Region

1. GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Konusu

DNA (deoksiribonükleik asit) hücrede kalıtsal materyali taşıyan ve nesilden nesile aktarılmasını sağlayan, deoksiribonükleotid alt birimlerinin kovalent bağlarla birbirine eklenmesinden oluşmuş bir makromoleküldür [1].

DNA araştırmalarının en önemli alanları genetik ve tıbbi araştırmalardır. Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı olarak aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. Ancak DNA'nın zarar görebilen bir molekül olması, üzerinde hasarların oluşmasına sebep olmaktadır. DNA hasarı, normal DNA metabolizması sırasında kendiliğinden oluşabileceği gibi fiziksel veya kimyasal etkilerle de oluşabilmektedir [2].

DNA her gün binlerce zarar verici dış ve metabolik iç etkilere maruz kalmaktadır. Bu şekilde oluşan DNA lezyonları genom replikasyonunu ve transkripsiyonunu bloke edebilir. Onarılmayan DNA hasarı, mutasyonlara veya hücre veya organizmanın sağkalımını tehdit eden ölümcül mutasyonlara ya da geniş ölçekli genom hatalarına yol açabilir. DNA hasarı analizleri, hastalık patafizyolojisi ile ilgili bilgilere ek olarak, mesleki olarak zararlı kimyasallara maruz kalmanın erken biyolojik etkilerine yönelik önemli bilgiler de sunar [3]. Bununla birlikte biyogözlem uygulamaları, moleküler epidemiyoloji ve genotoksikoloji alanlarında da DNA hasar tespiti kullanılmaktadır.

Comet analizi ya da tek hücre jel elektroforezi de denilen yöntem, ince agaroz jel katmanları içerisine yerleştirilen DNA'nın elektroforetik ortamda yürütülmesi esasına dayanır. Hasarının derecesine göre, DNA parçaları moleküler ağırlığına bağlı olarak farklı hızlarda hareket eder. Bu da kuyruklu kayan yıldız benzer formda görüntüler oluşmasına sebep olur [2;4;5]. Comet analizi görüntüleri DNA hasar seviyelerine göre 0'dan 4' e kadar derecelendirilir ve Comet analizi programları ile ölçüm parametreleri hesaplanır.

1.2. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Comet analizi, DNA hasarının düşük seviyelerini tespit etmedeki hassasiyeti, her örnek için gerekli hücre miktarının az olması, düşük maliyeti, kolay uygulanabilirliği ve kısa sürede çalışmanın sonlandırılabilir olması nedeniyle genotoksik araştırmalarda tercih edilen bir yöntemdir [3].

Elde edilen görüntülerin analizinde günümüzde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi görsel skorlama tekniğidir. Görsel skorlamanın kullanıcı bağımlı ve analiz süresinin uzun olması sebebiyle Comet veri analizine yönelik analiz programları kullanılmaktadır.

Son yıllarda, literatürde yarı otomatik ve otomatik olarak çeşitli analiz programları yer almaktadır. Yarı otomatik olarak adlandırılan analiz programları, kullanıcıdan analiz öncesinde eşik değeri belirleme, Comet analiz görüntüsünü ve baş kısmını seçme gibi ek bilgiler istemekte, bu nedenle araştırmacının konu hakkındaki tecrübesine bağlı olarak sonuç vermekte ve analiz süresini bağıl olarak uzatmaktadır [6-8]. Otomatik analiz programları ise elde edilen Comet analiz görüntüleri üzerinde, kullanıcıdan bağımsız olarak literatürde verilen ölçüm parametrelerini araştırmacıya sunmakta ve/veya DNA hasar derecesine göre görüntüleri otomatik olarak sınıflandırmaktadır [3;8-15]. Ancak, otomatik analiz programları olarak adlandırılan ticari yazılımlar oldukça pahalıdır.

Bu tez çalışmasının amacı, Comet çalışması sonucunda elde edilen mikroskopik görüntülerin, otomatik olarak belirlenen eşik değeri ile analiz edilen görüntülerin literatürde yer alan ölçüm parametrelerinin hesaplanmasını sağlamaktır.

Elde edilen verilerle, çeşitli derecelerde DNA hasarı bulunan görüntülere yönelik araştırmacıya parametrik veriler sunulması hedeflenmektedir.

1.3. Literatür Özeti

Comet mikrografileri görsel skorlama yöntemi veya görüntü işleme yazılımları kullanılarak analiz edilebilirler. Görsel skorlama yöntemi kolay olmasına rağmen araştırmacı görsel skorlama sonuçlarını görelî birimler olarak ifade etmektedir. Ayrıca, skorlamalar yapılırken araştırmacıların mesleki deneyimleri sonuçları etkileyebilmektedir. Bu nedenle, Comet analizi görüntülerinde yapılan görsel

skorlama çalışmaları subjektif sonuçların elde edilmesine neden olabilmektedir [6]. Görüntü işleme teknikleri kullanılarak geliştirilen yazılımlar ise kullanıcıya niceliksel ve tekrarlanabilir ölçümler sunar.

Literatürde yapılan çalışmalarda, DNA hasar tespitinde sıklıkla kullanılan Comet lm parametrelerinin, Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş uzunluğu, baş kısmındaki DNA yüzdesi, kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi, “Tail Moment” ve “Olive Tail Moment” (OTM) olduğu görülmektedir [10; 15- 17].

Literatürde yapılan çalışmalar doğrultusunda geliştirilen görüntü analiz algoritmalarını yarı otomatik ve otomatik olarak ayırmak mümkündür. Yarı otomatik analiz programları genellikle kullanıcıdan bir değer ya da giriş bilgisi (eşik değeri, Comet DNA'nın tümü ve baş kısmını seçme vb.) ister [7; 10]. Örneğin, kullanıcı tarafından eşik değeri seğildiğinde, bu eşik değeri üzerinden yapılan hesaplamalarla Comet analizi görüntüsünün baş ve kuyruk kısımları belirlenir ve Comet parametreleri hesaplanır. Konca ve ark. tarafından National Institute of Health (NIH) Image programı kullanılarak oluşturulan program bunlardan biridir [8]. Yurtcu ve Kızıltan tarafından Borland Delphi 6.0 kullanılarak geliştirilen görüntü analiz algoritmasında ise, kullanıcıdan bir eşik değeri belirlenmesi istenir ve metrik kalibrasyon, açısal rezolüsyon ayarlamaları ile baş ve kuyruk sınırlarının çizilmesi sağlanır [6].

Otomatik görüntü analiz programlarında ise, kullanıcıdan bir değer istemeksizin Comet analiz görüntüsü tespit edilmektedir. Bu sayede analiz sonuçları, görsel skorlama yöntemine ve yarı otomatik değerlendirmelere kıyasla çok daha hızlı ve objektif olarak elde edilir [10]. Otomatik görüntü analiz programlarında, eşik değeri program tarafından belirlenir. Eşik değeri belirlenirken, deneysel süreç kaynaklı görüntü artefaktlarının analizi etkilememesi için çeşitli görüntü işleme teknikleri ile ön işlemler uygulanır. Yapılan bir çalışmada, görüntüdeki artefaktları temizlemek için morfolojik işlemler ve gölge düzeltme işlemleri uygulanmış, iki aşamalı olarak eşik değeri belirlenmesi ile görüntü sınırları belirlenerek hesaplamalar yapılmıştır [9]. Gyori ve ark. tarafından sunulan OpenComet isimli otomatik analiz programında ise eşik değeri otomatik olarak seçilip Comet lm parametrelerinin sonuçları kullanıcıya verilmektedir [10]. Başka bir çalışmada, morfolojik işlemler sonrasında ‘watershed’ algoritması kullanılarak görüntü sınırları belirlenmiş ve Comet lm

parametreleri hesaplanmıştır [11]. Ek olarak, bu çalışmada, yarı otomatik görüntü analiz algoritmalarında eşik değerinin kullanıcı tarafından seçilmesinin, teknik zorlukları tartışılmıştır. Helma ve ark. da Konca ve ark. ile aynı programlama dilini kullanarak program tarafından otomatik olarak eşik değerinin belirlenmesini sağlamışlar ve Comet ölçüm parametrelerini hesaplatmışlardır [12].

Comet analizi görüntüsünün tespiti ve parametrelerin ölçümüne ek olarak, görüntüleri 0-4 skalasında skorlatmak da mümkündür. Yapılan çeşitli filtrelemeler ile Comet analiz görüntüleri ön işlemlerden geçirilmiş ve bu görüntülerin 0'dan 4 dereceye kadar otomatik olarak skorlanması sağlanmıştır [7; 13; 14]. Sreelatha ve ark. yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, gümüş boyama tekniği ile elde edilen Comet analizi görüntülerinde çalışmışlardır. Bu yöntem, görüntülerin floresan temelli etidyum bromür boyama tekniğine göre, daha artefaktlı olmasına, dolayısıyla analizin zorlaşmasına sebep olmaktadır.

Ayrıca bir diğer çalışmada, gümüş boyama tekniği ve floresan temelli boyama ile elde edilen Comet analizi görüntülerinin hem Comet analiz parametrelerini otomatik olarak hesaplanması hem de görüntülerin hasar seviyelerine göre sınıflandırılması sağlanmıştır [15].

1.4. Genel Bakış

Tez çalışması genel hatlarıyla altı bölümden oluşmaktadır. Tezin birinci bölümünde çalışmanın konusu, amacı ve önemi yer almaktadır. Ayrıca, tez kapsamında tek hücreli jel elektroforezi ile elde edilen görüntülerinin analizine yönelik bugüne dek yapılan çalışmalara da yer verilmiştir.

Tezin ikinci bölümünde, DNA'nın yapısı, DNA hasarı ve Comet analizi ile hasar tespitinin kuramsal temelleri ve nasıl uygulandığı ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Üçüncü bölümde, tez çalışmasında kullanılan matematiksel yöntemler açıklanmış ve eşitlikler verilmiştir.

Dördüncü bölümde, üçüncü bölümde verilen materyal ve yöntem kapsamında yapılan uygulamalardan elde edilen görüntü analizi sonuçları yer almaktadır.

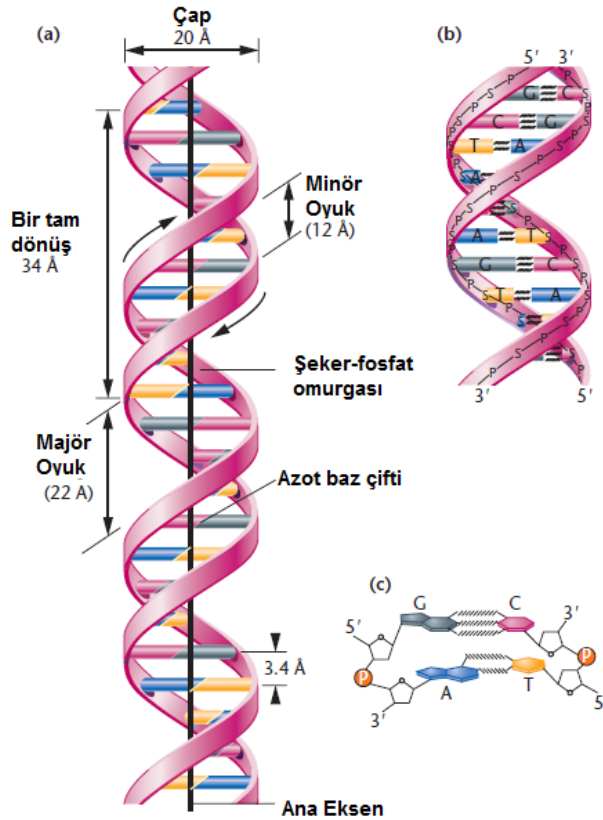
Beşinci bölümde, elde edilen tüm sonuçların değerlendirilmesi bulunmaktadır.

Altıncı bölümde ise çalışmaya ait öneriler kısmı bulunmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Deoksiribonükleik asit (DNA), genetik materyal olarak da isimlendirilen kalıtım molekülüdür. DNA ipliğinin omurgasını fosfodiester bağları ile birbirine bağlanmış (5 karbonlu deoksiriboz) şeker ve negatif yüklü fosfat gruplarının (PO_4^-) tekrarı oluşturmaktadır. Fosfodiester bağ, şeker grubunun 3. karbonu ile diğer şeker grubunun 5. karbonundaki fosfat grubu arasında kurulur. Her bir şekerin 1. karbonuna baz olarak adlandırılan pürin ya da pirimidin halkalı dört tip molekülden (Adenin, Timin, Guanin, Sitozin) biri bağlıdır. DNA molekülü fizyolojik koşullarda hücre içerisinde çift iplik sarmalı şeklinde bulunur. Sarmal yapı, iki iplikte bulunan pürin ve pirimidinler arasında kurulan hidrojen bağları ile stabilize edilir. Bir ipliğin sonundaki serbest 5' ucun karşısına serbest 3' ucun karşılık gelmesi nedeniyle iki ipliğin antiparalel konumlanması söz konusudur [18]. DNA'nın yapısına ait şematik gösterim Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 (a) DNA'nın ikili sarmal yapısı. (b) Çift iplik sarmalın, şeker, fosfat grupları ve hidrojen bağları (c) Zincirlerin antiparalel düzeninin ve bazların yatay gösterilmesi [19].

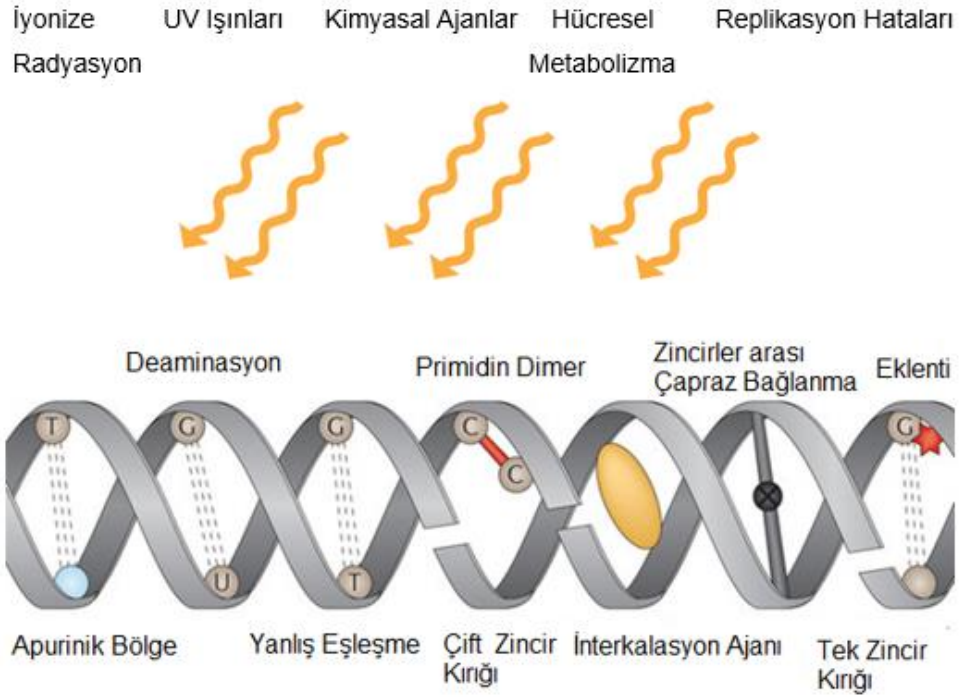
2.1.1. DNA hasarı

Genetik materyalin yapısal ve dizilim bütünlüğünde iç veya dış faktörlerin etkisiyle meydana gelen değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. DNA, yapısal ve dizilim hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. DNA'da oluşan lezyonların enzimatik onarımı mümkündür. Hücrelerde, DNA'da oluşan hasarın tespiti, onarımı ve hasarlı hücrenin programlı ölümü (apoptoz) için moleküler süreçler mevcuttur. DNA hasarına verilen hücresel cevaplar, lezyonların yaşamsal etkilerine, onarımına ve sağkalım/apoptoz yollarına bağlı olarak değişir. DNA hasarı kaynakları ve DNA'da gelişen olaylar Şekil 2.2'de verilmiştir.

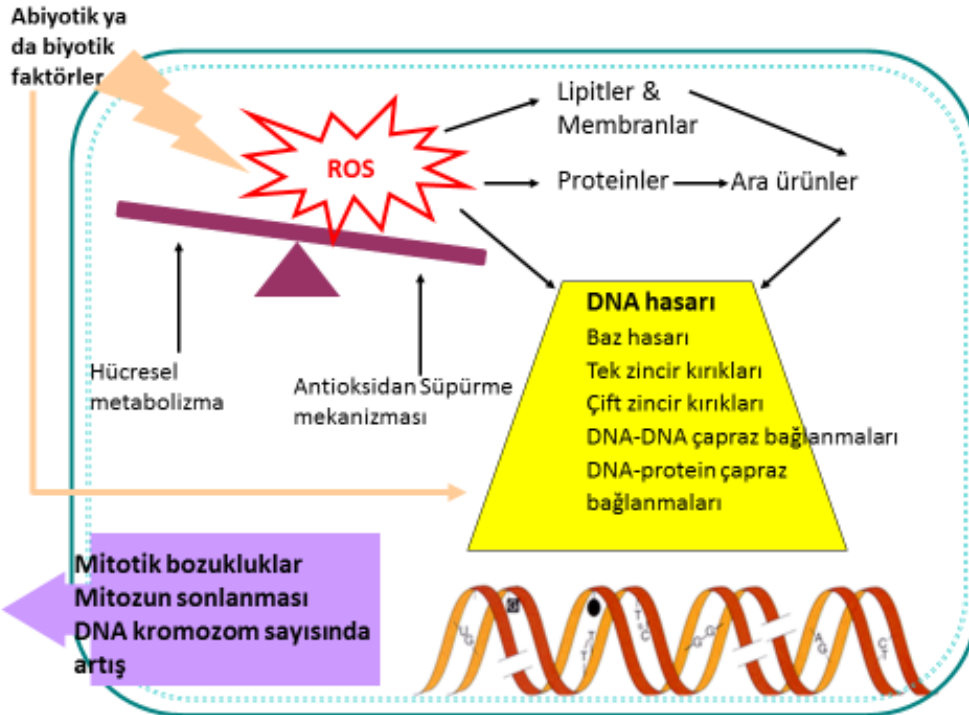
DNA hasarına neden olan faktörlerin başında iyonize radyasyon (X ve gama ışınları, nötron ve elektronlar, alfa parçacıkları) gelmektedir. Radyasyon enerjisinin doğrudan etkisi ile DNA zincir kırıkları oluşurken, radyasyonla açığa çıkan enerjiyle uyarılan moleküllerin (reaktif oksijen türleri) DNA ile etkileşimi hem DNA zincir kırıklarına hem de oksidatif baz modifikasyonlarına neden olmaktadır [20].

Oksidatif baz hasarı, normal metabolizma sırasında oluşabileceği gibi iyonize radyasyon ve çeşitli kimyasallar gibi dış faktörler tarafından da meydana getirilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen radikalleri, dış yörüngelerinde bulunan çiftlenmemiş elektronlar nedeniyle reaktif moleküllerdir. DNA ile kolayca etkileşerek oksidatif baz modifikasyonu ve DNA zincir kırıkları meydana getirebilir. DNA zincir kırıkları tek ve/veya çift sarmal DNA zincir kırıklarıdır ve bir ROS olan hidroksil radikalının DNA ile etkileşimi sonucu oluşabilmektedir [2]. Şekil 2.3'te de reaktif oksijen türlerinin hücredeki etkileri gösterilmiştir.

DNA Hasarına neden olan diğer bir faktör ise UV (ultraviyole) ışınlarıdır. Güneş'ten yayılan UV radyasyonun DNA tarafından absorbe edilmesi, DNA'nın bir ipliğinde yer alan bazlar arasında pirimidin dimerlerinin oluşmasına neden olur [20]. Bununla birlikte çapraz bağlanmalara ve zincir kırıklarına yol açmaktadır [2].



Şekil 2.2 DNA hasarı kaynakları ve DNA'da gelişen olaylar [21]



Şekil 2.3 Serbest Oksijen Radikallerinin hücredeki etkileri [22]

2.1.2. DNA onarımı eksiklikleri ve hatalarının sonuçları

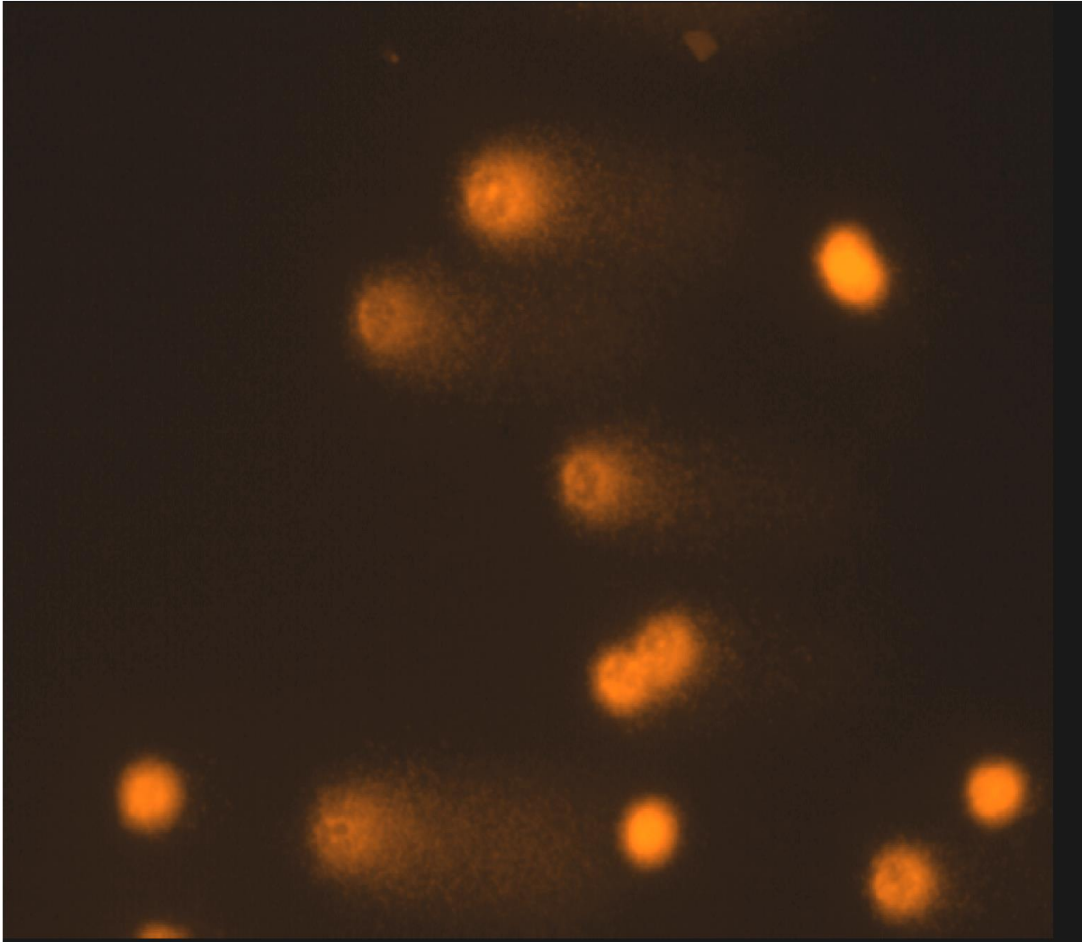
DNA onarımındaki eksiklikler ve hatalar genetik kararsızlığa neden olur. DNA onarım mekanizmalarından sorumlu olan gen ve proteinlerdeki değişikliklerin kanser, yaşlanma ve bazı genetik hastalıklarla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Örneğin, kalıtsal non-polipozal (polip oluşumu gözlenmeyen) kolorektal kanser, yanlış eşleşmenin onarımındaki bozukluktan kaynaklanırken, nükleotid eksizyon onarımındaki bozukluklar UV kaynaklı cilt kanseri riskinde artışa sebep olmaktadır. Meme kanseri ise çeşitli çalışmalarda iyonize radyasyona maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir [18].

2.2. Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Analizi) Nedir?

Elektroforez, yüklü moleküllerin yarı katı bir ortamda elektrik akımı ile hareketi esasına dayanan bir yöntemdir. Omurgasında bulunan negatif yüklü fosfat grupları nedeniyle DNA toplamda negatif yüklü bir makromoleküldür ve elektroforetik yöntemlerle incelenebilmektedir. DNA hasarı, ilk kez Rydberg ve Johnson tarafından tek hücre elektroforezi ile 1978 yılında niceliksel olarak tespit edilmiştir [23]. Çift boya kullanılarak uygulanan bu mikroskopik görüntüleme yöntemi, 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından mikrojel elektroforez protokolü ve DNA'ya bağlanan floresan boya kullanımı ile tespit hassasiyeti artırılarak geliştirilmiştir. Östling ve Johanson tarafından geliştirilen protokol, nötral koşullarda yürütüldüğünden DNA süperkoil yapının açılmasına neden olan tek zincir kırıkları tespit edilmekteydi [24]. Daha sonra, Singh ve ark. (1988) tarafından modifiye edilen protokol, kuvvetli alkali ortamda (pH >13) uygulanmakta ve hem tek zincir hem de çift sarmal kırıklarının nicel tespitine olanak sağlamaktadır [25].

Comet analizinin temel prensibi, tek hücre ve çekirdekten elde edilen DNA'nın incelenmesi esasına dayanır. Böylelikle, kimyasal ve fiziksel faktörlerin canlı hücreler üzerindeki genotoksik etkileri belirlenebilmektedir. Genel olarak, canlı hücre patlatılarak çekirdek veya DNA izole edilir ve lam üzerinde ince agaroz jel tabaka katmanları içerisine gömülür. Agaroz jel tabakaları içerisindeki DNA'nın elektrik akımı ile elektroforetik ortamda hareketi sağlanır. Alkali ortamda kromatin yapısının açılması ve DNA'nın kısmen denatüre olması sağlanır. Genotoksik faktörlerin etkisiyle DNA'nın tek ve/veya çift zincirindeki kırılmalar nedeniyle farklı

molekül ağırlığında DNA parçaları oluşur. Farklı moleküler ağırlıktaki DNA parçaları elektroforetik ortamda farklı hızda hareket eder. Elektroforezin ardından jel içerisindeki DNA, etidyum bromür gibi DNA'ya özgül bir boya ile işaretlenir ve floresan mikroskop altında incelenir. Hasar görmemiş intakt süperkoil DNA çekirdek yapıda çok yavaş hareket eder ve mikroskop altında dairesel formda gözükür. Tek ve/veya çift zincir kırıkları, çapraz bağlanmalar ve baz hasarı gibi lezyonlar nedeniyle süperkoil yapısı büyük ölçüde açılan ve/veya farklı boyutlara parçalanan DNA, parçaların moleküler ağırlığına bağlı olarak farklı hızlarda hareket eder. Hasarın derecesine yani farklı boyutlardaki DNA parçalarına ve/veya süperkoil yapıdaki gevşemelere göre dairesel formda bir “baş” ve dağınık “kuyruk” görüntüsü meydana gelir. Kuyruklu kayan yıldız benzer forma görüntüler nedeniyle yöntem İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet” adı verilmiştir [2;4;5;25]. Şekil 2.4'te Comet analizi ile elde edilen örnek mikrografi görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.4 Comet Analizi ile elde edilen örnek mikrografi

2.2.1. THJE basamakları

THJE yöntemi DNA'ya sahip tüm canlı hücrelere uygulanabilir bir yöntemdir. Yöntemin farklı hücre tiplerine ve amaca göre değişken basamakları ve sıralaması olmakla birlikte, protokolün genel basamakları aşağıda verilmektedir [25-27]. Verilen bu basamaklara ait şematik gösterim Şekil 2.5'te bulunmaktadır.

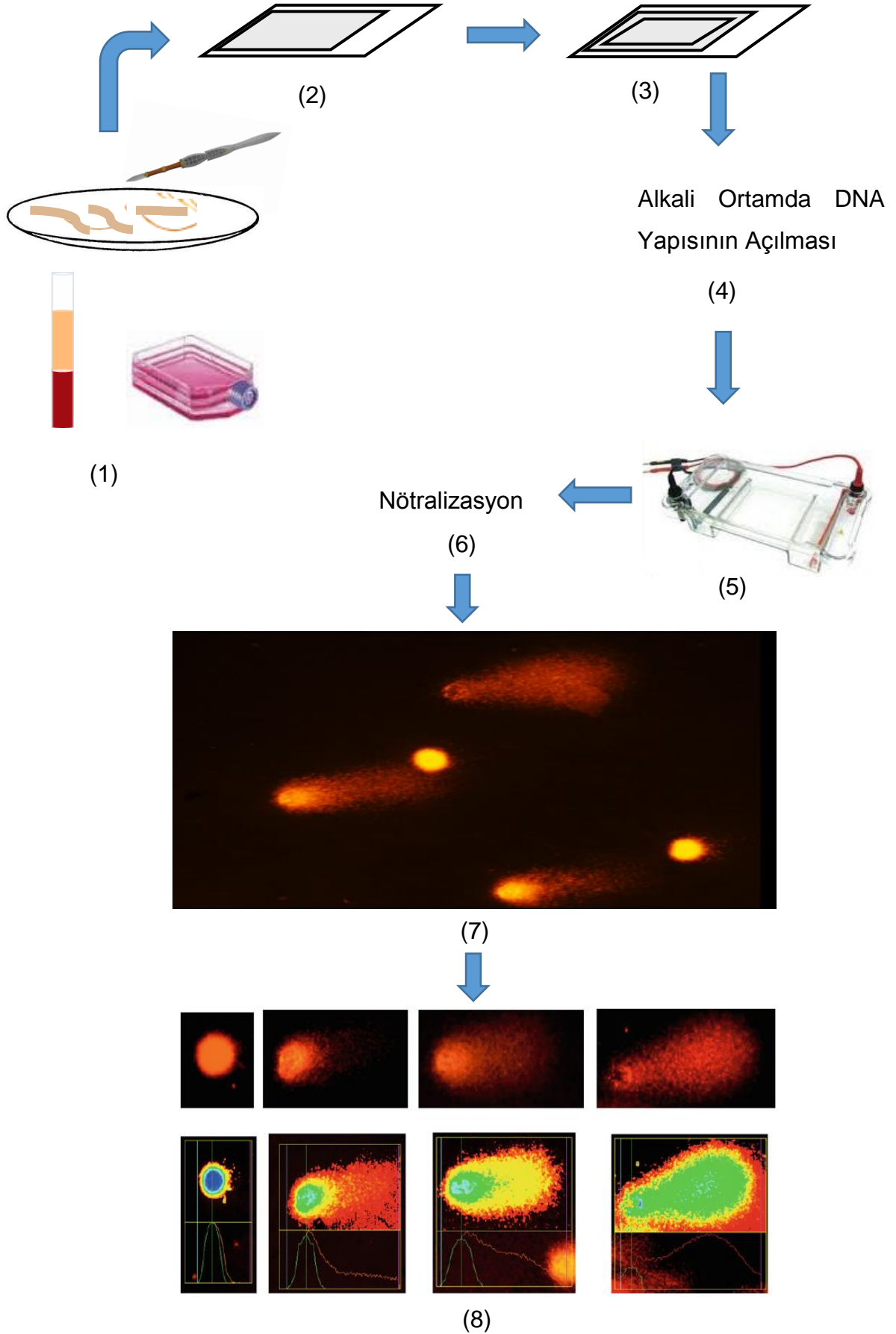
1. Hücrelerin hazırlanması
2. Lamların hazırlanması
3. Hücre patlatma
4. Alkali ortamda DNA yapısının açılması
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. DNA boyama ve Comet görüntüleme
8. Comet değerlendirme

2.2.1.1. Hücrelerin hazırlanması

Sağlıklı bir analiz için örnek materyale uygun olarak hazırlama basamağı kullanılır. Tam kan (polimorf lökositler, mononükleer hücre fraksiyonları), çeşitli bitki dokuları, primer doku kültürü ve hücre dizisi örnekleri, sperm hücreleri gibi çok farklı materyallerden örnek hazırlığı yapılabilir. Hücre tipine göre uygun doku parçalama ve hücre hazırlama protokolleri uygulanır [2; 5; 26; 27].

2.2.1.2. Lamların hazırlanması

Mikroskop altında inceleme sırasında net ve temiz bir görüntü elde edebilmek için tüm işlemler bitinceye kadar lam üzerindeki jel katmanlarının bozulmadan kalabilmesi gerekmektedir. Hücre tipine göre katman sayısı farklılık gösterebilir. Lamların üzerine öncelikle ön kaplama denilen normal erime dereceli agaroz jel yayılır. Ön kaplama yapılan lamlar kuruduktan sonra, düşük erime dereceli agaroz jel içerisinde süspansiyon edilmiş hücreler ön kaplama yapılmış olan lamların üzerine tabakalandırılır. Bu tabaka agaroz jel katılaştıktan sonra, üçüncü kat düşük erime dereceli agaroz jel lamların üzerine yayılır. Böylelikle, iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren bir jel sistemi oluşturulur [2; 22; 26; 27].



Şekil 2.5 Comet analizi basamakları [22]

2.2.1.3. Hücre patlatma

Agaroz jel tabakaları donduktan sonra, jel sistemi yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren ve hücre tipine özgül belirlenen çözeltide, 4°C'da karanlık ortamda iki saat bekletilir. Bu işlemin amacı, DNA'nın agaroz jel içerisinde serbest kalmasını sağlamaktır. Hücre Patlatma işlemi sırasında biyolojik zarlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten ya da DNA'dan uzaklaştırılır. DNA küçük bir miktar nonhiston proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapısında kalır. Lamlar birkaç defa uygun bir tampon ile yıkanarak, hücresel artıklar ile kalan deterjan ve tuzlar uzaklaştırılır [2; 26; 27] .

2.2.1.4. Alkali ortamda DNA yapısının açılması

Hazırlanan lamlar, çift sarmal DNA yapısının açılması (denatürasyon) için elektroforez öncesinde yüksek alkali (pH>13) elektroforez tamponunda bekletilir. Alkali tampon içerisinde çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar [2; 26; 27] .

2.2.1.5. Elektroforez

DNA sarmalının açılmasından sonra, jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali koşullarda 24 V (300 mA) 20 dk. süresince karanlık ve soğuk ortamda elektroforeze tabi tutularak Comet oluşumu sağlanır [2; 26; 27] .

2.2.1.6. Nötralizasyon

Elektroforez işlemi tamamlandıncı alkali tampon çözeltisinin uzaklaştırılması için lamlar uygun nötral (pH 7-7.5) bir tamponla (0.4 M Tris) en az 3 kez yıkanır [2; 26; 27].

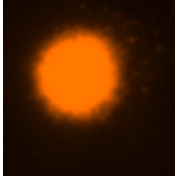
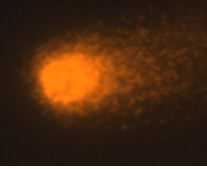
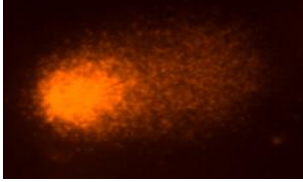
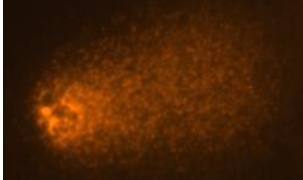
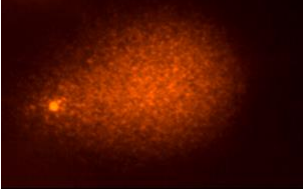
2.2.1.7. DNA boyama ve comet görüntüleme

DNA'nın görüntülenebilmesi için DNA'nın özgül bir boya ile boyanması yani işaretlenmesi gerekmektedir. Yaygın olarak, floresan özellikli etidyum bromür kullanılsa da gümüş nitrat (AgNO₃) boyama tekniği de görüntülemeye kullanılmaktadır [2; 26; 27].

2.2.1.8. Comet değerlendirme

Comet mikrografilerinde 5 farklı kategoride görüntü elde edilir. Görsel skorlama dikkate alındığında, 0 dereceli görüntünün baş kısmı net bir şekilde görünüp kuyruk kısmı oluşmazken, Comet derecesi arttıkça, görüntüdeki kuyruk uzunluğu artıp baş kısmının görünürlüğü azalmaktadır. Comet analiz görüntülerinin sınıflandırılıp değerlendirilmesinde görsel skorlama tekniği ya da görüntü işleme yazılımları kullanılmaktadır. Çizelge1'de 5 farklı kategoride görsel olarak skorlanan Comet analiz görüntüleri verilmiştir. 400X büyütme faktörünü, AU ise (arbitrary units) görece birimleri göstermektedir.

Çizelge1. Comet sınıflandırmaları [22]

Comet Skoru	400X	AU
0		0xhücre# ₀
1+		0xhücre# ₁
2+		0xhücre# ₂
3+		0xhücre# ₃
4+		0xhücre# ₄

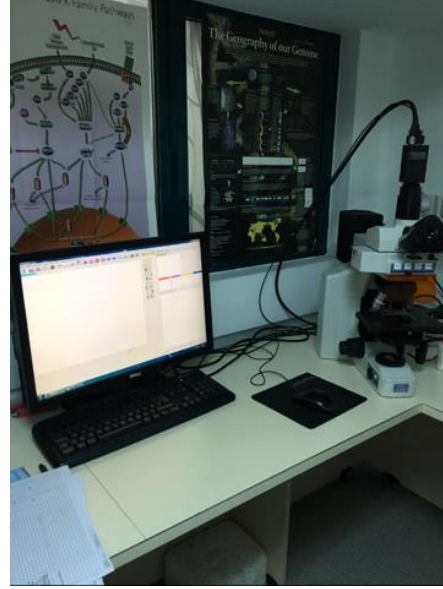
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Comet Analiz Görüntülerinin Elde Edilmesi

Tez çalışmasında kullanılan Comet analiz görüntüleri HepG2 (ATCC HB-8065) hepatosellüler karsinom karaciğer kanser hücrelerinden elde edilmiştir. Örnekler, Bölüm 2.2.1.'de anlatılan Comet analizi basamaklarına göre hazırlanmıştır. Şekil 3.1.'de floresan mikroskobu (Nikon, Eclipse E600) ve floresan mikroskobundan elde edilen görüntünün analizi için kullanılan sistem verilmiştir. Görüntüler 400x büyütme faktörü kullanılarak görüntülenmiştir.



(a)

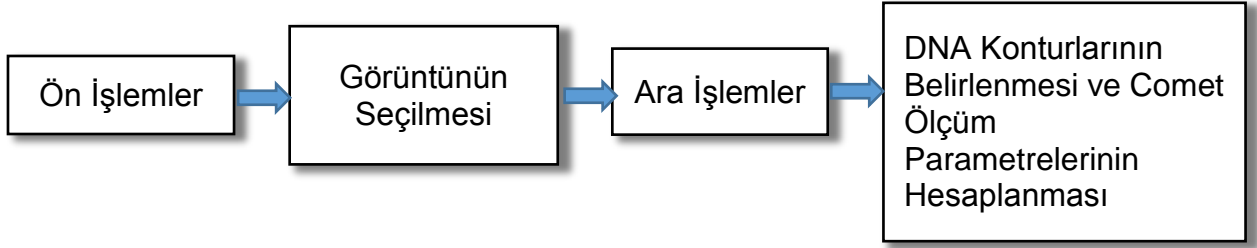


(b)

Şekil 3.1 (a) Floresan mikroskobu (b) Görüntü analiz sistemi

3.2. Analiz Yöntemine Genel Bakış

EtBr ile boyanıp floresan mikroskobuyla görüntülenen HepG2 (ATCC HB-8065) hücreleri MATLAB programı ile geliştirilen algoritma ile analiz edilmiştir. Algoritma; Ön İşlemler, Görüntünün Seçilmesi, Ara İşlemler, DNA Konturlarının Belirlenmesi ve Comet Ölçüm Parametrelerinin Hesaplanmasını içeren dört kısımdan oluşmaktadır. Algoritmanın blok diyagramı Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2 Algoritmanın blok diyagramı

3.3. Görüntünün Sayısallaştırılması

Sayısal görüntü analog sinyalin dijital sinyale çevrilmesi ile elde edilir. Dijital sinyale çevrilen sinyal ise görüntü oluşturulmak üzere matris elemanları olarak dizilir. Matrise dizilen her bir elemente piksel denir. Her pikselin uzaysal koordinatları ise $f(x,y)$ olarak ifade edilir. Eşitlik 3.1’de verilen M sütun sayısını, N satır sayısını göstermektedir. $f(x,y)$ olarak ifade edilen koordinat çifti, 8 bit görüntü için ayrıca $0 \leq f(x,y) \leq 255$ olacak şekilde parlaklık bilgisini de içermektedir [28].

$$f(x,y) = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,N-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,N-1) \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & \dots & f(M-1,N-1) \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

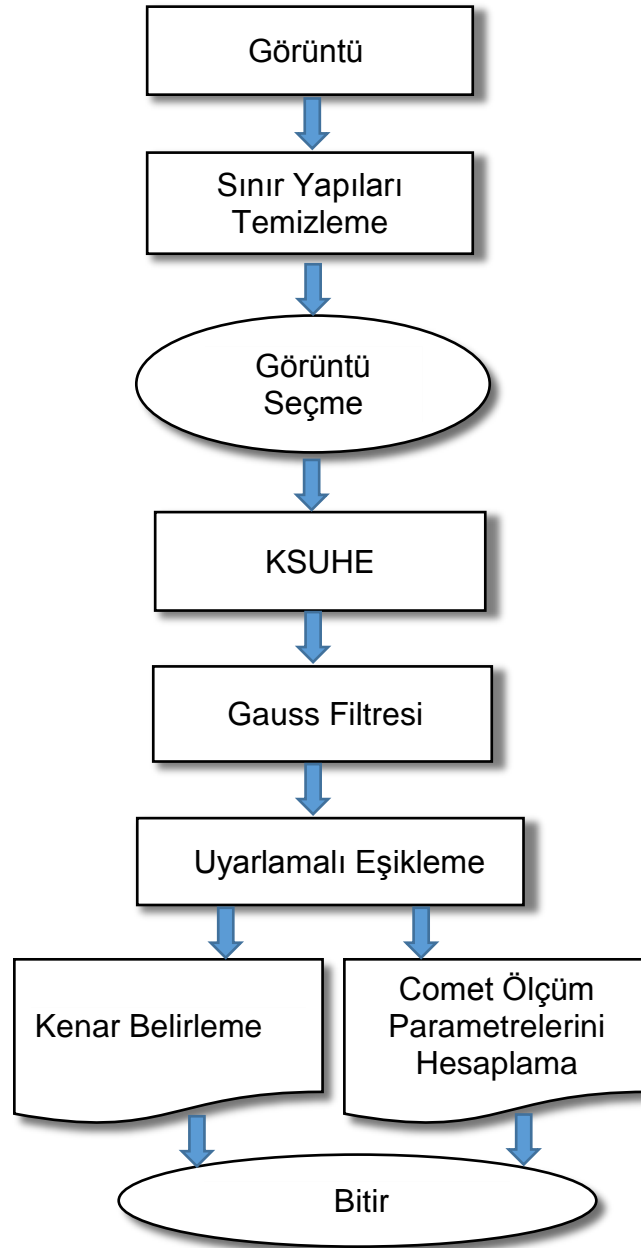
3.4. Renkli Görüntünün Gri Skala Görüntüye Çevrilmesi

THJE yönteminde DNA’nın görüntülenebilmesi için DNA’nın özgül bir boya ile işaretlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple elde edilen görüntüler gri skala yerine 3 ana rengin farklı oranlarda temsil edildiği RGB (Red Green Blue) düzleminde olmaktadır. Bu çalışmada işlem kolaylığı olması açısından RGB düzleminde elde edilen Comet analiz görüntüleri RGB bileşenlerini içeren eşitlik 3.2 ile gri skala görüntüye çevrilmiş ve sonraki işlemler gri skalaya çevrilmiş görüntüler üzerinde uygulanmıştır [29].

$$X = 0.2989 * R + 0.5870 * G + 0.1140 * B \quad (3.2)$$

3.5. Görüntü İyileştirme Yöntemleri

Görüntü iyileştirme, dijital görüntülerin daha iyi görselleştirilmesi ve ileri görüntü işleme analizleri için düzenlenmesi işlemleridir. Görüntü iyileştirme işlemlerinden beklenen, görüntüdeki gürültülerin ortadan kaldırılması, sınırların, parlaklıkların, belirlenen özelliklerin ortaya çıkarılması veya gizlenmesidir. Comet analizinde belirlenen parametreleri hesaplamadan önce görüntülerin analiz edilebilir hale getirilmesi için bir takım işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Şekil 3.3'te tasarlanan algoritmaya ait akış diyagramı verilmiştir.



Şekil 3.3 Algoritmanın akış diyagramı

3.5.1. Gri seviyeli morfolojik geriçatma

Morfoloji (biçimbilim), görüntüdeki sınırlar, iskeletler ve dışbükey zarf gibi bölgesel şekillerin tanım ve temsilinde görüntü bileşenlerini elde edebilmek için kullanılacak teknik ya da teknikleri niteler. Söz konusu morfolojik teknikler, budama, inceltme, genişletme ve morfolojik süzgeçleme gibi ön veya son işlemlerde kullanılabilir. Morfolojik geri çatma işlemi, bir yapısal eleman ve iki görüntüyü ihtiva eden bir morfolojik dönüşümdür [28].

Morfolojik geriçatma işlemleri, işaretli yapıların ortaya çıkarılmasında, koyu renkli piksellerle çevrili açık renkli piksellerin bulunması, görüntü kenarlarındaki yapıların tespiti veya ortadan kaldırılması, görüntü boşluklarının doldurulması veya tespit edilmesi gibi birçok işlemde kullanılmaktadır [28].

3.5.1.1. Kesel (Geodesik) genişletme

Kesel (Geodesik) Genişletme, morfolojik geriçatma işlemlerinde kullanılan tekniklerden biridir. F işaretçi görüntü, G maske görüntüsü, B ise yapısal elemanı temsil eder. Eşitlik 3.3'te 1 büyüklüğündeki işaretçi görüntünün genişletilmesi ifadesi bulunmaktadır. Bu eşitlikte \oplus işlemi geodesik genişletme, \wedge ise genişletme hesaplamasından sonra her (x, y) noktasında G ve sonuç arasındaki en küçük değerin seçilmesi işlemi göstermektedir [28].

$$D_G^{(1)}(F) = (F \oplus B) \wedge G \quad (3.3)$$

B yapısal elemanı ile F 'nin geodesik genişletmesi eşitlik 3.4'te verilmiştir.

$$[F \oplus B](x, y) = \max_{(s,t) \in B} \{F(x-s, y-t)\} \quad (3.4)$$

Bir F işaretçi görüntü ile bir G gri seviye görüntüsünün genişleme ile morfolojik geri çatması F 'nin G 'ye göre geodesik genişlemesidir. Bu işlem kararlı durum elde edilinceye kadar devam eder.

İkili görüntüler için B yapısal elemanı Şekil 3.4'teki gibi temsil edilebilir.

$$B = \begin{array}{|c|c|c|} \hline 1 & 1 & 1 \\ \hline 1 & 1 & 1 \\ \hline 1 & 1 & 1 \\ \hline \end{array}$$

Şekil 3.4 Yapısal eleman

3.5.1.2. İki boyutlu görüntüde piksel komşulukları

Görüntüde piksel komşuluğu, bir pikselin bağlantılı olduğu diğer pikselleri tanımlar. 4'lü piksel komşuluğu bir pikselin yatay ve dikey yönde ilişkili olduğu pikselleri, 8'li piksel komşuluğu bir pikselin yatay, dikey ve diyagonal yönde ilişkili olduğu pikselleri ifade eder. Şekil 3.5'te 4'lü piksel komşuluğu ve 8'li piksel komşuluğu gösterilmiştir [28].

	$f(x, y+1)$	
$f(x-1, y)$	$f(x, y)$	$f(x+1, y)$
	$f(x, y-1)$	

(a)

$f(x-1, y+1)$	$f(x, y+1)$	$f(x+1, y+1)$
$f(x-1, y)$	$f(x, y)$	$f(x+1, y)$
$f(x-1, y-1)$	$f(x, y-1)$	$f(x+1, y-1)$

(b)

Şekil 3.5 $f(x, y)$ Pikselinin komşulukları a) 4'lü piksel komşuluğu b) 8'li piksel komşuluğu

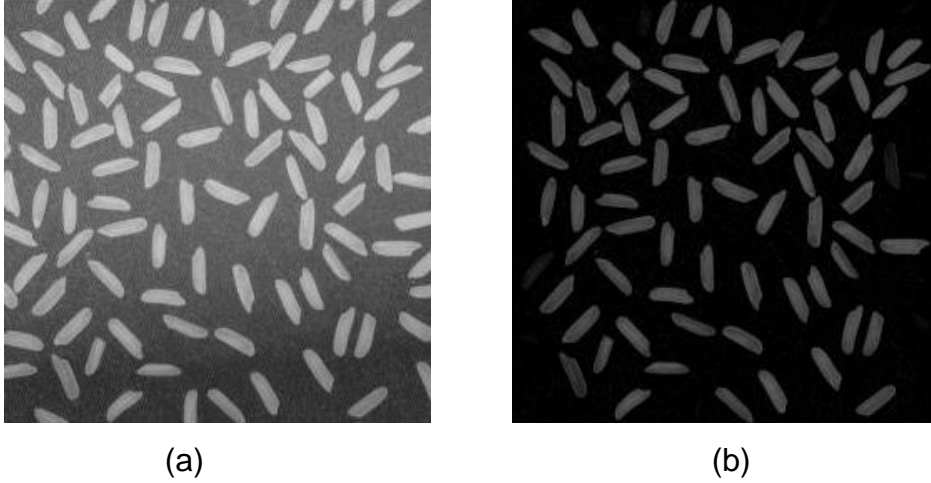
3.5.1.3. Görüntünün sınır yapılarının temizlenmesi

Görüntünün sınır yapılarının temizlenmesi işlemi, eğer görüntü kenarında ve görüntünün çevresinde bulunan noktalar, görüntüden daha düşük parlaklıkta ise bu noktaların filtrelenmesi prensibine dayanmaktadır [28]. Bu işlem Şekil 3.5'te verilen 4-lü piksel komşuluğu veya 8'li piksel komşuluğuna göre uygulanan geodesik genişletme işlemi ile gerçekleştirilir. Bu uygulamada, maske olarak I orijinal görüntü, F işaretçi görüntü olarak eşitlik 3.5'de verilmiştir.

$$F(x, y) = \begin{cases} I(x, y), & (x, y) \text{ I'nın sınır bölgeleri üzerinde ise} \\ 0, & \text{diğer} \end{cases} \quad (3.5)$$

Sınır temizleme algoritmasında morfolojik geriçatma işlemlerinden olan geodesik genişletme işlemi yapılır ve daha sonra eşitlik 3.6'da verilen I orijinal görüntüsünden geodesik genişletme ile morfolojik geri çatma işlemi uygulanmış görüntü çıkarılarak sınırı herhangi bir nesnenin dokunmadığı X görüntüsü elde edilir. Şekil 3.6'da sınır temizleme işlemine ait örnek bir uygulama verilmiştir. Bu çalışmada sınır temizleme işlemi Comet analiz görüntüleri çevresinde bulunan boyama ya da görüntüleme tekniklerinden kaynaklanan artefaktları ortadan kaldırmak amacıyla kullanılmıştır.

$$X = I - R_I^D(F) \quad (3.6)$$



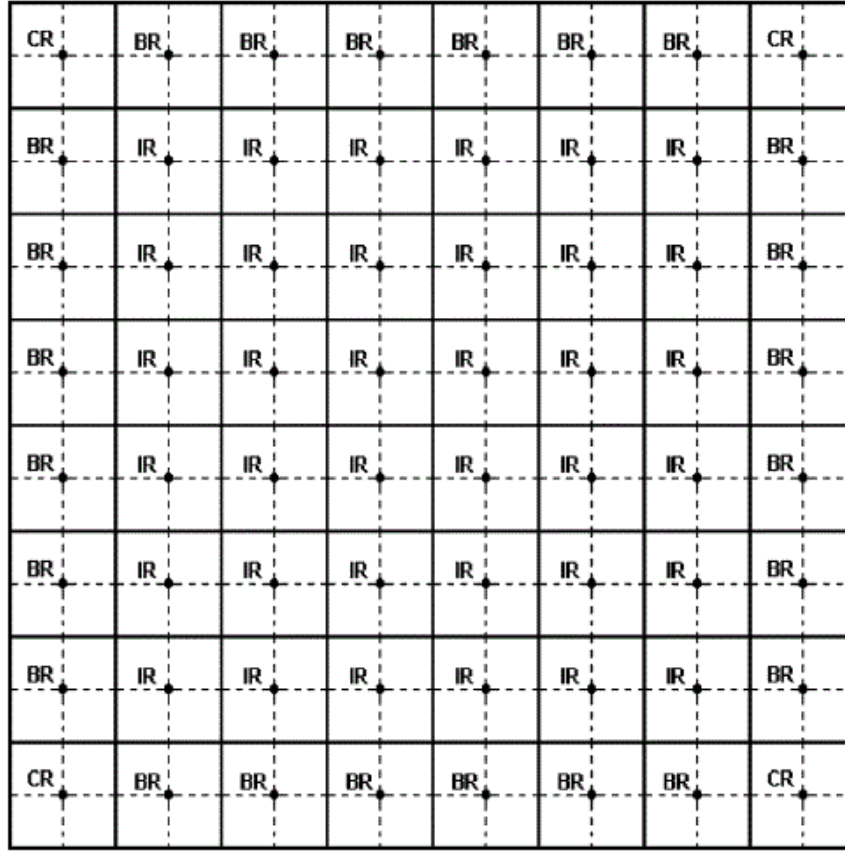
Şekil 3.6 Sınır temizleme işlemi (a) Orijinal görüntü (b) Sınır temizleme işlemi sonrasında görüntü [28]

3.5.2. Kontrast sınırlı uyarlamalı histogram eşitleme (KSUHE)

Histogram, görüntünün piksel parlaklık değerlerine karşı, bu değerlerin görüntü içerisindeki dağılımını ifade eden grafikdir. Kontrast sınırlı uyarlamalı histogram eşitleme, görüntünün belirli parçalara ayrılarak her bir bölgede uyarlamalı histogram eşitlemenin sınırlandırılması yöntemidir [30].

KSUHE uygulamasında görüntü, birbiri ile örtüşmeyen eşit boyutlarda parçalara ayrılır. Örneğin, 512x512 piksel boyutlu bir görüntü, Şekil 3.7'de görüldüğü gibi her bir kenarı 8 piksel olan 64 eşit parça olacak şekilde ayrılır üç farklı gruba ayrılır. Bu

parçalar CR (Corner Region), BR (Boarder Region) ve IR (Inner Region) olarak adlandırılır [31].



Şekil 3.7 Görüntünün eş bölgelere ayrılması [31]

Bu uygulamada, öncelikle ayrılan her bir parçanın eşitlik 3.7 ile (probability density function, PDF) olasılık yoğunluk fonksiyonu hesaplanır. *Pdf* ile her bir parçanın histogramı hesaplanmış olur. *Pdf*ye ait denklem eşitlik 3.7'de verilmiştir. Bu eşitlikte m bit sayısı olmak üzere, verilen k , parlaklık seviyesini, p_k , k parlaklık seviyesinin görüntü içerisinde kaç adet olduğu, p ise toplam piksel sayısını göstermektedir.

$$pdf(k) = \frac{p_k}{p}, \quad 0 \leq k \leq 2^m - 1 \quad (3.7)$$

Ardından eşitlik 3.8 ile her (i,j) bölgesinin gri skala haritalaması hesaplanır. Bu eşitlikte verilen N , her bölge için $(n=0,1,2,\dots, N-1)$ için gri seviye sayısı, $h_{i,j}(k)$ giriş

görüntüsü, $f_{i,j}(n)$ çıkış görüntüsüdür. Bu işlem histogram denkleştirme olarak ifade edilir.

$$f_{i,j}(n) = \frac{(N-1)}{p} \cdot \sum_{k=0}^n h_{i,j}(k) \quad (3.8)$$

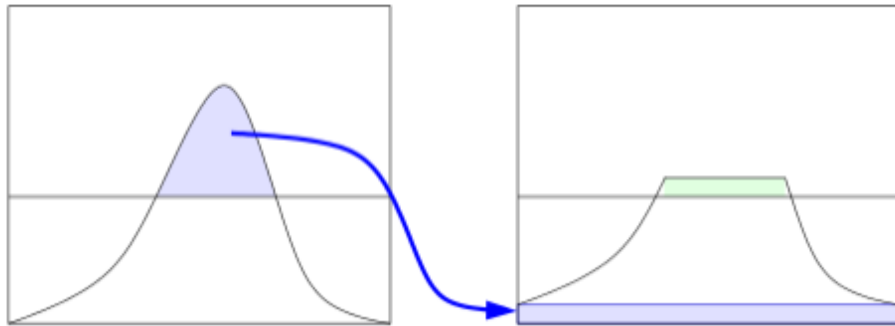
Histogram denkleştirme işlemi ile maksimum kontrastlık elde edilir. Kontrastlığı istenen seviyeye çekmek için eşitlik 3.9'da verilen maksimum eğimin sınırlandırılması gerekir [31]. Maksimum eğimin sınırlandırılması ise histogram yüksekliğinin kırılması demektir [30]. Maksimum eğimi sınırlandırmak için eşitlik 3.9'da verilen β kırma limiti kullanılır. Eşitlik 3.9'da verilen N gri seviye sayısı, M toplam piksel sayısı α kırma faktörü, s_{max} maksimum eğimdir. Böylelikle her bölgenin histogramına göre kırma sınır değeri elde edilir.

$$\beta = \frac{M}{N} \left(1 + \frac{\alpha}{100} (s_{max} - 1)\right) \quad (3.9)$$

$$0 \leq \alpha \leq 100$$

$$1 \leq s_{max} \leq 100$$

Kırma sınır değeri belirlenen histogram bölgelerinde, bu limiti aşmayacak şekilde eşitlik 3.8 ile histogramlar tekrar oluşturulur. Şekil 3.8'de KSUHE uygulamasına ait grafiksel gösterim bulunmaktadır. Ardından, bilineer enterpolasyon yöntemi kullanılarak yeni görüntü elde edilir [31].

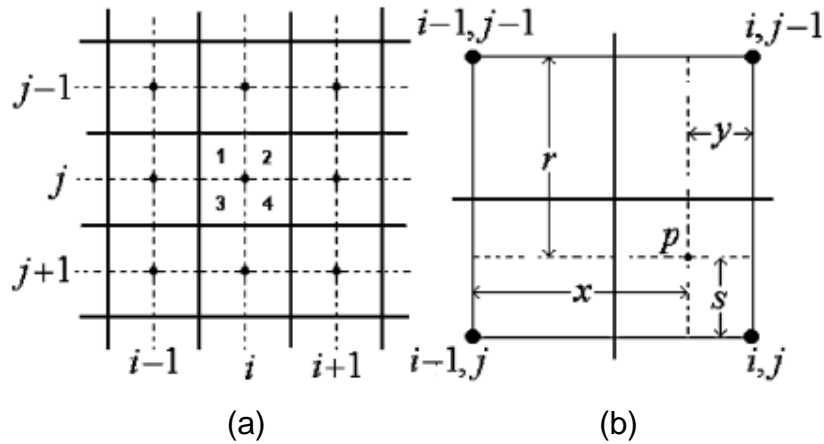


Şekil 3.8 KSUHE eşik ve eşik üzeri bölgelerin dağılımı

Bilineer enterpolasyon yöntemine göre Şekil 3.7’de verilen her bölge dört çeyrek parça olarak düşünülür. Şekil 3.9’da görüldüğü gibi, verilen IR grubundaki her bölgenin her çeyreği dört komşuya sahiptir.

IR grubuna ait bölgelerdeki p pikselinin yeni değeri eşitlik 3.10 ile hesaplanır. Eşitlik 3.10’da verilen p değeri hesaplanan piksel, r , s , x ve y değerleri ise p pikselinin en yakın dört bölge ile olan mesafeleri temsil etmektedir. Bu mesafelere ait gösterim Şekil 3.9’da verilmiştir.

$$p_{yeni} = \frac{s}{r+s} \left(\frac{y}{x+y} f_{i-1,j-1}(p_{eski}) + \frac{x}{x+y} f_{i,j-1}(p_{eski}) \right) + \frac{r}{r+s} \left(\frac{y}{x+y} f_{i-1,j}(p_{eski}) + \frac{x}{x+y} f_{i,j}(p_{eski}) \right) \quad (3.10)$$

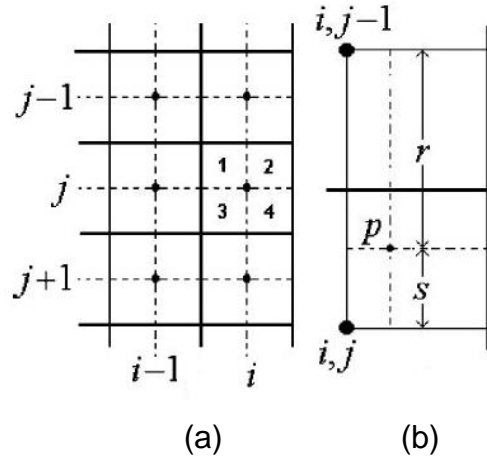


Şekil 3.9 (a) IR bölgesi ve komşuları (b) (i,j) bölgesinin 1.çeyreği ve ona en yakın dört bölge ile ilişkileri [31]

BR grubuna ait bölgelerde Şekil 3.10 (a)’da görüldüğü gibi 1. ve 3. çeyrekteki piksellerin komşuluk yapıları IR grubundaki bölgeler ile aynıdır. Ancak 2. ve 4. çeyrekteki p pikselinin yeni değeri eşitlik 3.11 ile hesaplanır.

Eşitlik 3.11’de verilen p değeri hesaplanan pikseli, r ve s değerleri ise p pikselinin en yakın iki bölge ile olan mesafeleri temsil etmektedir.

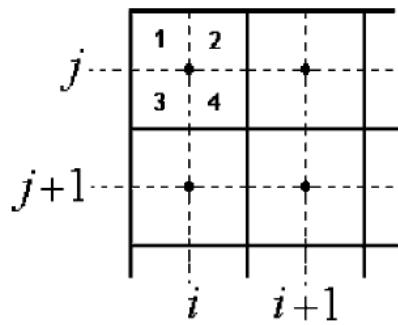
$$p_{yeni} = \frac{s}{r+s} f_{i,j-1}(p_{eski}) + \frac{r}{r+s} f_{i,j}(p_{eski}) \quad (3.11)$$



Şekil 3.10 (a) BR bölgesi ve komşuları (b) (i,j) bölgesinin 2.çeyreği ve ona en yakın iki bölge ile ilişkisi [31]

CR grubuna ait bölgelerde Şekil 3.11 'de görüldüğü gibi 4. çeyrekteki piksellerin komşuluk yapıları IR grubundaki bölgeler ile 2. ve 3. çeyrekteki p pikselinin yeni değeri ise BR grubundaki bölgeler ile aynıdır. 1. çeyreğin diğer bölgeler ile komşuluğu bulunmamaktadır. Bu nedenle, eşitlik 3.12'de görüldüğü gibi 1. çeyrekteki piksellerin değeri değişmez. Eşitlik 3.12'de p piksel değeri gösterilmektedir.

$$p_{yeni} = f_{i,j}(p_{eski}) \quad (3.12)$$



Şekil 3.11 CR bölgesi ve komşuları [31]

KSUHE uygulaması ile Comet analiz görüntülerindeki baş ve kuyruk kısımlarının kontrastlığının artırılması hedeflenmiştir.

3.5.3. Filtreleme işlemleri

Filtreleme işlemleri, bir görüntüyü iyileştirmek veya değiştirmek amacıyla kullanılan tekniklerdir. Örneğin, istenmeyen özelliklerin görüntü üzerinden kaldırılması işlemlerinde, görüntüyü keskinleştirme, yumuşatma ve kenar belirginleştirme için sıklıkla kullanılır [32].

Bu çalışmada kontrast sınırlı uyarlamalı histogram eşitleme işleminden sonra, Comet analizi görüntülerindeki sınırları yumuşatmak amacıyla görüntü yumuşatma filtrelerinden olan Gaussian alçak geçiren filtre kullanılmıştır. Eşitlik 3.13 ve 3.14'te verilen h_g gaussian matrisini, h yumuşatılmış görüntüyü, σ varyansı ifade eder. Bu tez çalışmasında $\sigma = 1.5$ olarak kullanılmıştır.

$$h_g(n_1, n_2) = e^{-\frac{(n_1^2 + n_2^2)}{2\sigma^2}} \quad (3.13)$$

$$h(n_1, n_2) = \frac{h_g(n_1, n_2)}{\sum n_1 \sum n_2 h_g} \quad (3.14)$$

3.5.4. Kenar belirleme

Kenar belirleme işlemleri sayısal görüntülerde kenar tespiti yapmak amacıyla kullanılan işlemlerdir.

3.5.4.1. Görüntüde kenar

Kenar, sayısal bir görüntünün bazı bölgelerinde olan anlamlı değişikliklerdir. Bu değişiklikler renk, parlaklık veya görüntünün dokusundan kaynaklı olabilir. Görüntüdeki kenar bilgisi pikselin, komşu pikseller arasındaki ilişkisine bakılarak anlaşılır [33]. Başka bir deyişle, kenar bir pikselden diğerine geçişteki piksellerin genliklerinde meydana gelen ani sıçramalardır. Kenar tespiti ise birinci ve ikinci derece türev işlemleri uygulanarak tespit edilebilir.

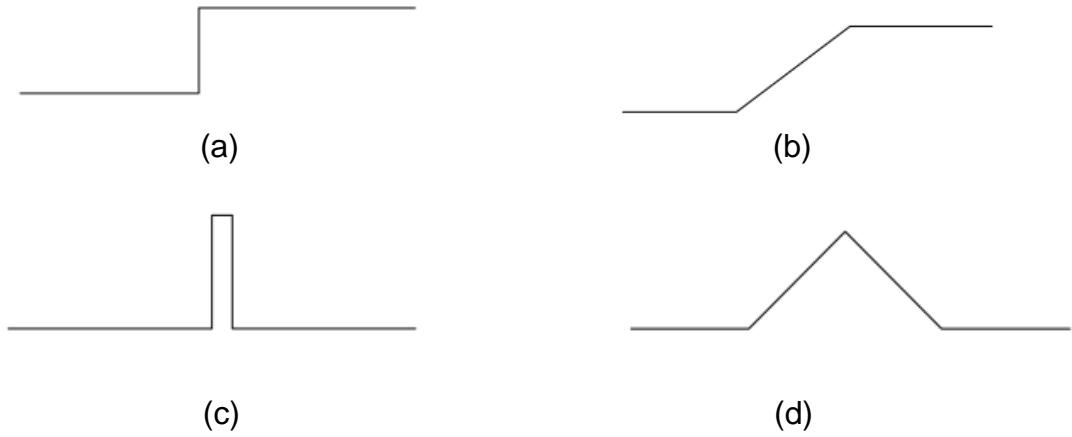
3.5.4.2. Kenar tipleri

Adım Kenar: Görüntü yoğunluğu bir değerden başka bir değere aniden değişir.

Rampa Kenar: Parlaklık değişiminin aniden olmadığı ancak sonlu bir mesafeye kadar olduğu kenar tipidir.

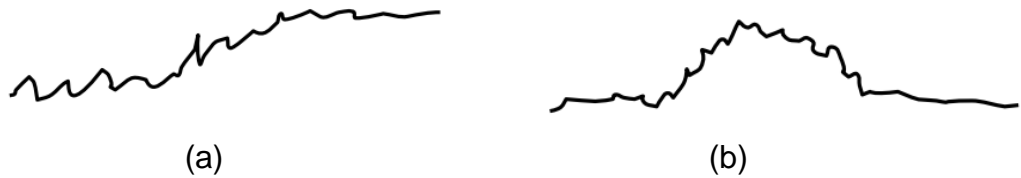
Çizgi Kenar: Görüntü yoğunluğunun aniden değiştığı ancak başlangıç değerine de kısa mesafe içinde döndüğü kenar tipidir.

Çatı Kenar: Parlaklık değişimi aniden olmaz ancak sonlu bir mesafede görünüş yoğunluğu başlangıç değerine geri döner. (Genellikle yüzeylerin kesişimi tarafından üretilir) [33]. Şekil 3.12’de kenar tiplerine ait şekiller verilmiştir.



Şekil 3.12 Kenar tipleri (a) adım (b) rampa (c) çizgi (d) çatı [33]

Görüntülerde ideal olarak meydana gelen kenar tipleri yukarıda belirtildiği gibi olsa da gerçekte görüntü kenarları bu kadar net bir şekilde ortaya çıkmayabilir. Bu durumun sebeplerinden biri görüntülere eklenen gürültü bileşenleridir. Gürültü kaynaklarına elektronik/enstrümantasyon, hareket, yanlış ışık ve lens kaynaklı gürültüler geometrik bozulmalara örnek gösterilebilir. Gürültü binmiş kenar tiplerine Şekil 3.13’te örnekler verilmiştir.



Şekil 3.13 Gürültü binmiş kenar tipleri (a) adım veya rampa (b) çizgi veya çatı

3.5.4.3. Sobel operatörü

Sobel operatörü kenar belirleme işleminde kullanılan fonksiyonlardan biridir. Bunun için birinci dereceden türev işlemi uygulanır. Birinci dereceden türev işleminden sonra piksellerin gradyan büyüklüğü hesaplanır. Birinci dereceden türev işleminin gösterilmesi ve gradyan büyüklüğünün hesaplamasına ait denklemler eşitlik 3.15 ve 3.16'da verilmiştir. Eşitlik 3.17 ve 3.18'de verilen denklemleri, Şekil 3.14'te görülen 3x3 boyutlarında Gx ve Gy matrislerinin katsayılarını kullanarak, x ve y eksenlerinde maske altında kalan görüntü piksel değerlerinin gradyan büyüklüğü hesaplanır. Gx matrisi dikey, Gy matrisi yatay yöndeki maksimum gradienti verir. Gy matrisi Gx matrisinin 90° çevrilmiş halidir [28].

-1	0	1
-2	0	2
-1	0	1

Gx

(a)

1	2	1
0	0	0
-1	-2	-1

Gy

(b)

z1	z2	z3
z4	z5	z6
z7	z8	z9

Görüntü Pikselleri

(c)

Şekil 3.14 (a) (b) Sobel operatörleri ve (c) Maske altında kalan görüntü pikselleri

$$\nabla f \equiv \text{grad}(f) \equiv \begin{bmatrix} g_x \\ g_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\delta f}{\delta x} \\ \frac{\delta f}{\delta y} \end{bmatrix} \quad (3.15)$$

$$M(x, y) = \text{mag}(\nabla f) = \sqrt{g_x^2 + g_y^2} \quad (3.16)$$

$$g_x = \frac{\partial f}{\partial x} = (z_7 + 2z_8 + z_9) - (z_1 + 2z_2 + z_3) \quad (3.17)$$

$$g_y = \frac{\partial f}{\partial y} = (z_3 + 2z_6 + z_9) - (z_1 + 2z_4 + z_7) \quad (3.18)$$

Bu çalışmada, Comet analiz görüntülerinde baş ve kuyruk sınırları uyarlamalı çoklu eşik belirleme işlemi ile belirlendikten sonra Sobel operatörü kullanılarak da baş ve kuyruk sınırları çizdirilmiştir.

3.6. Çapraz İlinti Fonksiyonu ve Eşikleme

Çapraz ilinti ve eşikleme işlemleri, analizi yapılacak görüntünün belirlenmesi ve hatlarının ortaya çıkartılması amacıyla gerçekleştirilen bir yaklaşımdır. Korelasyon görüntüsü, seçilen uygun bir maske görüntüsü ile orijinal görüntünün çapraz ilinti fonksiyonunun bulunması ile elde edilmektedir. İki boyutlu korelasyon işleminde, uygun maske görüntüsü orijinal görüntü üzerinde birer piksel kadar kaydırılarak çarpım işlemi uygulanır. Bu çarpım işlemi eşitlik 3.19'a göre yapılmaktadır. Eşitlik 3.19'da verilen X orijinal görüntüyü, \bar{H} maskeyi ve C korelasyon görüntüsünü göstermektedir.

$$C(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} X(m, n) \bar{H}(m - k, n - l) \quad (3.19)$$

$$-(P - 1) \leq k \leq M - 1$$

$$-(Q - 1) \leq l \leq N - 1$$

Çarpım işleminin sonucunda yeni bir görüntü elde edilir ve bu görüntünün her seferinde en büyük değeri seçilerek yeni bir matrise yerleştirilir. Sonucunda elde edilen görüntü bilgisi ile yeni ve hücreleri daha belirgin bir görüntü oluşturulur. Elde edilen görüntüden sınırların çıkartılması için ikili eşikleme işlemi uygulanmıştır.

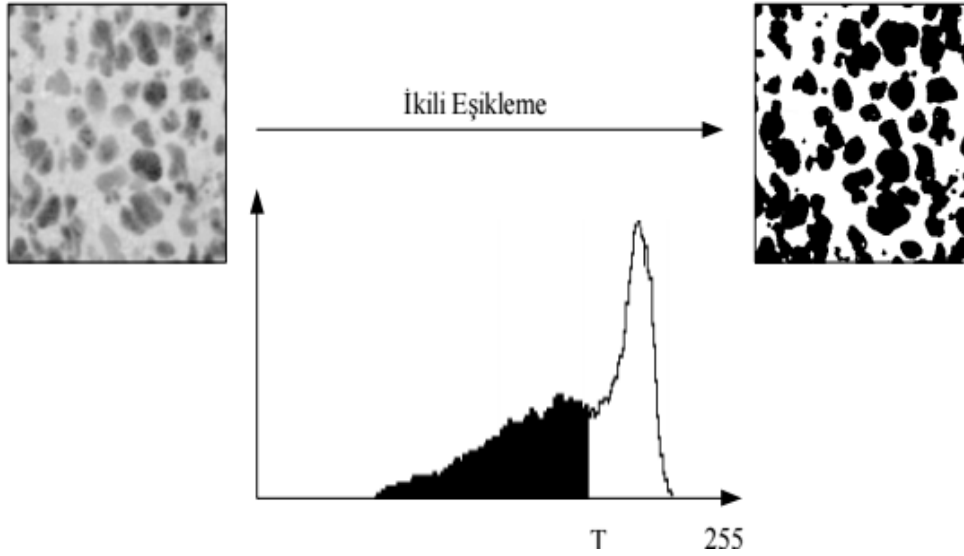
3.7. Görüntü Eşikleme

Basit bölütleme yöntemlerinden bir tanesi görüntünün sadece parlaklık bilgisinin göz önüne alınarak bölütleme işleminin gerçekleştirildiği eşikleme işlemidir. Eşikleme işlemi aracılığıyla görüntünün doğasına bağlı olarak, görüntü iki ya da daha fazla gri seviye grubuna ayrılabilir. Sırasıyla bu işlemler ikili eşikleme ve çoklu eşikleme olarak adlandırılırlar [34].

3.7.1. İkili eşikleme

İkili eşikleme, verilen gri seviyeli bir görüntüyü arka plan ve nesne olarak iki farklı gri seviye grubuna ayırma işlemi olarak tanımlanabilir. Bu işlem neticesinde görüntünün gösterimi çok seviyeli gösterimden iki seviyeli gösterime indirgenmektedir. İki seviyeli gösterime denklemler eşitlik 3.20'de verilmektedir. Şekil 3.15'de de ikili eşikleme işlemine ait bir örnek verilmiştir [34].

$$g(x, y) = \begin{cases} 0, & f(x, y) \leq T \\ 255, & f(x, y) \geq T \end{cases} \quad (3.20)$$



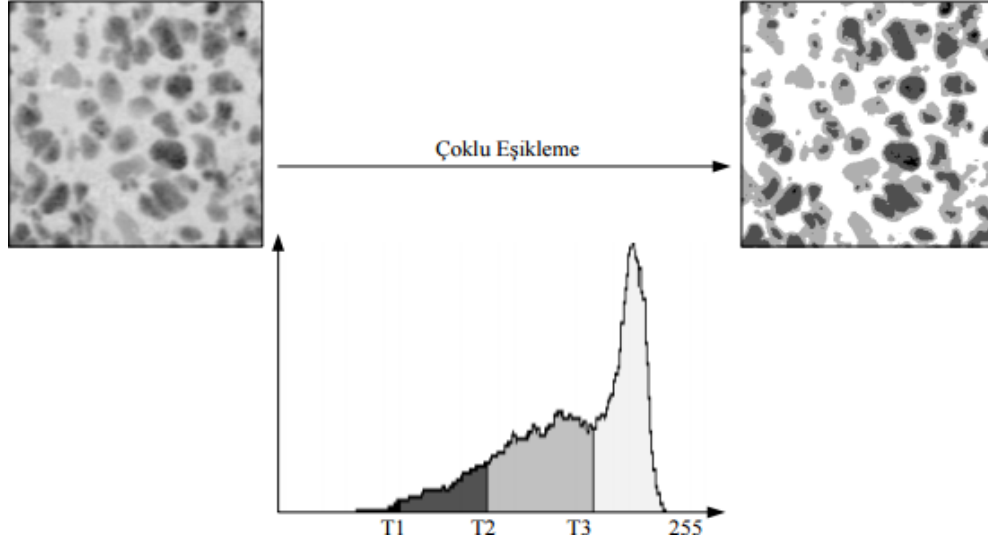
Şekil 3.15 Örnek görüntü histogramı ve ikili eşikleme işlemine ilişkin giriş ve çıkış görüntüsü [34]

3.7.2. Çoklu eşikleme

Çoklu eşikleme, verilen gri seviyeli bir görüntüyü ikiden fazla gri seviye grubuna ayırma işlemi olarak tanımlanabilir. Çoklu eşikleme işlemi yardımıyla görüntü belirli sayıda gri seviye ile gösterilir hale gelmektedir. Şekil 3.16'da çoklu eşikleme işlemine ait bir örnek verilmiştir.

Birçok uygulamada, bütün bir görüntüde tek bir eşik kullanmak uygun bir yaklaşım olsa bile genellikle görüntüler arasında gözlenebilir farklılıklar vardır. Bu nedenle daha iyi sonuçlar elde edebilmek amacıyla her bir görüntü için eşik seviyesini

otomatik olarak kestirebilen bir algoritmaya ihtiyaç duyulmuştur [28]. Bu çalışmada uyarlamalı çoklu eşik belirleme yöntemlerinden olan Otsu eşik belirleme yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.16 Çoklu eşikleme işlevine ilişkin giriş ve çıkış görüntü örnekleri [34]

3.7.3. Otsu eşik belirleme yöntemi

Otsu metodu, gri seviye görüntüler üzerinde uygulanabilen bir eşik tespit yöntemidir. Yöntem, sınıf arası değişintiyi (varyans) maksimum yapma temeline dayanır. Temel fikir, iyi eşiklenmiş sınıfların kendi gruplarına ait piksellerin parlaklık değerlerinin diğerlerinden ayırık olabilecekleridir. Bu mantıkla, sınıflar arasındaki parlaklık değerleri için en iyi ayrımı veren eşik en uygun eşik değeridir [28].

$M \times N$ piksel boyutlu sayısal bir görüntüde L farklı parlaklık seviyesini $\{0, 1, 2, \dots, L-1\}$ n_i de i parlaklık seviyesine sahip piksel sayısını göstermektedir. Görüntüdeki MN toplam piksel sayısı, $MN = n_0 + n_1 + n_2 + \dots + n_{L-1}$ olarak hesaplanır. Eşiklik 3.21'de p_i normalize histogramı göstermektedir. Eşitlik 3.21'den eşitlik 3.22 elde edilir.

$$p_i = \frac{n_i}{MN} \quad (3.21)$$

$$\sum_{i=0}^{L-1} p_i = 1, p_i \geq 0 \quad (3.22)$$

$T(k) = k$, $0 < k < L - 1$ gibi bir eşik seviyesi belirlenir ve giriş görüntüsünü C_1 ve C_2 olarak adlandırılan iki sınıfa eşiklemek için kullanılır. Burada C_1 , görüntüde $[0, k]$ aralığındaki parlaklık değerlerine sahip pikselleri, C_2 de $[k + 1, L - 1]$ arasındaki parlaklık seviyeli piksel değerlerini içerir. Bu eşik seviyesini kullanarak, bir pikselin C_1 sınıfına atanma olasılığı eşitlik 3.23'deki $P_1(k)$ ile ifade edilen kümülatif toplam ile elde edilir.

$$P_1(k) = \sum_{i=0}^k p_i \quad (3.23)$$

Diğer bir deyişle eşitlik 3.23'den elde edilen sonuç C_1 sınıfı için oluşan olasılıktır. Benzer şekilde C_2 sınıfı için oluşan olasılık eşitlik 3.24'te verilmiştir.

$$P_2(k) = \sum_{i=k+1}^{L-1} p_i = 1 - P_1(k) \quad (3.24)$$

C_1 sınıfına atanan piksellerin ortalama parlaklık değerleri eşitlik 3.25'te verilmiştir.

$$m_1(k) = \sum_{i=0}^k iP(i/C_1) = \sum_{i=0}^k iP(C_1/i)P(i)/P(C_1) = \frac{1}{P_1(k)} \sum_{i=0}^k ip_i \quad (3.25)$$

Burada $m_1(k)$ ortalama parlaklık değeri, $P(i/C_1)$ terimi C_1 sınıfından gelen i değerinin olasılığıdır. Eşitlik 3.25'deki ikinci eşitliğin sağ tarafı ise eşitlik 3.26'da verilen Bayes eşitliğinden gelmektedir.

$$P(A/B) = P(B/A)/P(A)/P(B) \quad (3.26)$$

Benzer şekilde C_2 sınıfına atanan piksellerin ortalama parlaklık değeri de eşitlik 3.27 ile bulunur.

$$m_2(k) = \sum_{i=k+1}^{L-1} iP(i/C_2) = \frac{1}{P_2(k)} \sum_{i=k+1}^{L-1} ip_i \quad (3.27)$$

k seviyesine kadar olan kümülatif ortalama, $m(k)$ olarak ifade edilen eşitlik 3.28 ile hesaplanır.

$$m(k) = \sum_{i=0}^k ip_i \quad (3.28)$$

Bütün görüntünün ortalama parlaklık değeri ise eşitlik 3.29'da verilen m_G ifadesidir.

$$m_G = \sum_{i=0}^{L-1} ip_i \quad (3.29)$$

k seviyesindeki eşiğin doğruluğunu değerlendirebilmek amacıyla eşitlik 3.30'da verildiği gibi normalize ve boyutsuz metrik (η) kullanılır. Bu eşitlikte σ_G^2 global varyans, σ_B^2 ise sınıf arası varyansı verir. σ_G^2 ve σ_B^2 değerlerine ait denklemler eşitlik 3.31 ve eşitlik 3.32'de verilmiştir. k yeniden oluşturularak eşitlik 3.33 elde edilir.

$$\eta = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_G^2} \quad (3.30)$$

$$\sigma_G^2 = \sum_{i=0}^{L-1} (i - m_G)^2 p_i \quad (3.31)$$

$$\sigma_B^2 = P_1(m_1 - m_G)^2 + P_2(m_2 - m_G)^2 \quad (3.32)$$

$$\eta(k) = \frac{\sigma_B^2(k)}{\sigma_G^2} \quad (3.33)$$

En uygun eşik, eşitlik 3.34'te verildiği gibi $\sigma_B^2(k)$ 'yı maksimum yapan k^* değeridir. k^* 'yı bulmak için k 'nın tüm tamsayı değerleri için eşitlik 3.34 değerlendirilir.

$$\sigma_B^2(k^*) = \max_{0 \leq k \leq L-1} \sigma_B^2(k) \quad (3.34)$$

k^* elde edildiğinde eşitlik 3.35'e göre eşikleme işlemi gerçekleştirilir.

$$g(x, y) = \begin{cases} 1, & f(x, y) \geq k^* \\ 0, & f(x, y) \leq k^* \end{cases} \quad (3.35)$$

Böylelikle elde edilen bir adet k^* değeri ile uyarlamalı olarak ikili eşiklenmiş görüntü elde edilir.

3.7.3.1. Otsu metodu ile çoklu eşikleme

Otsu metodu ile ikili eşikleme yönteminde elde edilen bir adet k değeri ile L kadar görüntü piksellerinin 8 bit görüntü için 0 ve 255 olarak ikili eşiklenmesi söz konusu iken çoklu eşik belirlemede sınıf arası varyans değerini en büyük yapan n tane k değeri ile görüntü $n+1$ kadar eşiklenmiş olur. Örneğin, $1 \leq k_1 < k_2 < L$ eşik değerleri için, $C_1=[1, \dots, k_1]$, $C_2=[k_1 + 1, \dots, k_2]$, $C_3=[k_2 + 1, \dots, L]$ sınıfları tanımlanır. k_1 ve k_2 değişkenleri olan iki değişkenli σ_B^2 , optimal eşik değerleri olan k_1^* ve k_2^* , σ_B^2 değerini eşitlik 3.36'da gösterildiği gibi maksimum yapan değerler seçilir. Böylelikle çoklu eşikleme işlemi gerçekleştirilmiş olur [35].

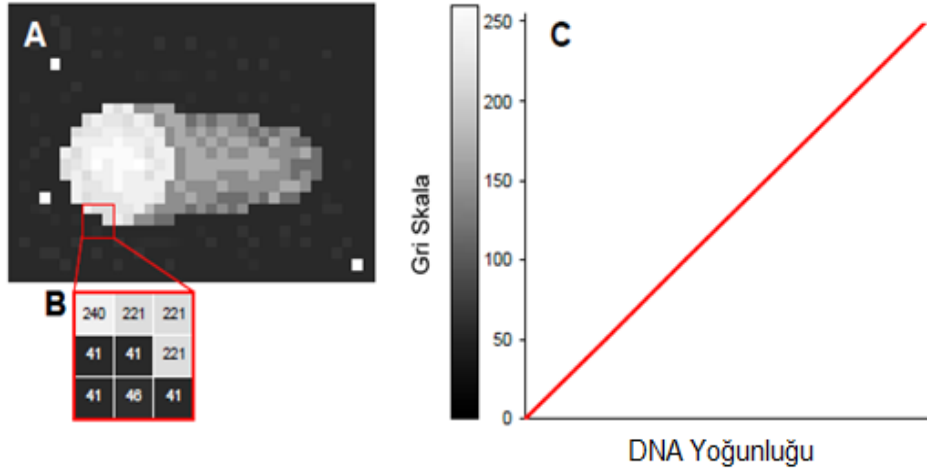
$$\sigma_B^2(k_1^*, k_2^*) = \max_{1 \leq k_1 < k_2 < L} \sigma_B^2(k_1, k_2) \quad (3.36)$$

Bu çalışmada Otsu metodu ile uyarlamalı olarak iki eşik değeri belirlenerek Comet analiz görüntülerine ait baş ve kuyruk kısımları belirlenmiştir. Belirlenen eşik değerlerinden yararlanarak Comet ölçüm parametrelerinin hesaplanması sağlanmıştır.

3.8. Comet Ölçüm Parametreleri

Literatür taraması sonucunda Comet analizi sonucunda DNA hasarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan ölçüm parametrelerinin, Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş uzunluğu, baş kısmındaki DNA yüzdesi, kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi, Tail Moment ve Olive Tail Moment (OTM) olduğu görülmüştür [6;8-10;12;16]. Ancak, bu parametreler dışında; Comet alanı, Comet kısmındaki DNA, Comet'in ortalama yoğunluğu, baş alanı, baş kısmının ortalama yoğunluğu, baş kısmındaki DNA, kuyruk alanı, kuyruk ortalama yoğunluğu ve kuyruk kısmındaki DNA literatürde yer alan ölçüm parametreleridir [10].

Comet ölçüm parametrelerinin hesaplanması için Otsu metodu kullanılarak elde edilen eşik değerleri ve literatürde bulunan görüntü analiz yöntemlerinde belirtildiği gibi görüntünün piksel parlaklık değerleri kullanılmıştır [8; 9; 12; 15; 17; 36]. Comet analizine ait DNA'nın piksellerden oluşan görüntüsü, parlaklık değerleri ve DNA yoğunluğu ile gri skala arasındaki ilişki Şekil 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.17 (A) Comet analizine ait DNA'nın piksellerden oluşan görüntüsü. (B) Her pikselin parlaklık değeri gösterimi. (C) DNA yoğunluğu ile gri skala değerleri arasındaki ilişki [36].

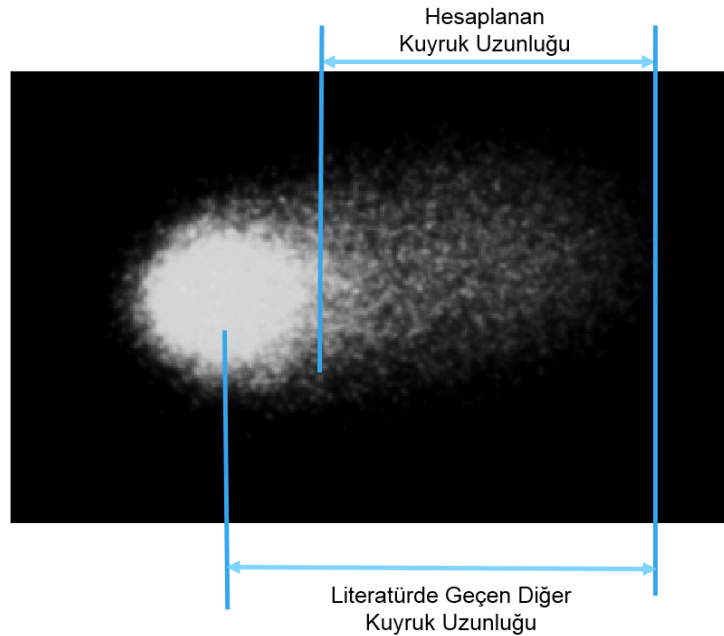
3.8.1. Comet ölçüm parametrelerinin hesaplanması

Bu çalışmada, DNA hasarını belirlemede kullanılan bazı ölçüm parametreleri hesaplanmıştır. Bu parametreler; Comet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, baş uzunluğu, Comet kısmındaki DNA, kuyruk kısmındaki DNA, baş kısmındaki DNA, baş kısmındaki DNA yüzdesi ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesidir. Hesaplanan bu parametreler ile kullanıcıya DNA hasar seviyesini tespit etmek için niceliksel verilerin sunulması hedeflenmiştir. Hesaplanan bu parametrelerin tanımları Çizelge 2.'de verilmiştir.

Comet ölçüm parametrelerinden kuyruk uzunluğu literatürde iki farklı şekilde tanımlanmıştır. Bu tanımlardan birincisi, baş kısmının bittiği noktadan Comet görüntüsünün bittiği noktadır [10; 25]. İkinci tanım ise baş kısmının merkezinden Comet görüntüsünün bittiği noktadır [17]. Bu çalışmada, kuyruk uzunluğu birinci tanım kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 3.18'de yapılan kuyruk uzunluğu tanımlamaları gösterilmektedir.

Çizelge 2. Hesaplanan Comet ölçüm parametreleri ve tanımları

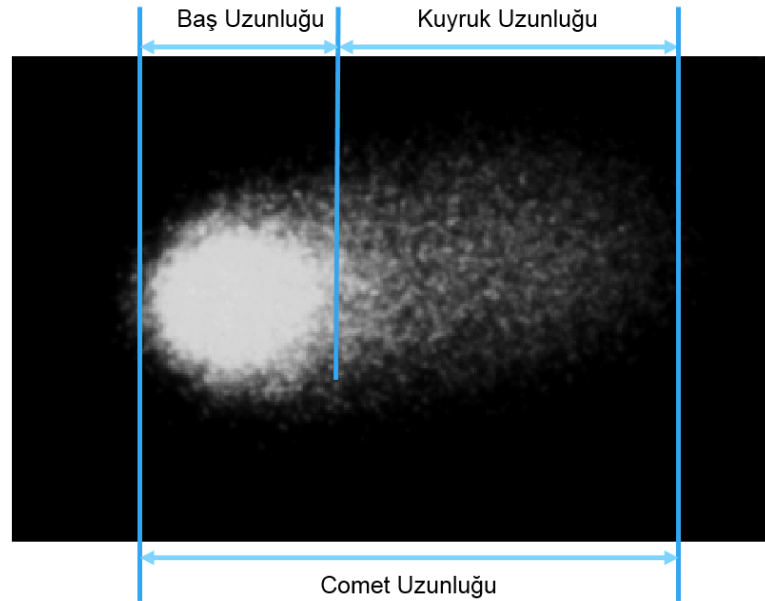
PARAMETRE	TANIM
Comet Uzunluğu	Comet alanının piksel cinsinden uzunluğu
Baş Uzunluğu	Baş kısmının piksel cinsinden uzunluğu
Kuyruk Uzunluğu	Kuyruk kısmının piksel cinsinden uzunluğu
Baş Kısımındaki DNA	Baş kısmındaki piksel parlaklık değerlerinin toplamı
Kuyruk Kısımındaki DNA	Kuyruk kısmındaki piksel parlaklık değerlerinin toplamı
Comet Kısımındaki DNA	Comet alanının piksel parlaklık değerlerinin toplamı
Baş Kısımındaki % DNA	Baş kısmındaki piksel parlaklık değerlerinin Comet kısmındaki DNA değerine oranı
Kuyruk Kısımındaki % DNA	Kuyruk kısmındaki piksel parlaklık değerlerinin Comet kısmındaki DNA değerine oranı



Şekil 3.18 Farklı kuyruk uzunlukları

Comet ölçüm parametrelerinin hesaplanmasında, Otsu metodu ile elde edilen eşik değerlerinden yararlanılmıştır. Elde edilen iki adet eşik değerinden birincisi görüntüye ait kuyruk kısmının sınırlarını, ikincisi ise baş kısmının sınırlarını belirlemektedir. Bu bilgilerden hareketle; baş uzunluğu için, ikinci eşik değeri içerisinde kalan bölgenin x düzlemi boyunca uzunluğu ve kuyruk uzunluğu için baş kısmının x düzleminde bitiş noktası ile birinci eşik değerinin x ekseninde tespit edilen en uzak piksel değeri arasındaki mesafe hesaplanmıştır. Comet uzunluğu baş ve kuyruk uzunluklarının toplanması ile elde edilmiştir.

Çizelge 2’de verilen Comet ölçüm parametrelerinden Comet kısmındaki DNA, baş kısmındaki DNA ve kuyruk kısmındaki DNA parametreleri hesaplanırken de Otsu metodu ile elde edilen eşik değerleri kullanılmıştır. X düzleminde hesaplanan uzunluk parametrelerinin hesaplanmasına benzer olarak, Comet kısmındaki DNA hesaplaması için birinci eşik değeri üzerinde kalan piksel parlaklık değerlerinin toplamı, baş kısmındaki DNA hesaplaması için ikinci eşik değeri üzerinde kalan piksel parlaklık değerlerinin toplamı hesaplanmıştır. Kuyruk kısmındaki DNA ise Comet kısmındaki DNA değerinden, baş kısmındaki DNA değeri çıkarılarak bulunmuştur. Hesaplanan bazı Comet ölçüm parametrelerinin görüntüdeki karşılıkları Şekil 3.19’da görülmektedir.



Şekil 3.19 Hesaplanan bazı Comet ölçüm parametrelerinin gösterimi

Diğer Comet ölçüm parametrelerinden olan baş kısımdaki % DNA ve kuyruk kısmındaki % DNA parametreleri sırasıyla eşitlik 3.37 ve 3.38 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Baş Kısımdaki \% DNA} = \frac{\text{Baş Kısımdaki DNAX100}}{\text{Comet Kısımındaki DNA}} \quad (3.37)$$

$$\text{Kuyruk Kısımındaki \% DNA} = \frac{\text{Kuyruk Kısımındaki DNAX100}}{\text{Comet Kısımındaki DNA}} \quad (3.38)$$

Comet uzunluğu, baş uzunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri piksel cinsinden hesaplanırken Tail Moment ve OTM değerleri μm cinsinden hesaplanır. Bu nedenle μm cinsinden hesaplama için 1 piksel değerinin kaç μm 'ye karşılık geldiği hesaplanmalıdır [36]. Ancak tez çalışmasında kullanılan Comet analizi görüntülerinin elde edildiği lamaların gerçek ölçüleri bilinmediği için 1 piksel değerinin kaç μm 'ye karşılık geldiği hesaplanamamıştır. Bu nedenle Tail Moment ve OTM değerleri verilememiştir.

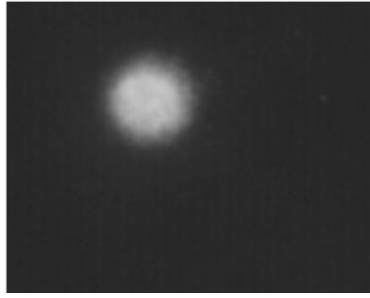
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada elde edilen araştırma bulguları, THJE ile elde edilen farklı hasar derecelerinde DNA görüntülerinin her biri için sunulmuştur.

4.1. İkili Eşik Belirleme Yönteminin Uygulanması

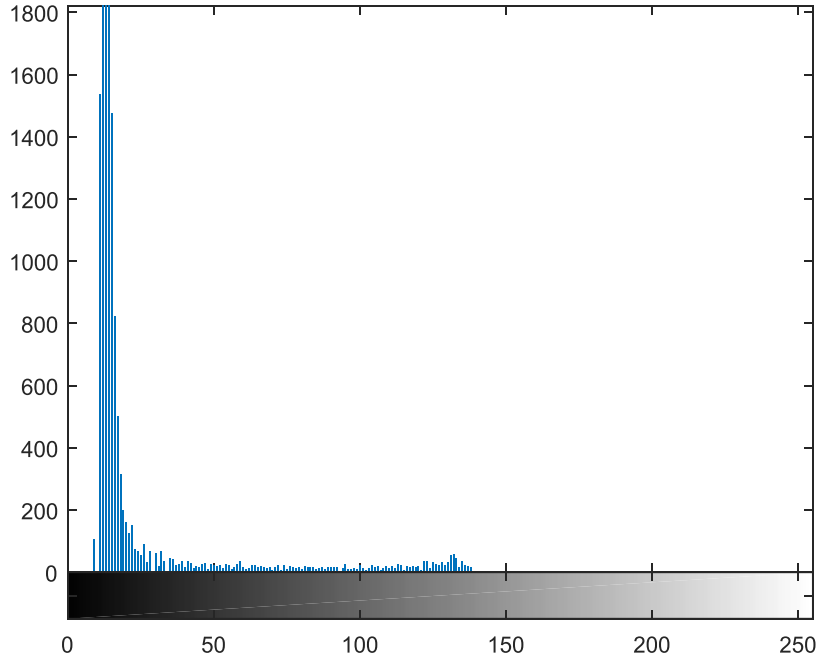
İkili eşik belirleme yönteminde, baş ve kuyruk kısımları için eşik değerlerini belirleyebilmek için öncelikle, görüntünün piksel parlaklık değerlerine karşı, bu değerlerin görüntü içerisindeki dağılımını ifade eden histogram grafikleri incelenmiştir. Şekil 4.1 ve 4.3'te bulunan görüntülerin Şekil 4.2 ve 4.4'te verilen histogram grafikleri incelendiğinde farklı seviyelerdeki Comet analiz görüntülerine ait histogram grafiklerinde piksel parlaklık dağılımının da farklı olduğu görülmüştür.

Orijinal Görüntü



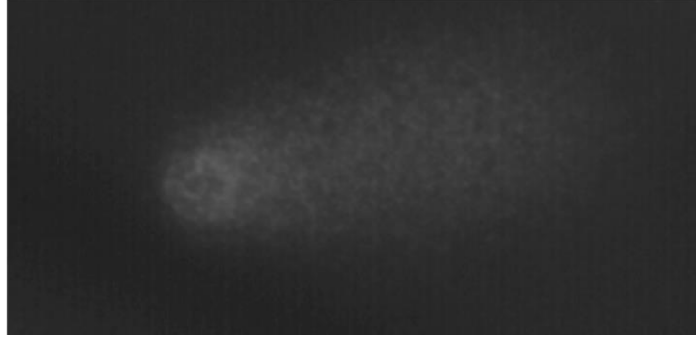
Şekil 4.1 '0' Derece görüntü

Görüntünün histogramı



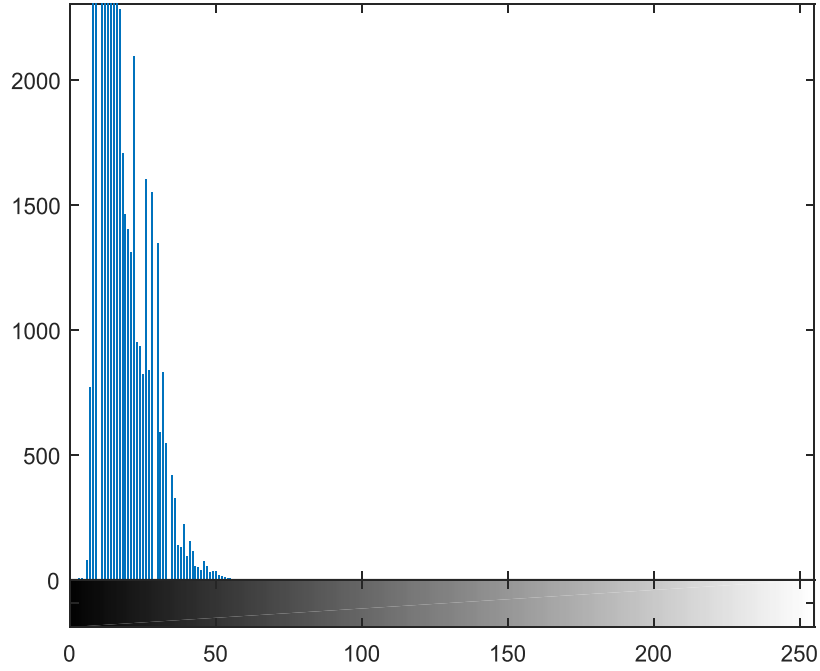
Şekil 4.2 '0' Derece görüntüye ait histogram grafiği

Orijinal Görüntü



Şekil 4.3 '4' Derece görüntü

Görüntünün histogramı

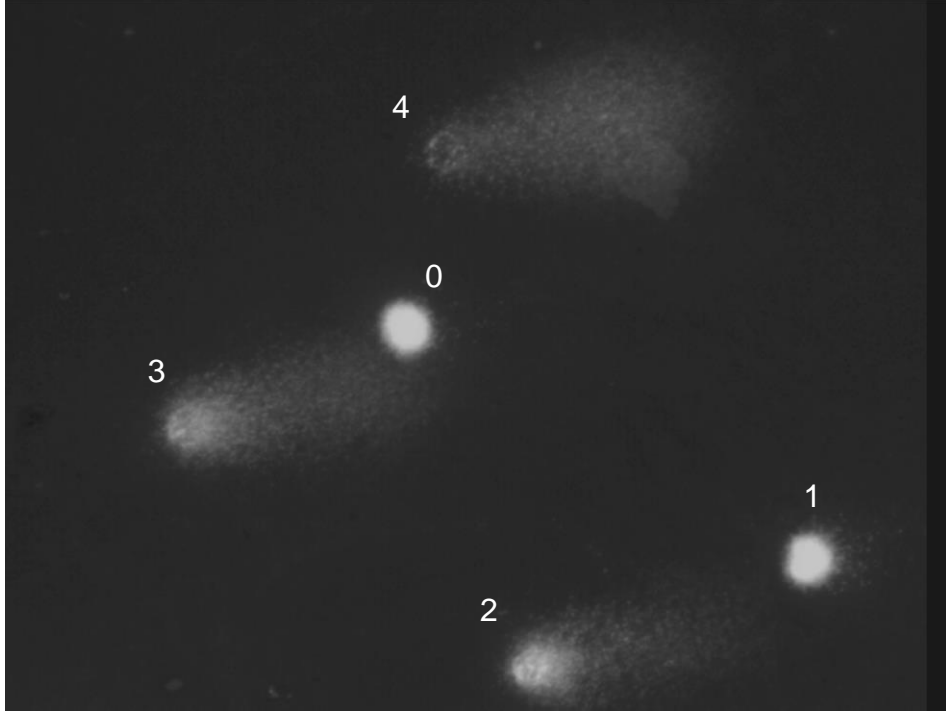


Şekil 4.4 '4' Derece görüntüye ait histogram grafiği

4.1.1. 'Baş' kısmı için ikili eşik belirleme yöntemi

Baş kısmını belirlemek için THJE yöntemi ile elde edilen ve 0'dan 4'e kadar skorlanan DNA görüntülerinin lokal histogramlarına bakılmış ve 8 bit çözünürlükte eşik değeri 55 olarak seçilmiştir. Şekil 4.5'de verilen görüntü üzerinde baş için ikili eşikleme yapılarak sonuçlar 0'dan 4'e kadar skorlanan görüntüler için karşılaştırılmıştır. İkili eşik belirleme yöntemi uygulamasının sonucunda ise Şekil 4.6 görüntüsü elde edilmiştir.

Gri Skala Görüntü



Şekil 4.5 Farklı hasar derecelerinde DNA görüntüleri

Baş İçin İkili Eşikleme



Şekil 4.6 55 Eşik değeri ile eşiklenmiş görüntü

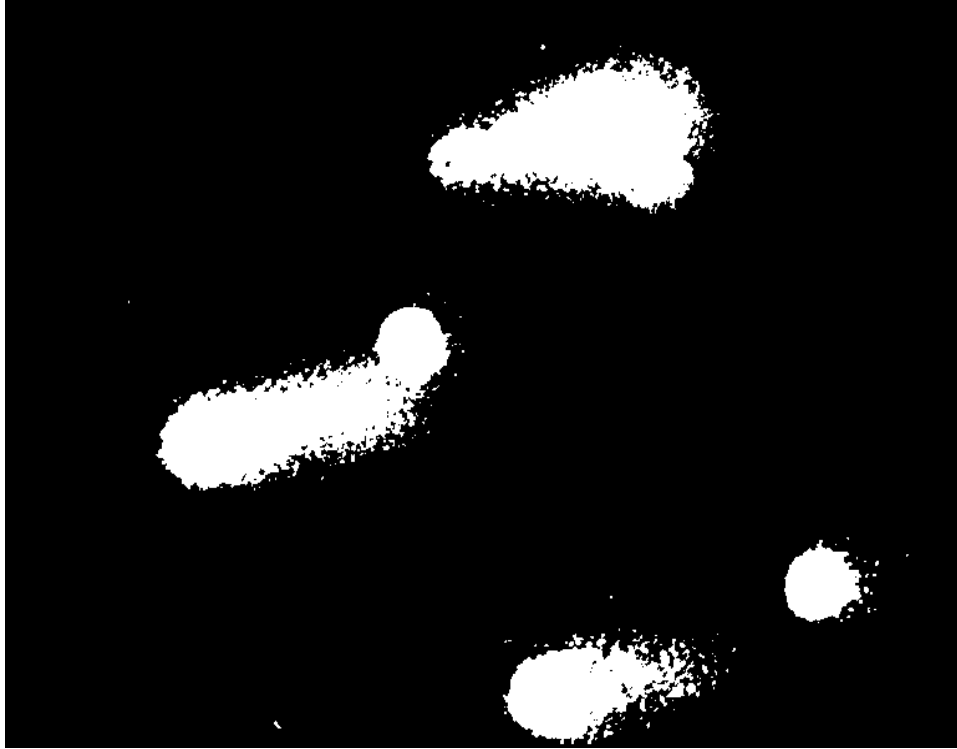
Baş kısmı için yapılan ikili eşikleme işlemi sonrasında farklı hasar seviyelerinde olan DNA görüntülerinin her birinde baş kısımlarının piksel parlaklık değerleri farklı

olduğundan 0, 1, 2 ve 3 derece DNA'larda iyi bir eşikleme yapıldığı görülürken 4 derece Comet DNA'da insan gözünün algılayabildiği baş kısmının tespit edilemediği sonucuna varılmıştır.

4.1.2. 'Kuyruk' kısmı için ikili eşik belirleme yöntemi

Kuyruk kısmını belirlemek için THJE yöntemi ile elde edilen ve 0'dan 4'e kadar skorlanan DNA görüntülerinin lokal histogramlarına bakılmış ve 55 eşik değeri seçilmiştir. Şekil 4.5'de verilen görüntüde kuyruk için ikili eşikleme işlemi yapılarak Şekil 4.7'de verilen görüntü elde edilmiştir. Sonuçlar 0'dan 4'e kadar skorlanan görüntüler için karşılaştırılmıştır.

Kuyruk için Eşik Belirleme



Şekil 4.7 25 Eşik değeri ile eşiklenmiş görüntü

Kuyruk kısmı için yapılan ikili eşikleme işlemi sonrasında farklı hasar seviyelerindeki DNA görüntülerinde, seçilen eşik seviyesinden dolayı gürültü piksellerinin ortaya çıktığı, görüntü sınırlarının birbiri içerisine geçmeye başladığı ve 0, 1, 2 ve 3 hasar seviyesindeki DNA görüntülerinin, insan gözünün algılayabildiğinden daha fazla alanda tespit edildiği gözlemlenmiştir.

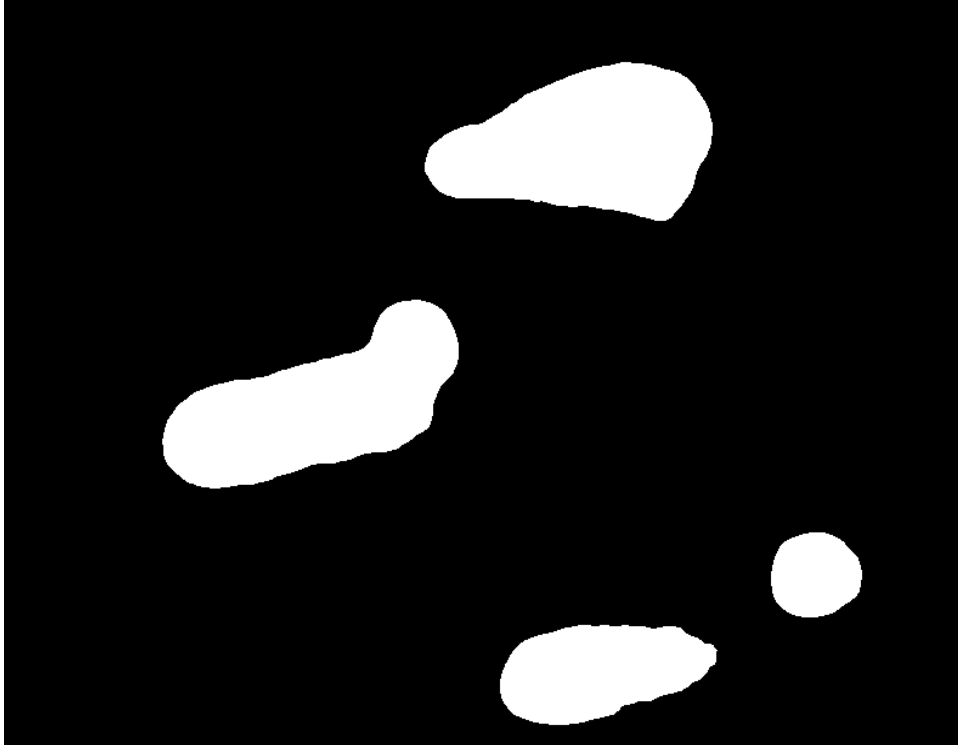
4.2. Çapraz İlinti Fonksiyonu

Çapraz ilinti fonksiyonu işleminin gerçekleştirilmesi için görüntü ile işleme sokulacak 23x23 boyutlarında maske oluşturulmuştur.

4.2.1. 'Kuyruk' kısmı için çapraz ilinti fonksiyonu

Kuyruk kısmını belirlemek için çapraz ilinti fonksiyonundan sonra ikili eşik belirleme yönteminde kuyruk için belirlenmiş olan 25 eşik değeri seçilmiştir. Şekil 4.5'de verilen görüntüde kuyruk çapraz ilinti fonksiyonu uygulanarak, Şekil 4.8'deki görüntü elde edilmiş ve sonuçlar 0'dan 4'e kadar skorlanan görüntüler için karşılaştırılmıştır.

Kuyruk için Çapraz İlinti



Şekil 4.8 Kuyruk için çapraz ilinti uygulaması sonuçları

Kuyruk kısmı için uygulanan çapraz ilinti fonksiyonu sonuçlarına göre, ikili eşikleme ile ortaya çıkan gürültü sorununa çözüm bulunabilmiştir. Ancak 3 ve 4 derece Comet DNA görüntülerinde kuyruk sınırlarının belirlenirken, 0,1 ve 2 derece görüntülerin insan gözünün tespit edebildiği alandan daha fazla bir alanda yer aldığı ve birbirine yakın olan görüntülerin sınırlarının birbiri içerisine geçtiği görülmüştür.

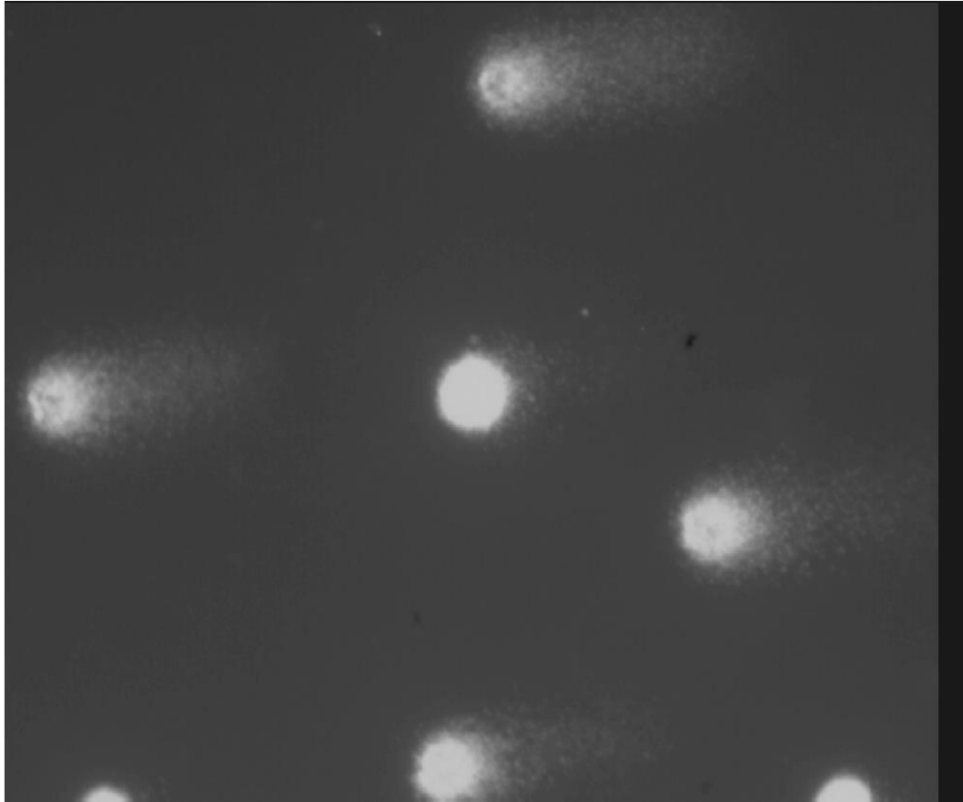
Çalışmada, bölüm 4.1. ve 4.2. de uygulanan yöntemlerle 5 farklı derecede skorlanan görüntülerin, baş ve kuyruk kısımlarının eşik değerlerinin değişiklik gösterdiği görsel

olarak da görülmüştür. Uygulanan yöntemlerin THJE yöntemi ile elde edilen farklı hasar seviyelerindeki görüntülerin analizi için uygun olmadığı tespit edildiğinden ve ölçüm parametrelerini hesaplarken de zorluklarla karşılaşılacağı için Şekil 3.3'te akış diyagramı verilen görüntü analiz algoritması tasarlanmıştır.

4.3. Sınır Yapılarının Temizlenmesi

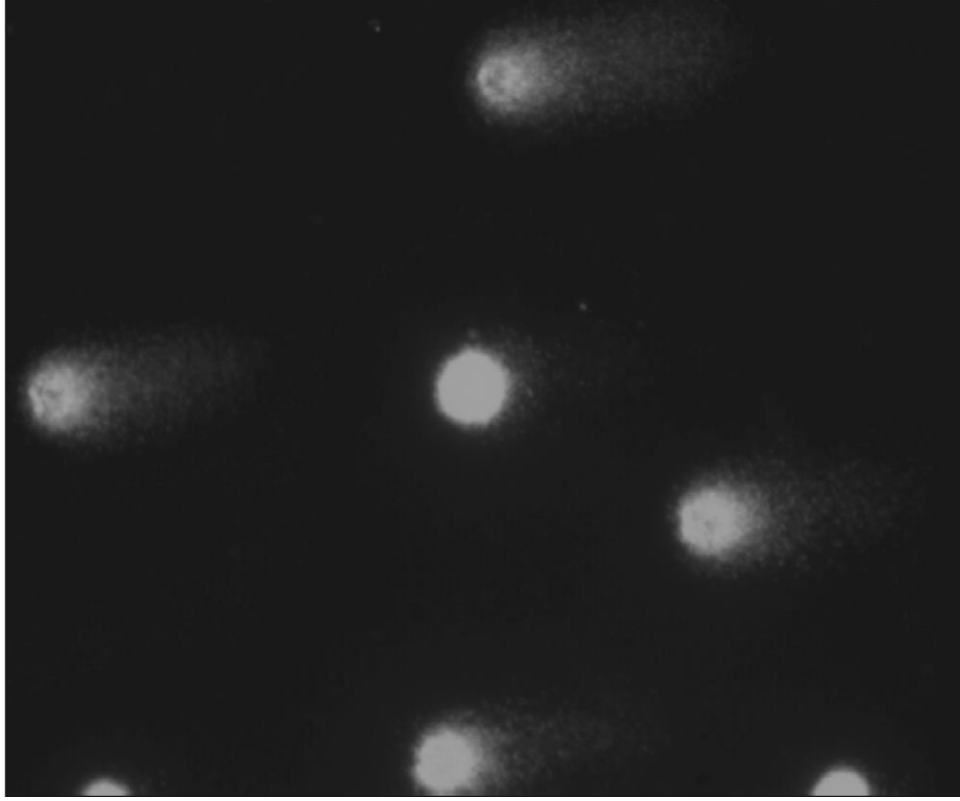
Sınır yapılarının temizlenmesi işlemi Şekil 3.2'de verilen algoritmanın blok diyagramına göre uygulanan ön işlemlerden biridir. Şekil 4.9'da verilen gri skalaya çevrilmiş görüntünün sınır yapılarının temizlenmesi işlemi ile görüntüde bulunan gürültü probleminin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Uygulamaya ait görüntü Şekil 4.10'da verilmiştir.

Gri Skala Görüntü



Şekil 4.9 Gri skala görüntü

Sınır Yapılarının Temizlenmesi

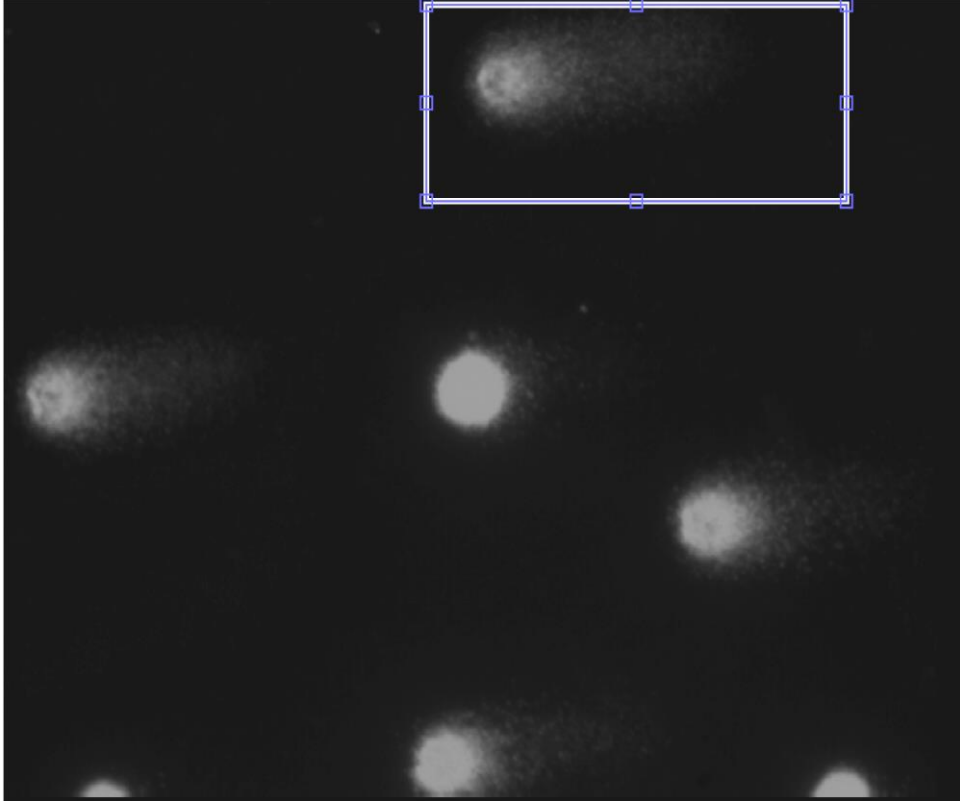


Şekil 4.10 Sınır yapılarının temizlenmesi işlemi

4.4. Comet Analiz Görüntülerinde Seçim

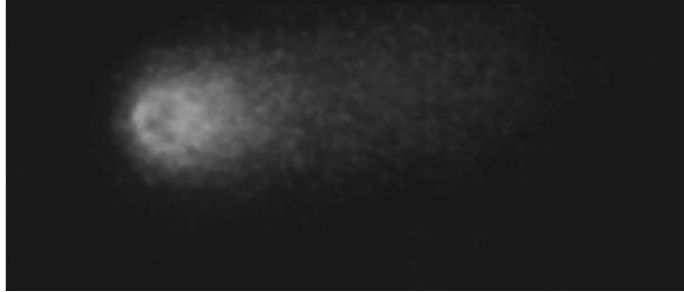
Comet analiz görüntülerinde, öncelikle araştırmacının analiz etmek istediği DNA görüntüsünün seçilmesi sağlanmaktadır. Bunun için sınır yapılarının temizlenmesi işleminden sonra görüntü üzerindeki mouse'un + işaretine döndüğü görülür. Mouse ile istenen görüntü seçilir. Seçilen görüntü bölgesinin büyüklüğü ve yeri ayarlanabilir. Ardından çift tıklanır ve seçim işlemi tamamlanır.

Farklı derecelere sahip her bir görüntüde hesaplanan ölçüm parametrelerinin sonuçları farklılık gösterecektir. Bu sebeple araştırmacıya analiz etmek istediği DNA görüntüsünün seçimi yaptırılarak, ilgilenilen görüntünün ölçüm sonuçlarının seçilen görüntü üzerinde yapılan işlemler ile hesaplanması sağlanmıştır. Bu işleme ait görüntü Şekil 4.11'de verilmiş olup, Şekil 4.12'de de seçilen DNA görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 4.11 DNA seçme görüntüsü

Seçilen Görüntü

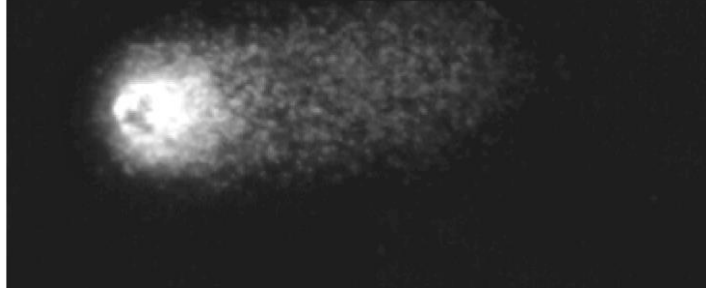


Şekil 4.12 Seçilen görüntü

4.5. Kontrast Sınırlı Uyarlamalı Histogram Eşitleme

Comet analiz görüntülerinde seçim işleminden sonra Şekil 3.2'de verilen algoritmanın blok diyagramında ara işlemler basamağından olan KSUHE uygulanmıştır. Bu işlem ile farklı skorlarda bulunan hasarlı DNA görüntülerindeki baş ve kuyruk kısımlarının kontrastının artırılması, özellikle kuyruk kısmının tespitinin yapılabilmesi amaçlanmıştır. Şekil 4.12'de verilen, seçilen DNA görüntüsüne KSUHE uygulanarak Şekil 4.13'de verilen görüntü elde edilmiştir.

KSUHE Uygulaması

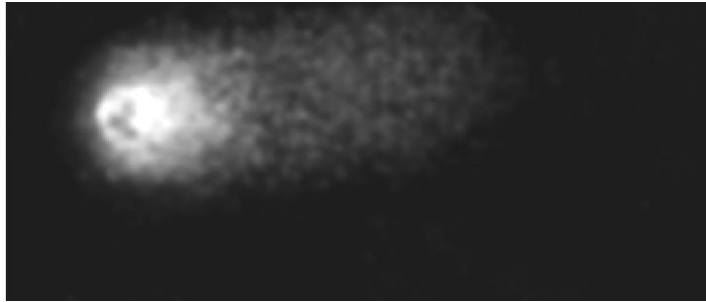


Şekil 4.13 KSUHE uygulanmış görüntü

4.6. Gauss Filtreleme

KSUHE uygulamasından sonra, Şekil 3.2'de verilen algoritmanın blok diyagramında ara işlemlerden olan gaussian filtre uygulanmıştır. Elde edilen görüntünün sınırlarını yumuşatmak amacıyla bu işlem gerçekleştirilmiştir. KSUHE işleminden sonra uygulanan Otsu metodu ile uyarlamalı çoklu eşikleme sonrasında, görüntü kenarlarında çok fazla girinti-çıkıntı olmasından kaynaklı olarak çoklu eşikleme işlemi öncesinde Gauss filtre uygulamasına ihtiyaç duyulmuştur.

Gauss Filtre Uygulaması

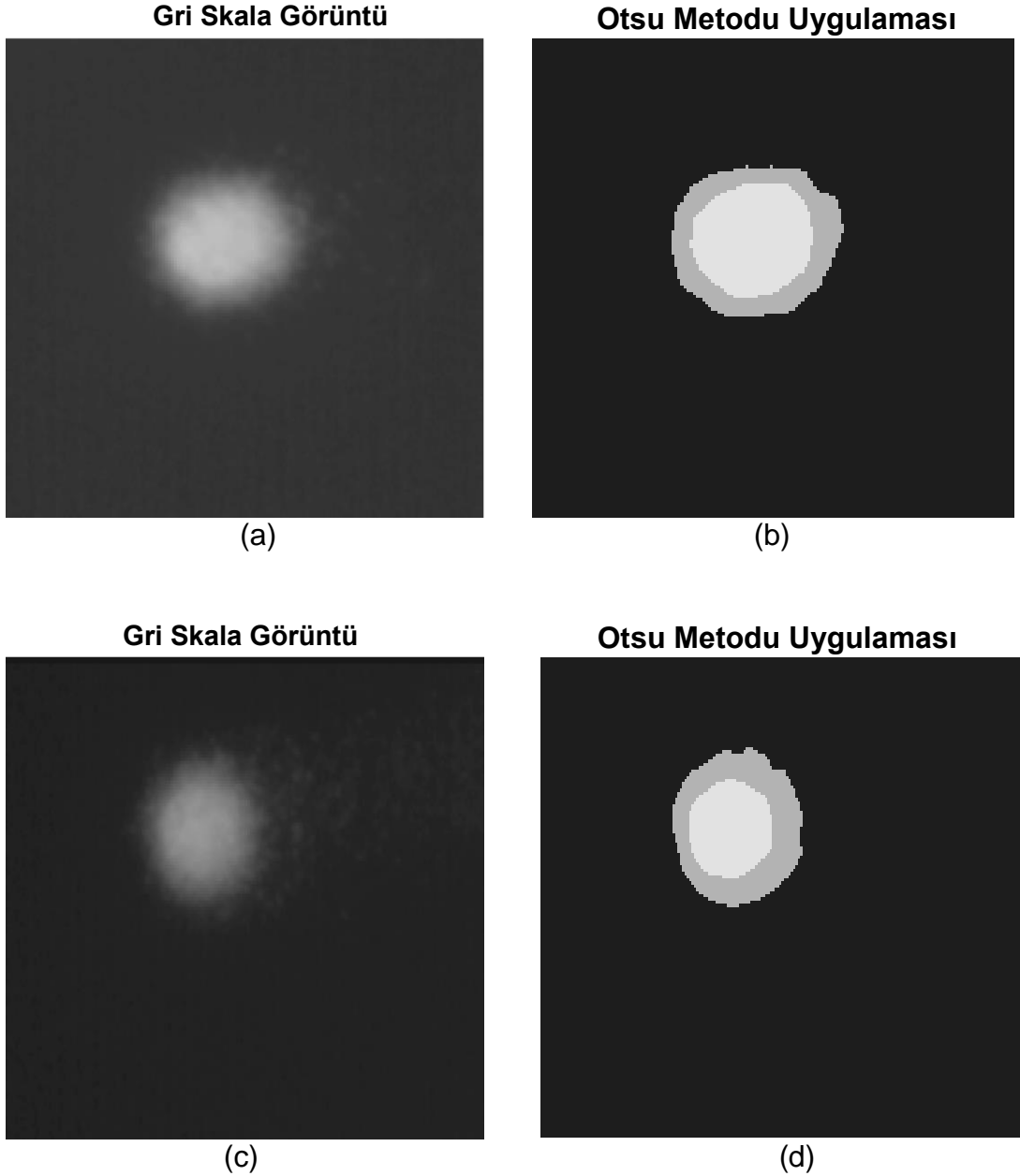


Şekil 4.14 Gauss filtre uygulanmış görüntü

4.7. Otsu Metodu ile Uyarlamalı Çoklu Eşikleme

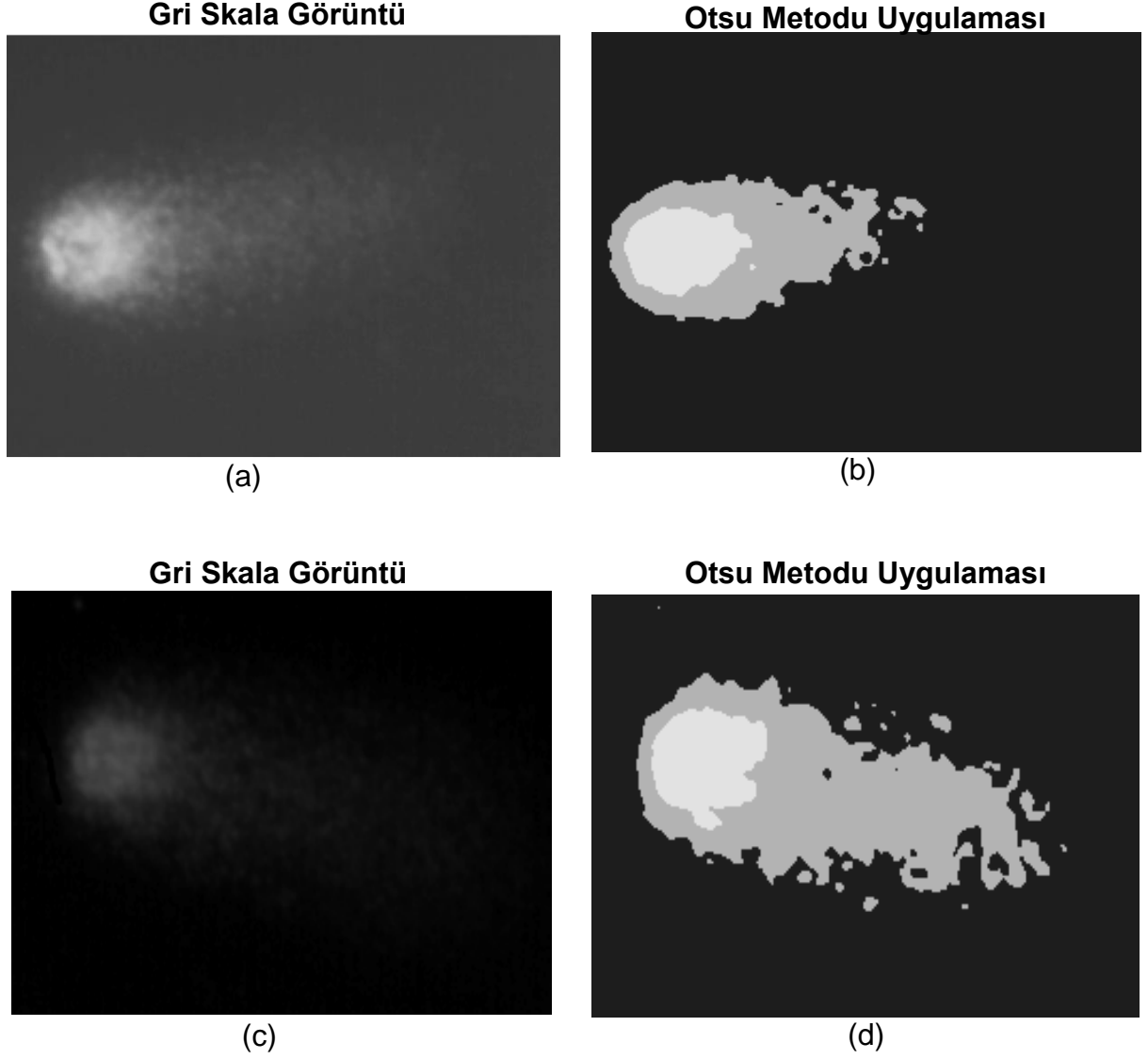
Bölüm 3.7.2.'de belirtildiği gibi, Comet analiz görüntülerinde sabit bir eşik değerinin kullanılmasının yetersizliği ve ortaya çıkardığı sorunlar nedeniyle yapılan ön işlemlerden sonra uyarlamalı olarak çoklu eşik değerinin tespit edildiği Otsu metodu kullanılmıştır.

Bu bölümde Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17’de 0’dan 4’e kadar skorlanan her gri skala Comet analiz görüntüsü için ayrı ayrı Otsu metodu ile uyarlamalı çoklu eşikleme uygulamasının sonuçları verilmiştir. Şekil 4.15’de verilen ‘0’ ve ‘1’ derece Comet analiz görüntüleri incelendiğinde, ‘1’ derece görüntüde kuyruk kısmı için DNA’dan bir miktar kopmaların başladığı ve Otsu metodu uygulaması görüntülerinin de buna paralel olarak çıktığı görülmektedir.



Şekil 4.15 (a) ve (b) ‘0’ Derece Analiz Görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve Otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü (c) ve (d) ‘1’ Derece Analiz Görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve Otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü

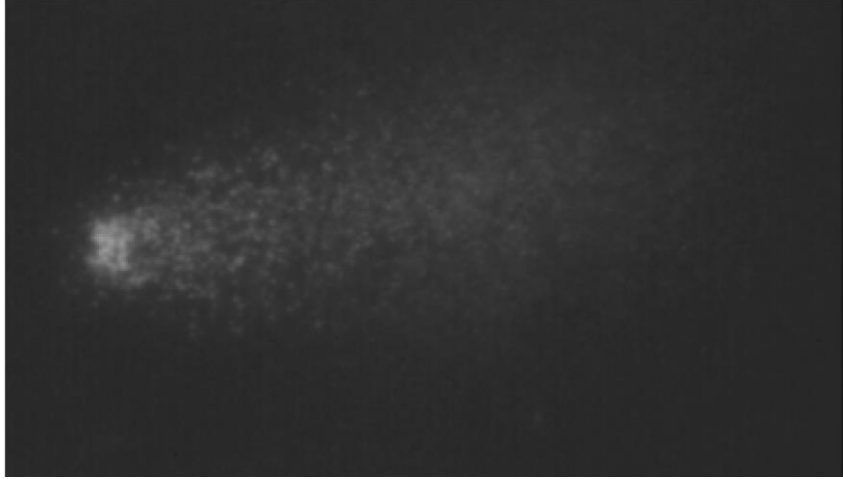
Şekil 4.16'da verilen '2' ve '3' derece Comet analiz görüntüleri incelendiğinde, kuyruk kısımları arasında anlamlı farklılıklar olduğu ve Otsu metodu uygulamasında da baş ve kuyruk kısımlarının tespitinde skorlamaya uygun şekilde görüntülerinin ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil 4.16 (a) ve (b) '2' Derece analiz görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü (c) ve (d) '3' Derece analiz görüntüsüne ait sırasıyla gri skala görüntü ve otsu metodu ile eşiklenmiş görüntü

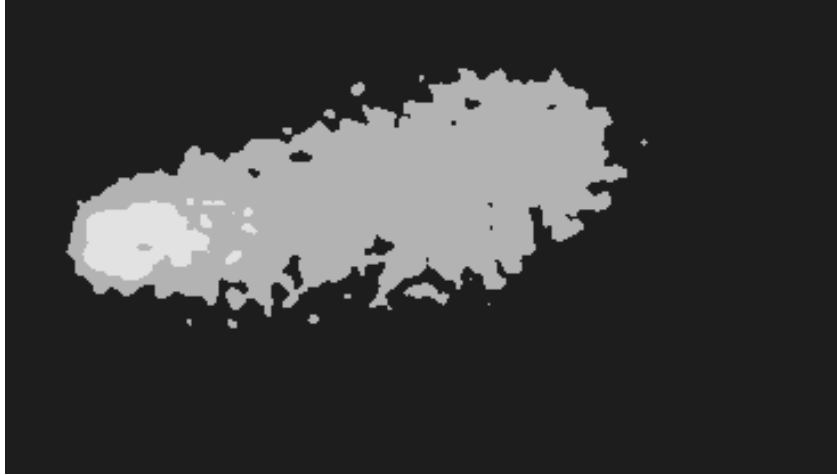
Şekil 4.17’de verilen ‘4’ derece Comet analiz görüntüleri incelendiğinde, baş kısmının görünürlüğünün azalarak kuyruk kısmının uzadığı görülmektedir. Otsu metodu uygulamasında da baş ve kuyruk kısımlarının tespitinde skorlamaya uygun şekilde görüntünün ortaya çıktığı görülmektedir.

Gri Skala Görüntü



(a)

Otsu Metodu Uygulaması



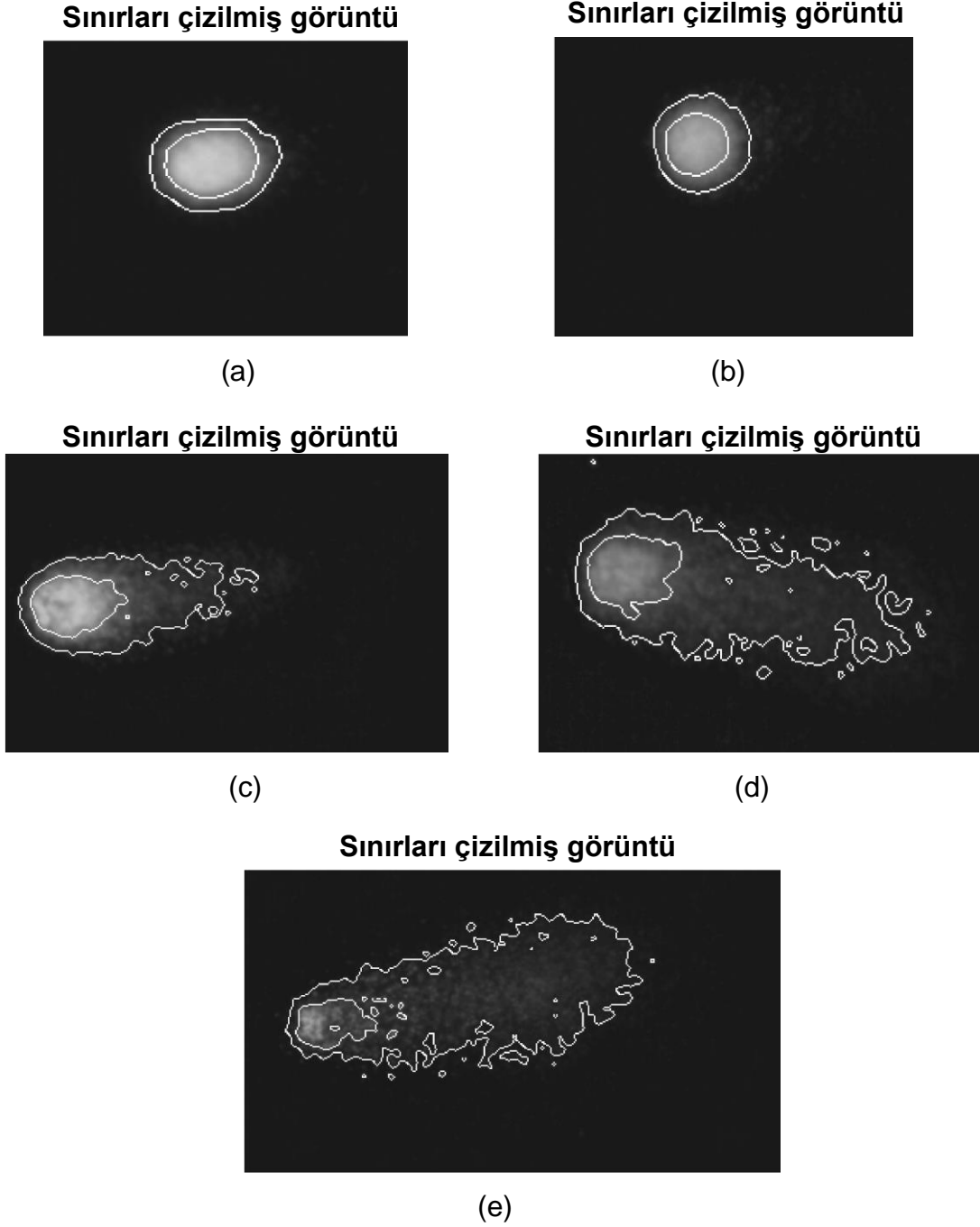
(b)

Şekil 4.17 “4” Derece analiz görüntüleri (a) gri skala görüntüsü (b)otsu metodu uygulanmış görüntü

4.8. Kenar Belirleme

Bu tez çalışmasında, Otsu Metodu ile elde edilen sınırlar üzerinde Sobel operatörü kullanılarak baş ve kuyruk kısımlarının sınırları çizdirilmiştir. Böylelikle gri skala

görüntü üzerinde kullanıcının analiz görüntülerine ait baş ve kuyruk sınırlarının ortaya çıkartılması sağlanmıştır. Sobel operatörü uygulamasına ait görüntüler Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18 Sobel operatörü uygulanmış görüntüler (a) '0' derece (b) '1' derece (c) '2' derece (d) '3' derece (e) '4' derece

4.9. Hesaplanan Comet Ölçüm Parametreleri Sonuçları

Çizelge 3’de verilmiş olan, hesaplanan comet ölçüm parametreleri sonuçları bölüm 4.7’de verilen Comet analiz görüntülerine aittir. Hesaplanan Comet uzunluğu, baş uzunluğu ve kuyruk uzunluğu parametreleri piksel cinsindedir. “0” derece görüntüye ait ölçüm sonuçları Şekil 4.15 (a)’dan , “1” derece görüntüye ait ölçüm sonuçları Şekil 4.15 (c)’den, “2” derece görüntüye ait ölçüm sonuçları Şekil 4.16 (a)’dan, “3” derece görüntüye ait ölçüm sonuçları Şekil 4.16 (c)’den ve “4” derece görüntüye ait ölçüm sonuçları Şekil 4.17 (a)’dan elde edilmiş sonuçlardır.

Çizelge 3. Hesaplanan Comet ölçüm parametreleri sonuçları

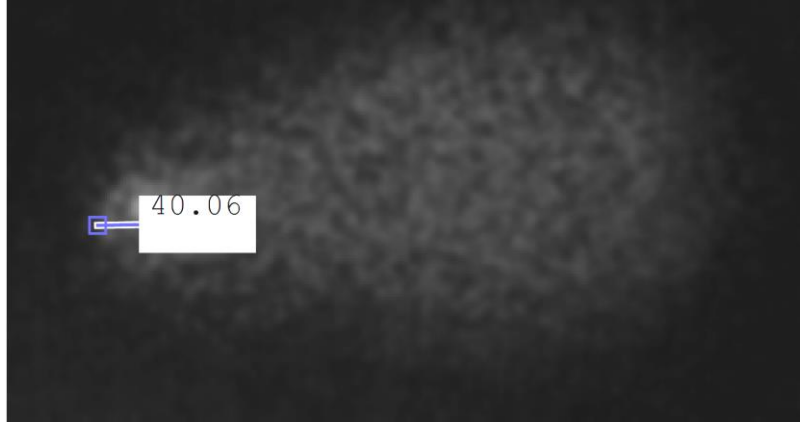
PARAMETRE	‘0’	‘1’	‘2’	‘3’	‘4’
Comet Uzunluğu	49	58	147	198	246
Baş Uzunluğu	39	34	63	53	82
Kuyruk Uzunluğu	10	24	84	145	164
Baş Kısımındaki DNA	179744	151871	313925	217761	138445
Kuyruk Kısımındaki DNA	75980	95956	301131	350485	444626
Comet Kısımındaki DNA	255724	247827	615056	568246	583071
Baş Kısımındaki % DNA	70,2882	61,2810	51,0400	38,3216	23,7441
Kuyruk Kısımındaki %DNA	29,7118	38,7189	48,9599	61,6784	76,2558

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

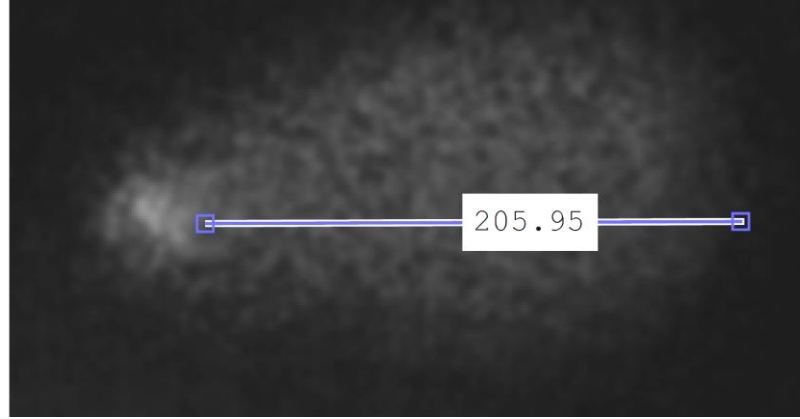
Bu çalışma kapsamında, THJE yöntem ile elde edilen çeşitli derecelerde hasar seviyesine sahip DNA görüntülerinin analizi için görüntü analiz algoritması tasarlanmıştır. Öncelikle uygulanan yöntemlerden olan ikili eşik belirleme ve çapraz ilinti fonksiyonunun 0'dan 4'e kadar skorlanan Comet analiz görüntülerinin her derecesinde aynı sonuçları vermediği görülmüştür. Bu fikirden hareketle, farklı piksel parlaklık derecelerine sahip görüntülerde ikili eşik belirleme ve çapraz ilinti fonksiyonu uygulamalarının istenen sonuçları vermeyebileceği anlaşılmıştır. Bu sebeple, Comet analiz görüntüleri için Şekil 3.3'te verilen sınır yapıların temizlenmesi, kontrast sınırlı uyarlamalı histogram eşikleme ve Gauss filtre ön ve ara işlemleri uygulanmıştır. Ayrıca her görüntüyü ayrı analiz edebilmek ve Comet ölçüm parametrelerini ayrı hesaplayabilmek için kullanıcı tarafından bir görüntü seçim işlemi gerçekleştirilmektedir. Gauss filtre uygulamasından sonra baş ve kuyruk belirleme işlemleri, uyarlamalı çoklu eşik belirleme algoritmalarından Otsu Metodu kullanılarak yapılmaktadır. Otsu metodu ile elde edilen eşik değerlerine göre Bölüm 3.8.1.'de belirtilen Comet ölçüm parametreleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, literatürde verilen ölçüm parametreleri değerleri ile karşılaştırılmıştır. Hesaplanan parametre sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Comet analizi sırasında görüntü üzerinde kalan agaroz jel kaynaklı kalıntılar ve katlanmalar, geliştirilen algoritma ile ortadan kaldırılamayan bazı artefaktlar veya görüntü parlaklığının homojen dağılması gibi sebeplerden dolayı analiz edilmek istenen bazı '4' dereceye sahip görüntülerde doğru olmayan sonuçlar ortaya çıkabildiği görülmüştür. Bu sebeple uyarlamalı çoklu eşikleme uygulamasından sonra kullanıcının manuel olarak baş ve kuyruk uzunluklarını ölçmesi sağlanmıştır. Şekil 5.1'de bu uygulamaya ait görüntü parlaklığının homojen dağıldığı bir '4' derece görüntünün üzerinde yapılan manuel ölçümler, Şekil 5.2'de de aynı görüntüye ait eşikleme görüntüsü bulunmaktadır. Ayrıca, üzerinde agaroz jel kalıntısının olduğu bir görüntünün üzerinde yapılan manuel ölçümler Şekil 5.3'te ve bu görüntüye ait eşikleme görüntüsü Şekil 5.4'te verilmiştir. Manuel ölçümlerin bulunduğu şekillerde piksel değerlerinin tamsayı olarak görünmemesinin nedeni, MATLAB programında yapılan hesaplama ile ilgilidir. Kullanıcının başlangıç ve bitiş noktalarını aynı satırda

seçmemesi durumunda mesafe tamsayı olarak hesaplanamamaktadır. Bu duruma manuel ölçüm yapacak kullanıcının dikkat etmesi gerekmektedir.



(a)

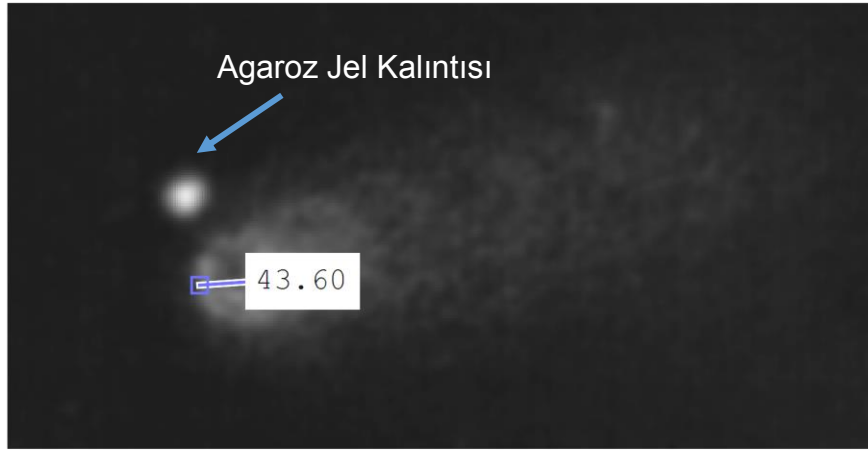


(b)

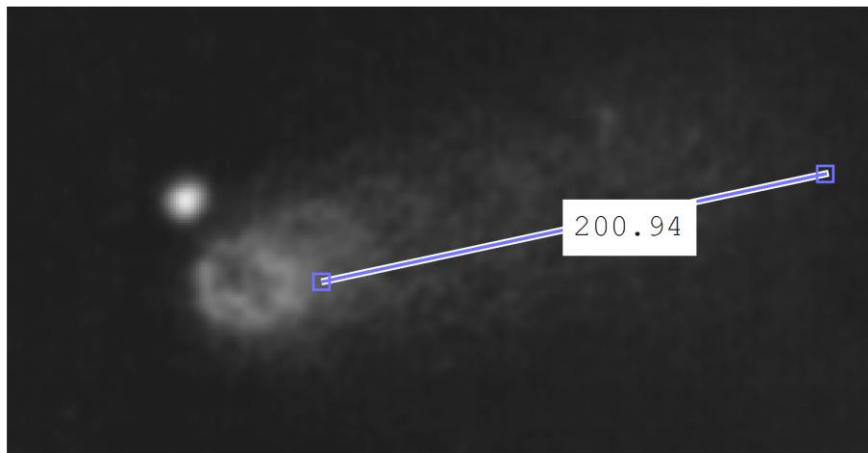
Şekil 5.1 Manuel ölçüm. (a) Baş uzunluğu (b) Kuyruk uzunluğu



Şekil 5.2 Tasarlanan algoritmanın eşikleme görüntüsü

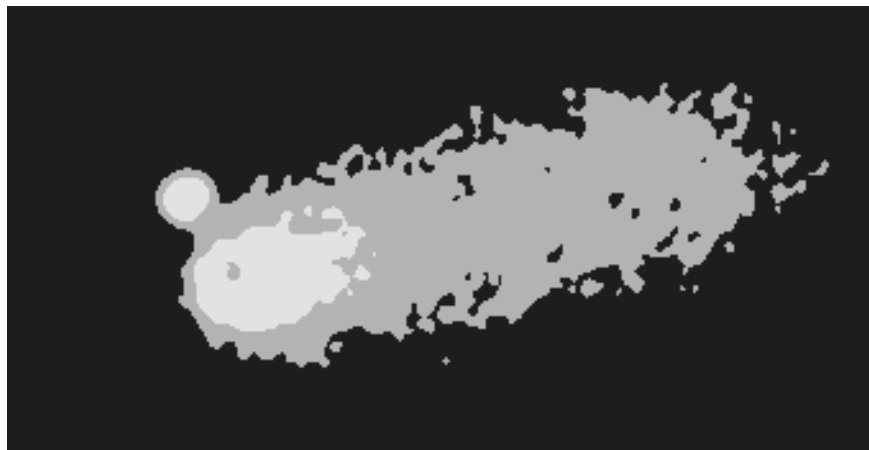


(a)



(b)

Şekil 5.3 Manuel ölçüm. (a) Baş uzunluğu (b) Kuyruk uzunluğu



Şekil 5.4 Tasarlanan algoritmanın eşikleme görüntüsü

6. ÖNERİLER

Literatürde yapılan çalışmalarda, Comet analiz görüntülerinin değerlendirilmesinde Comet ölçüm parametrelerinin hesaplandığı ve görüntülerin 0'dan 4 dereceye kadar skorlandığı görülmüştür. Bu nedenle ileri çalışmalarda Comet analiz görüntülerinin skorlanması üzerine çalışılabilir. Ayrıca, bu çalışmada Otsu metodu ile uyarlamalı çoklu eşikleme uygulaması skorlanan tüm görüntülerde uygulanmıştır. Ancak '0' derece görüntünün kuyruk kısmı oluşmadığından, skorlanan görüntüler üzerinde tekli veya çoklu uyarlamalı eşikleme uygulaması, yapılacak çalışmalar arasında bulunabilir.

Elde edilen eşikleme görüntülerinde, özellikle homojen dağılımlı görüntülerde doğru olmayan sonuçların ortaya çıkabildiği görülmüştür. Bu nedenle daha efektif eşikleme yapılabilmesi için çeşitli yöntemlerin uygulanması ve deneysel süreçler kaynaklı artefaktların temizlenmesi konuları ileride yapılacak çalışmalar arasında sayılabilir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] Aşan, E., Dağdeviren, A. Moleküler Histoloji Hücre. Ankara: Atlas Kitapçılık.2012
- [2] Dinçer, D.Y., Kankaya, S. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay, Türkiye Klinikleri, 2010;30(4):1365-73.
- [3] Sreelatha. G, Rashmi. P, Sathidevi, P.S, Dr.Aparna. M, Dr. Chand.P, Dr. Pajkumar. R.P, Automatic Detection of Comets in Silver Stained Comet Assay Images for DNA Damage Analysis,2014
- [4] Fidan, A.F., DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrofrez, AKÜ Fen Bilimleri Dergisi, 8(1):41-52.
- [5] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., Canlılarda "Tek Hücre Jel Elektrofrez" Yöntemi ile DNA Hasar Analizi (Teknik Not):Comet Analiz Yöntemi, HR.Ü.Z.F. Dergisi, 2010;14(2):77-89.
- [6] Kızıltan, E. Yurtcu, E. Semi-automatic Scoring Tool for Comet Assay, Serbian Society for Computational Mechanics, 2015; 9(1):27-33
- [7] Sansone, M., Zeni, O., Esposito, G. Automated segmentation of comet assay images using Gaussian filtering and fuzzy clustering. Med. Biol. Eng. Comput. 2012;50:523–532.
- [8] Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S. et al, A cross-platform public domain pc image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res.* 2003;534:15–20.
- [9] Böcker, W., Rolf, W., Bauch, T., Müller, W.-U., Streffer, C. Automated comet assay analysis. *Cytometry.* 1999;35:134–144.
- [10] Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P., Hsu, D., Clement, M.-V. Opencomet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014;2:457–465.
- [11] J-F.Rivest, M.Tang, J. McLean, F.Johnson, Automated Measurements Of Tails in The İngle Cell Gel Electrophoresis Assay,IEEE,1996
- [12] Helma, C., Uhl, M. A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay. *Mutat. Res.* 2000;466:9–15.
- [13] T. Lee, S. Lee, W.Y. Sim, Y.M. Jung, S. HAN, C. Chung, J.J. Chang, H.Min, S.Yoon, Robust Classification of DNA Damage Patterns in Single Cell Gel Electrophoresis, IEEE, 2013
- [14] Sreelatha, G., Muraleedharan, A., Chand, P., Rajkumar, R.P., Sathidevi, P.S. An improved automatic detection of true comets for DNA damage analysis. *Procedia Comput. Sci.* 2015;46:135–142.

- [15] Sreelatha, G., Muraleedharan, Sathidevi, P.S., Chand, P., Rajkumar, R.P. CometQ:An automated tool for the detection and quantification of DNA damage using comet assay image analysis.Comp.Metod and Prog. in Biomedicine 2016;133:143-154
- [16] Nandhakumar S, Parasuraman S, Shanmugam MM, Rao KR, Chand P, Bhat BV. Evaluation of DNA damage using single cell gel electrophoresis (Comet Assay). J Pharmacol Pharmacother 2011;2:107-11.
- [17] P.L. Olive, J.P. Banáth, R.E. Durand, Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay, Radiat. Res. 122 (1990) 86–94.
- [18] Karataş, M.,Moleküler Biyoloji. Ankara: Nobel Yayınları.2014;95-9;157-8;
- [19] William S. Klug, Michael R. Cummings, Concepts of Genetics,10th Edition;253
- [20] Güneş,H.V.,Moleküler Hücre Biyolojisi. Eskişehir:Kaan Kitabevi.2006:209
- [21] http://www.nature.com/nrg/journal/v15/n9/box/nrg3729_BX2.html
- [22] İşeri Ö.D , 'Genotoxicity Studies in Plant Cells' Eurobiotech 2012 Agriculture Symposium 12-14 April, 2012, Kayseri, Turkey,
- [23] Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in mammalian cells. DNA Repair Mechanism. In: Hanawalt, PC, Friedberg, EC, eds. New York: Academic Press; 1978. p.465-8.
- [24] Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 1984;123(1):291-8
- [25] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988;175(1):184-91.
- [26] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen. 2000;35(3):206-21
- [27] İşeri Ö.D., Yurtçu E, Şahin F.I., Haberal M, Corchorus olitorius (jüt) özütlerinin İnsan Multipl Myelom Hücreleri (ARH-77) Üzerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi. 23-26 Eylül 2012, İstanbul, Türkiye,sf.18-22.
- [28] R. C. Gonzalez, R. E. Woods, "Sayısal Görüntü İşleme," 3rd edition, Palme Yayıncılık, 2014
- [29] Teo CK. Digital Enhancement of Night Vision and Thermal Images. Thesis, Naval Postgraduate School, California, 2003.
- [30] S. M. Pizer, E. P. Amburn, J. D. Austin, R. Cromartie, A. Geselowitz, T. Greer, B. ter Haar Romeny, J. B. Zimmerman, and K. Zuiderveld, "Adaptive histogram

equalization and its variations,” Computer Vision, Graphics, and Image Processing, vol. 39, no. 3, pp. 355 – 368, 1987.

- [31] Reza,A. Rezalization of the Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) for Real-Time Image Enhancement. Journal of VLSI Sig.Pro, 2004; 38,35-44
- [32] Matlab 2015a, Help, What is Image Filtering in The Spatial Domain
- [33] Mahmood, A. Effect Of Noise On Edge Detection Techniques, Master’s thesis, Cankaya University, February 2014.
- [34] Sezgin, M., 2002, İmge eşikleme yöntemlerinin başarımlarını değerlendirme ve tahribatsız muayenede kullanımı, Doktora Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 8-108
- [35] Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms. IEEE Trans. Syst. Man Cybern. 1979;9:62–66.
- [36] Vilnar,B. Help! There is a comet in my computer. University of Ljubljana Biotechnical Faculty, Department of Biology
- [37] Hellman,B., Vaghef,H., Boström, B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay, Mutat. Res. 336 (1995) 123-131.