

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**MİKROSKOBİK GÖLGE GÖRÜNTÜLEME TABANLI
MİKROAKIŞKAN SİTOMETRİSİ**

HAZIRLAYAN

EKİN KERİMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2021

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**MİKROSKOBİK GÖLGE GÖRÜNTÜLEME TABANLI
MİKROAKIŞKAN SİTOMETRİSİ**

HAZIRLAYAN

EKİN KERİMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET YÜKSEKAYA

ANKARA- 2021

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ekin Kerimoğlu tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 / 01 / 2021

Tez Adı: Mikroskobik Gölge Görüntüleme Tabanlı Mikroakışkan Sitometrisi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YÜKSEKKAYA – Başkent Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL – Başkent Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi M. Cem ÇATALBAŞ – Ostim Teknik Üniversitesi

ONAY

Prof. Dr. Ömer Faruk ELALDI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 26 / 01 / 2021

Öğrencinin Adı, Soyadı : Ekin KERİMOĞLU

Öğrencinin Numarası : 21820060

Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Programı : Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YÜKSEKKAYA

Tez Başlığı : MİKROSKOBİK GÖLGE GÖRÜNTÜLEME TABANLI MİKROAKIŞKAN
SİTOMETRİSİ

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 88 sayfalık kısmına ilişkin, 26 / 01 / 2021 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'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

Tarih: 26 / 01 / 2021

Öğrenci Danışmanı Unvan, Adı, Soyadı, İmza:

Dr. Öğr. Mehmet YÜKSEKKAYA

ÖZET

Ekin KERİMOĞLU

MİKROSKOBİK GÖLGE GÖRÜNTÜLEME TABANLI MİKROAKIŞKAN SİTOMETRİSİ

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2021

Hücre sayımı ve konsantrasyonlarının belirlenmesi teşhiste, tedavinin takibinde ve bilimsel araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Akış sitometrisi hücreleri otomatik olarak sayan ve konsantrasyonlarını belirleyen standart bir yöntemdir. Araştırma amaçlı ve klinik teşhiste yaygın olarak kullanılmaktadır. Klasik akış sitometrisi hücreleri görüntülemeyen, ışık saçılımı, geçişi ve emilimi ilkelerine dayanarak sayar. Cihaz büyük, hantal ve pahalıdır ayrıca oldukça gelişmiş bir optik ölçüm yöntemi olması nedeniyle yerinde teşhis uygulamaları için uygun değildir. Erken teşhis ve tedavinin hızlanması için yerinde teşhis önemlidir. Ayrıca kaynak kısıtlı bölgelerde gelişmiş laboratuvarlar olamayabileceği için yerinde teşhis yapabilen cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hücrelerin üstten aydınlatılmasıyla gölge görüntülerinin bir mikro akışkan içinde elde edilmesine mikroskopik gölge görüntüleme denir. Bu yöntem geniş alan lensiz bir görüntüleme sistemidir.

Bu tez çalışmasında akış sitometrisi kanalına benzer bir mikro kanal düzeneği ve hücreler akış halindeyken mikro kanal içinde gölge görüntüleme yöntemiyle görüntüleyen bir geniş alan mikroskop sistemi tasarlanmıştır ve üretilmiştir. Elde edilen görüntülerden otomatik hücre sayımını gerçekleştiren Hough Dönüşümü tekniğine dayanan bir yazılım da üretilmiştir. Sistem küçük ve performansı düşük bir masa üstü bilgisayarla rahatlıkla çalışmaktadır, boyutları 15cmx15cmx30cm'dir. Tüm tasarım yaklaşık 1500 Avro'ya mal olmuştur, prototip için kullanılan gelişmiş kamera ve ışık sistemi için uygun maliyetli çözümler önerildiğinde 200 Avro'ya kadar maliyet azaltılabilir. Sistem 40 ul solüsyondaki 1666 hücreyi 1 saniyede sayabilmektedir. Sistem %87,75 hassaslık oranına ve %77,77 özgüllük oranına sahiptir. Akış sitometrisinin yerinde teşhiste kullanılabilmesi toplumsal ve ekonomik yarar getirebilir.

ABSTRACT

Determination of number of cells and concentrations are frequently used in diagnosis, treatment follow-up and scientific research. Flow cytometry is a standard method that automatically counts cells and determines their concentrations. It is widely used for research purposes and clinical diagnosis. Classical flow cytometry counts cells without imaging them, it's counting idea is based on the principles of light scattering, transmission, and absorption. The device is large, bulky and expensive, and is not suitable for point of care diagnostic applications due to its highly advanced optical measurement method. Point of care diagnosis is important for early diagnosis and faster treatment. In addition, since there may not be developed laboratories in resource-restricted settlements, devices that can make point of care diagnosis are needed. Obtaining shadow images in a microfluidic channel by illuminating the cells from top is called microscopic shadow imaging. This method is a wide field lensless imaging system.

In this thesis, a micro-channel setup similar to flow cytometry channel and a wide-field microscope system that displays cells in the micro-channel with shadow imaging method was designed and produced. A software based on the Hough Transform technique that performs automatic cell counting from the images obtained was also produced. The system works practically with a small and low performance laptop computer, the device dimensions are 15cmx15cmx30cm. The entire design cost about 1500 Euros, when cost-effective solutions are offered for the advanced camera and light system used for the prototype, the cost can be reduced to 200 Euros. The system can count 1666 cells in 40 ul of solution in a second. The system has 87.75% sensitivity and 77.77% specificity. The ability to use flow cytometry in point of care diagnosis can bring social and economic benefits.

TABLolar

Tablo 1.1	Kırmızı Kan Hücrelerinin Normal Aralıkları.....	19
Tablo 4.1	Maliyet Tablosu.....	75
Tablo 4.2	Özgüllük ve Hassasiyet Tablosu.....	75

ŞEKİLLER TABLOSU

	Sayfa
Şekil 1.1 Akış Sitometrisinin Temel Çalışma Prensipleri [2].....	3
Şekil 1.2 Bir Akış Sitometrisi Sisteminin Elektronik Bileşenleri ile Birlikte Şematik Gösterimi [3].....	4
Şekil 1.3 Birden Çok Boyanın Bulunduğu Sitometri Sisteminin Şematiği [4].....	5
Şekil 1.4 (a) Lenssiz gölge görüntüleme sisteminin şematik diyagramı (b) Cihazın dış görünümü (c) Önerilen platformun basitliğini gösteren cihazın dahili görünümü [23].....	8
Şekil 1.5 Gölge Görüntüleme Tekniği ile Elde Edilmiş Örnek Bir Görüntü [23].....	9
Şekil 1.6 Gölge Görüntüleme Tekniği ile Elde Edilmiş Farklı Hücre Görüntüleri [23].....	10
Şekil 1.7 Örnek Ayrılmış Hücre Görüntüleri.....	14
Şekil 1.8 Örnek Ayrılmış Hücre Görüntüleri.....	15
Şekil 1.9 (a) Birinci Kare (b) İkinci Kare (c) Arka Planın Sıyrılmış Görüntüsü (d) Nesnelerin Tespiti (e) Tespit Edilmiş Nesneler [40].....	18
Şekil 1.10 İşlemin İş Akışı.....	20
Şekil 1.11 (a) Girdi Görüntüsü (b) Ön İşleme Sonucu [58].....	20
Şekil 1.12 (a) Daha Düşük Eşik Değeri ile Alınan Görüntü (b) Daha Yüksek Eşik Değeri ile Alınan Görüntü [58].....	21
Şekil 1.13 Morfolojik Filtreleme ve XOR İşlemleri Sonrası Görüntü [58].....	22
Şekil 1.14 Oylama Prosedürü [58].....	22
Şekil 1.15 CHT Yöntemi ile Belirlenen Hücreler [58].....	23
Şekil 1.16 Test Görüntüleri [58].....	24
Şekil 2.1 Mikroçipin Genel Görünümü.....	26
Şekil 2.2 Katmanların Ayrı Ayrı Gösterimi (Aşağıdan yukarıya: Cam, çift taraflı yapıştırıcı, PMMA, enjektör uçları, PVC hortum).....	27
Şekil 2.3 Cam Yüzey.....	27

Şekil 2.4	Kanal Katmanının CAD Çizimi.....	28
Şekil 2.5	Kanal Katmanının Üç Boyutlu Çizimi.....	28
Şekil 2.6	Kanalın Üç Boyutlu Yapısı.....	29
Şekil 2.7	Giriş Çıkış Katmanının CAD Çizimi.....	30
Şekil 2.8	Giriş Çıkış Katmanının Üç Boyutlu Çizimi.....	30
Şekil 2.9	Enjektör Uçlarının Çipe Yapıştırılmış Görüntüsü.....	31
Şekil 2.10	PVC Hortum.....	31
Şekil 2.11	PMMA ve DSA Katmanların Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun CAD Çizimi.....	32
Şekil 2.12	PMMA ve DSA Katmanların Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun Üç Boyutlu Çizimi.....	33
Şekil 2.13	DSA Katmanının Bir Yüzeyinin Açılması.....	33
Şekil 2.14	DSA ve PMMA Katmanlarının Birleştirilmiş Görünümü.....	34
Şekil 2.15	Daha Öncesinde Birleştirilen PMMA ve DSA Katmanların Cam Yüzey ile Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun CAD Çizimi.....	34
Şekil 2.16	Daha Öncesinde Birleştirilen PMMA ve DSA Katmanların Cam Yüzey ile Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun Üç Boyutlu Çizimi.....	35
Şekil 2.17	PMMA, DSA ve Cam Yüzeylerin Birleştirilmiş Görünümü.....	36
Şekil 2.18	Tüm Parçaların Birleştirilmiş Görünümü.....	37
Şekil 2.19	Kanal İçerisine Gıda Boyası Enjekte Edilmiş Görünüm.....	37
Şekil 2.20	Kalibrasyon İçin Yapılan Çizim.....	38
Şekil 2.21	Etil Alkol.....	39
Şekil 2.22	Distile Su.....	40
Şekil 2.23	%70 Etil Alkol Solüsyonu.....	40

Şekil 2.24	Ultrasonik Banyo.....	41
Şekil 2.25	Şale.....	41
Şekil 2.26	Petri Kabına Yerleştirilen Çipler.....	42
Şekil 2.27	LED Işık Kaynağı.....	43
Şekil 2.28	Görüntü Sensör CMOS Kamera.....	43
Şekil 2.29	Sensör ve Kablosu İçin Tasarlanan Standın CAD Çizimi.....	44
Şekil 2.30	(soldan sağa) Lens Tüpü, LED ile Tüpün Adaptörü, Tüp ile Kutunun Adaptörü	44
Şekil 2.31	Kutu Tasarımının CAD Çizimi.....	45
Şekil 2.32	Tasarımın Tüm Parçalarının Üç Boyutlu Çizimi.....	46
Şekil 2.33	Tasarımın Tüm Parçalarının Birleştirilmiş Üç Boyutlu Çizimi.....	47
Şekil 2.34	Sensör Standı ve Örneğin Konumu.....	48
Şekil 2.35	Gölge Görüntüleme Siteminin Tüm Elemanlarının Birleşmiş Gösterimi.....	49
Şekil 2.36	Enjeksiyon Pompası ve Gölge Görüntüleme Sistemi.....	50
Şekil 2.37	Ham Görüntü.....	51
Şekil 2.38	Algoritma Akış Şeması.....	52
Şekil 2.39	Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 3 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü	53
Şekil 2.40	Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 5 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü	54
Şekil 2.41	Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 7 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü	54
Şekil 2.42	Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 180 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	55
Şekil 2.43	Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 190 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	56
Şekil 2.44	Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 200 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	56

Şekil 2.45	Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 3 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	58
Şekil 2.46	Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 5 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	58
Şekil 2.47	Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 7 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü.....	59
Şekil 2.48	Orjinal Görüntü ve Filtrelenmiş Görüntü.....	59
Şekil 2.49	Filtrelenmiş Görüntü ve Binary Görüntü.....	60
Şekil 2.50	Oluşturulan Yeni Binary Görüntü.....	61
Şekil 2.51	Binary Görüntü ve Filtrelenmiş Binary Görüntü.....	61
Şekil 2.52	Binary Görüntü ve Hough Circle Transform İşlemi Uygulanmış Görüntü.....	62
Şekil 2.53	Program Arayüzü.....	63
Şekil 3.1	Kamera Çipinin Temizlenmiş Görüntüsü.....	64
Şekil 3.2	Boş Cam Slayt Üzerindeki Sıvının Görüntüleme Sistemi ile Alınan Görüntüsü	65
Şekil 3.3	PMMA Çipin Görüntüleme Sistemindeki Görüntüsü.....	65
Şekil 3.4	Soldaki: Alt Katman, Sağdaki: Üst Katman.....	66
Şekil 3.5	Cam Slayt Üzerindeki Hücre Benzeri Lekeler.....	67
Şekil 3.6	PMMA Üzerindeki Hücre Benzeri Lekeler ve Çizikler.....	67
Şekil 3.7	1/1000 Oranında Seyreltilmiş Kanın Gölge Görüntüleme Sistemi Üzerindeki Görüntüsü.....	68
Şekil 3.8	1/10000 Oranında Seyreltilmiş Kanın Gölge Görüntüleme Sistemi Üzerindeki Görüntüsü.....	69
Şekil 3.9	Hücre Görüntüleri Yerine Kullanılan Görüntü.....	70
Şekil 3.10	Gri Skala Görüntüsüne Gaussian Blur Uygulanması.....	71
Şekil 3.11	Filtrelenmiş Görüntünün Binary Görüntüye Çevrilmesi.....	71

Şekil 3.12	Binary Görüntünün Renklerinin Ters Çevrilmesi.....	72
Şekil 3.13	Binary Görüntünün Median Blur Filtre ile Filtrelenmesi.....	72
Şekil 3.14	Hücrelerin Sayım İşleminin Gerçekleştirilmesi.....	73
Şekil 4.1	Arayüzde Açılmış Hücre Görüntüsü.....	76
Şekil 4.2	Hücre Sayım İşleminin Sonucu.....	76

KISALTMALAR

PMMA	Polimetilmetakrilat
PVC	Polivinilklorür
DSA	Double Sided Adhesive
CAD	Computer Aided Design
CHT	Circle Hough Transform
LED	Light Emitting Diode
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TABLOLAR.....	iii
ŞEKİLLER TABLOSU.....	iv
KISALTMALAR.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Akış Sitometrisi.....	1
1.2.Mikro Akışkan Kanal Tasarımı	6
1.3.Gölge Görüntüleme	8
1.4.Görüntü İşleme ile Hücre Belirleme	11
1.4.1.Yoğunluk Eşiği.....	12
1.4.2. Nitelik Belirleme	12
1.4.3. Morfolojik Filtreleme	12
1.4.4. Bölge Birikimi	13
1.4.5. Deforme Edilebilir Model Uygulama.....	13
1.5.Video Görüntü İşleme	17
1.6.Hücre Sayma Algoritması.....	19
1.6.1.Ön İşleme.....	21
1.6.2.Görüntü Segmentasyonu.....	21
1.6.3.Hücre Belirleme	22
1.6.4.Hücre Sayma	24
1.7.Gölge Görüntüleme Sistemi ile Mikrokanallarda Kan Hücresi Sayımı.....	26
2. MATERYAL VE METOT	27
2.1.Mikroakışkan Çip Tasarımı	27

2.1.1.Cam Yüzey	28
2.1.2.Kanal Katmanı.....	29
2.1.3.Giriş Çıkış Katmanı.....	30
2.1.4.Enjektör Uçları	32
2.1.5.PVC Hortum	32
2.1.6.Katmanların ve Parçaların Birleştirilmesi.....	33
2.1.7.Malzemelerin Kalibrasyonu	39
2.1.8.Malzeme Temizlik Protokolleri.....	39
2.2.Gölge Görüntüleme Sistemi Tasarımı	43
2.3.Hücre Sayma Algoritması Tasarımı	51
2.3.1.Ham Görüntünün Alınması ve Yöntemin Seçilmesi	51
2.3.2. Yöntem Basamaklarının Belirlenmesi.....	53
2.3.3. Parametre Optimizasyonu	53
2.3.3.2. 1. Eşik Değeri Parametre Belirleme.....	56
2.3.4. Yöntemin Uygulanması.....	60
2.3.5. Arayüz	63
3. DENEYLER VE SONUÇ	65
3.1.Görüntüleme Sisteminin Testi.....	65
3.2.Mikroakışkan Çipin Testi.....	67
3.3.Algoritmanın Testi.....	70
3.4.Akış Sitometrisinin Testi.....	74
4. SONUÇ	75
KAYNAKÇA.....	78

1. GİRİŞ

1.1. Akış Sitometrisi

Sitometri, hücrelerin fiziksel ve / veya kimyasal özelliklerinin, kabaca aynı büyüklük aralığındaki diğer biyolojik veya biyolojik olmayan parçacıkların ölçüldüğü bir işlemdir. Akış sitometrisinde, ölçümler, hücreler veya partiküller bir sıvı akımında bir ölçüm aparatından geçerken yapılır. Hücre sıralayıcı veya akış sıralayıcı olarak da bilinen bu ölçüm aparatı, kullanıcı tarafından seçilen bir değer aralığına düşen ölçülen özelliklere sahip hücreleri (veya diğer küçük parçacıkları) yönlendirmek ve toplamak için elektriksel ve / veya mekanik araçlar kullanan bir parçadır.

Genelde sitometri sürecini harekete geçirmek için gerekli kritik unsur, bir hücre örneği hakkında bilgi almak ve sınıflandırma durumunda ilgili hücreleri numuneden çıkarmakla ilgilenen bir insandır. En temel düzeyde, bir sitometre, hücrelerin "girdi" ve sayıların "çıkıtı" olduğu bir "black box" olarak düşünülebilir; bir hücre sıralayıcısının çıktıları hem sayıları hem de hücreleri içerecektir [1].

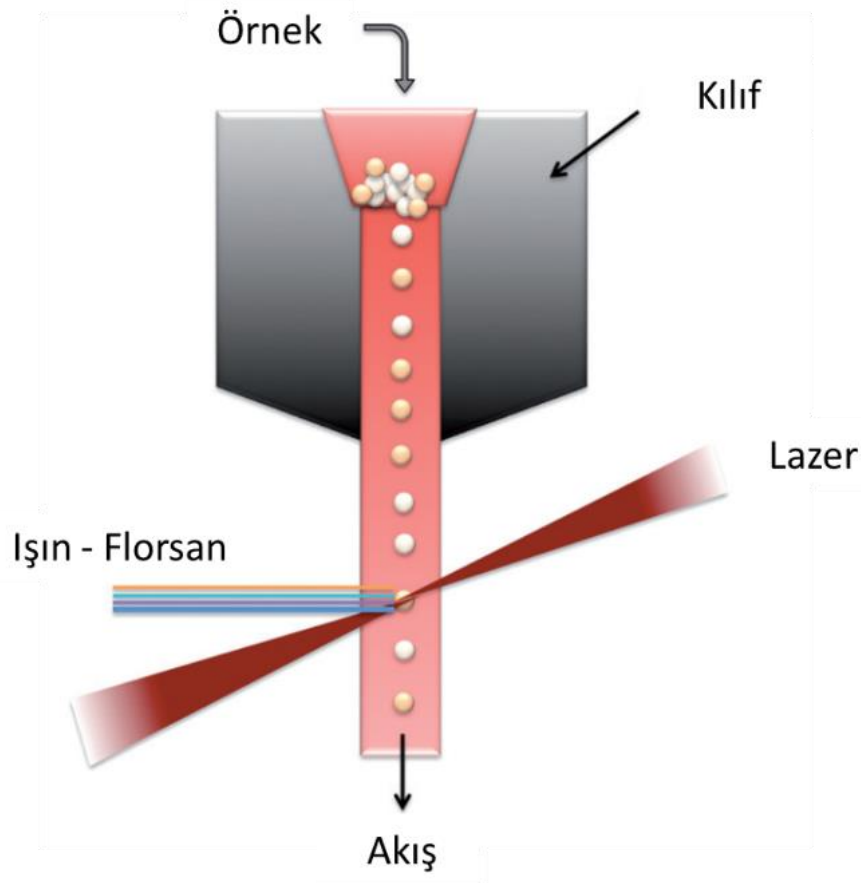
Tarihsel olarak, geliştirilen ilk akış sitometrisi, yalnızca hücrelerin boyutunu algılayan tek parametrelili bir cihazdı. Şu anda, 14 parametreyi eşzamanlı olarak tespit etme yeteneği ile oldukça karmaşık araçlar gelişmiştir. Akış sitometrisi, tek bir hücrenin veya bir sıvı akışındaki mikroorganizmalar, çekirdekler ve kromozom preparatları gibi diğer partiküllerin bir ışık kaynağından geçerken optik ve floresan özelliklerini ölçme yeteneğine sahiptir. Antikorlardan veya boyalardan türetilen hücrelerin boyutu, tanecikliği ve floresan özellikleri de hücreleri analiz etmek ve farklılaştırmak için kullanılan parametrelerin örnekleridir. Akış sitometrisinin altında yatan ilke, hareketli parçacıklara çarpan uyarma kaynağından (genellikle bir lazer ışını) gelen ışık olarak ortaya çıkan ışık saçılması ve floresan emisyonuyla ilgilidir. Elde edilen veriler, parçacıkların biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküler yönleri hakkında değerli bilgiler verebilir. Işık saçılması, hücrenin yapısal ve morfolojik özellikleriyle doğrudan ilişkililikten, bir floresan probundan türetilen floresan emisyonu, hücreye veya hücresel bileşene bağlı floresan prob miktarı ile orantılıdır.

Sınıflandırılmalı ve sınıflandırılmı olarak adlandırılan iki farklı akış sitometrisi vardır. Sınıflandırılmı tip, ışık saçılımı ve floresan emisyonu gerçekleştirebilirken, sınıflandırılmalı tip de parçacıkları sınıflandırma yeteneğine sahiptir. Floresan aktive hücre

sınıflandırıcılar (FACS), karışık bir hücre popülasyonundan floresan etiketli hücreleri ayırma kapasitesine sahip akış sitometreleridir.

Akış sitometrelerinin ve hücre sınıflandırıcılarının ana bileşenleri temelde akışkanlar, optikler (uyarma ve toplama), bir elektronik ağ (detektörler) ve bir bilgisayardır. Akışkanlar, sıvı içeren partiküllerin odaklanmış ışık kaynağına yönlendirilmesinden sorumludur. Uyarma optiği, ışık kaynağını hücrelere / partiküllere odaklarken, toplama optiği, partikülün ışık saçılımını veya floresan ışığını bir elektronik ağa iletir. Elektronik ağ, sinyali algılar ve sinyalleri ışık yoğunluğuyla orantılı bir dijital veriye dönüştürür ve bilgisayarın ayrıca verileri analiz etmesi gerekir.

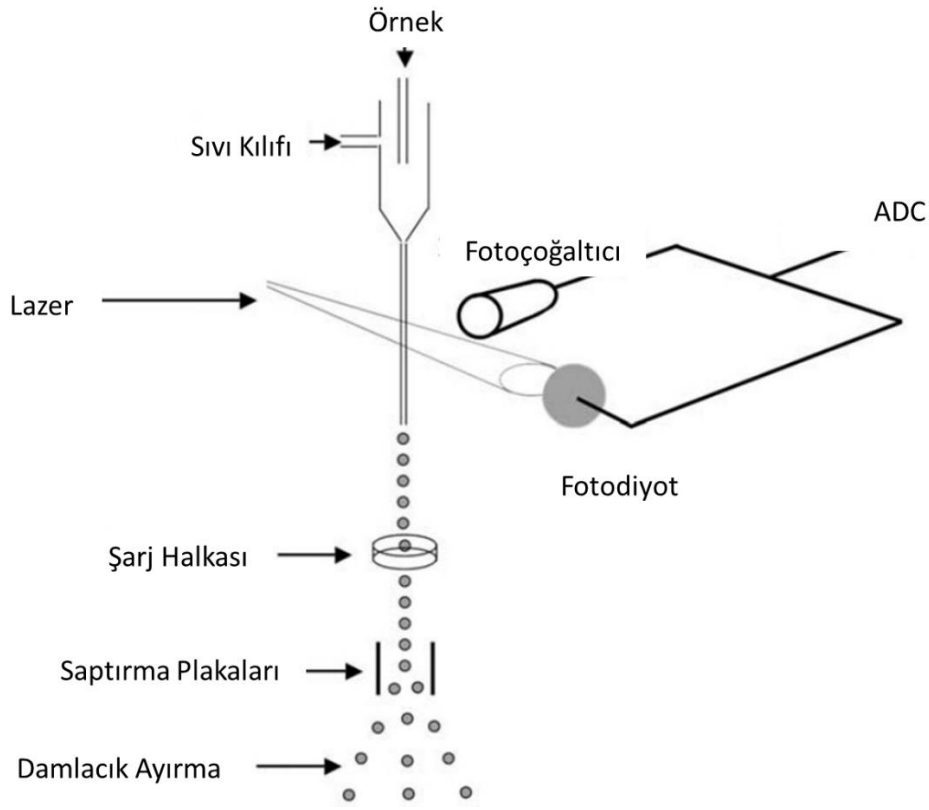
Akış sitometrisi, membran, sitoplazmik ve nükleer antijenlerin tespitine dayanan çeşitli uygulamalarda kullanılır. Ek olarak, organeller, çekirdekler, DNA, RNA, kromozomlar, sitokinler, hormonlar ve protein içeriği gibi tam hücreler ve hücre sel bileşenler de akış sitometrisi ile araştırılabilir. Hücre çoğalması ve hücre döngüsü analizi, kalsiyum akışı ve membran potansiyellerinin ölçümleri, akış sitometrisi için geliştirilen yöntemlerin yaygın olarak kullanılan örnekleridir. Şekil 1.1'de klasik akış sitometrisinin şematik gösterimi gösterilmiştir [2].



Şekil 1.1 Akış Sitometrisinin Temel Çalışma Prensibi [2]

Tüm sitometri biçimleri, akışkanlar, optikler ve elektronikler de dahil olmak üzere temel fizik yasalarına bağlıdır. Akış sitometrisi, bir lazer (uyarılmış radyasyon emisyonu ile ışık amplifikasyonu) / bir algılama alanından geçen ışık huzmesi aracılığıyla bir sıvı akışında hareket ederken hücreleri veya parçacıkları algılamak için bir sistemdir. Mikroskobik partiküllerin nispi ışık saçılımı ve rengi ayırt eden flüoresansı ölçülür. Hücrelerin analizi ve farklılaşması, boyuta, tanecikliliğe ve hücrenin antikor veya boya formunda floresan moleküller taşıyıp taşımadığına bağlıdır. Hücre lazer ışınının içinden geçerken ışık her yöne dağılır ve ileri yönde düşük açılarda ($0,5-10^\circ$) eksenden saçılan ışık kürenin yarıçapının karesiyle orantılıdır ve böylece hücre veya parçacığın boyutuna göre yorum yapılabilir. Işık hücreye girebilir ve çekirdek ve hücrenin diğer içerikleri tarafından yansıtılabilir veya kırılabilir; bu nedenle 90° ışık (dik açılı, yan) dağılım hücrenin tanecikliliği ile orantılı olarak kabul edilebilir. Hücreler, florokrom bağlı antikorlarla etiketlenebilir veya floresan membran, sitoplazmik veya nükleer boya ile boyanabilir. Bu nedenle, hücre tiplerinin farklılaşması, membran reseptörlerinin ve antijenlerinin varlığı, membran potansiyeli, pH,

enzim aktivitesi ve DNA içeriği gibi ölçümler yapılabilir. Şekil 1.2’de klasik akış sitometrisin elektronik bileşenleri ile birlikte gösterilmiştir [3].



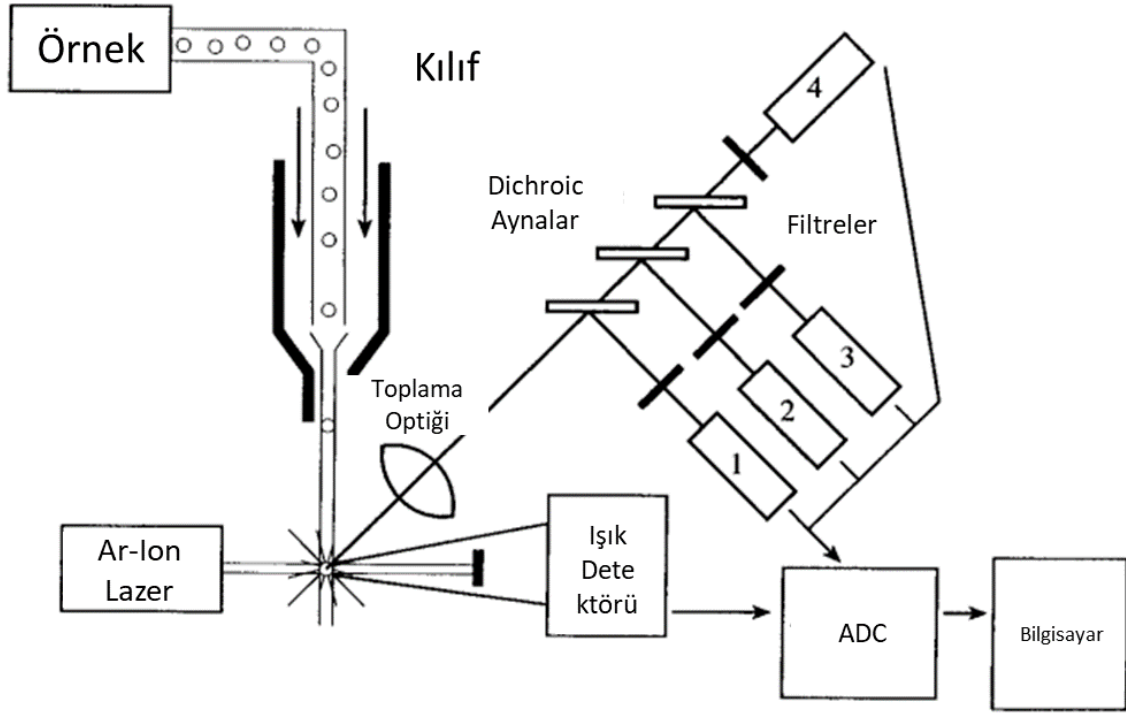
Şekil 1.2 Bir Akış Sitometrisi Sisteminin Elektronik Bileşenleri ile Birlikte Şematik Gösterimi [3]

Akış sitometrisi, tek hücrelerin birden çok özelliğinin hızlı analizini sağlar. Elde edilen bilgiler hem nitel hem de niceldir. Geçmişte akış sitometreleri yalnızca daha büyük akademik merkezlerde bulunurken, teknolojidaki ilerlemeler artık toplum hastanelerinin bu yöntemi kullanmasını mümkün kılmaktadır. Çağdaş akış sitometreleri çok daha küçük, daha ucuz, daha kullanıcı dostudur ve yüksek hacimli işlemler için çok uygundur. Akış sitometrisi, tam kan, kemik iliği, seröz boşluk sıvıları, beyin omurilik sıvısı, idrar ve katı dokular dahil olmak üzere çeşitli numunelerin immünofenotiplendirilmesi için kullanılır. Ölçülebilen özellikler arasında hücre boyutu, sitoplazmik karmaşıklık, DNA veya RNA içeriği ve çok çeşitli zara bağlı ve hücre içi proteinler bulunur. Bu derleme, akış sitometrisinin temel ilkelerini açıklayacak ve hematolojiye yönelik bazı uygulamalara genel bir bakış sağlayacaktır [4].

Floresan boyalar, DNA veya RNA gibi farklı hücresel bileşenlere bağlanabilir veya bunlarla araya girebilir. Ek olarak, floresan boyalara konjuge edilmiş antikolar, hücre zarları

üzerindeki veya hücrelerin içindeki spesifik proteinleri bağlayabilir. Etiketli hücreler bir ışık kaynağı tarafından geçirildiğinde, flüoresan molekülleri daha yüksek bir enerji durumuna uyarılır. Dinlenme durumlarına döndüklerinde, florokromlar daha yüksek dalga boylarında ışık enerjisi yayarlar. Her biri benzer uyarma dalga boylarına ve farklı emisyon dalga boylarına (veya "renklere") sahip birden fazla florokromun kullanılması, birkaç hücre özelliğinin aynı anda ölçülmesine izin verir. Yaygın olarak kullanılan boyalar arasında propidyum iyodür, fikoeritrin ve floresan bulunur, ancak birçok başka boya da mevcuttur. Dahili floresans rezonans enerji transferine sahip tandem boyalar daha da uzun dalga boyları ve daha fazla renk oluşturabilir.

Bir akış sitometresinin içinde, süspansiyon halindeki hücreler, laminer akış oluşturan çevreleyen izotonik sıvı kılıfı tarafından oluşturulan bir akıma çekilir ve hücrelerin bir sorgulama noktasından ayrı ayrı geçmesine izin verir. Sorgulama noktasında, genellikle bir lazerden gelen monokromatik bir ışık demeti hücrelerle kesişir. Yayılan ışık her yönden verilir ve ışığı belirli dalga boyu bantlarını izole eden bir dizi filtre ve dikroik aynaya yönlendiren optikler aracılığıyla toplanır. Işık sinyalleri, fotoçoğaltıcı tüpler tarafından algılanır ve bilgisayar analizi için sayısallaştırılır. Ortaya çıkan bilgiler genellikle histogram veya iki boyutlu nokta-grafik formatlarında görüntülenir. Şekil 1.3'te birden çok boyanın bulunduğu sitometri sistemi gösterilmiştir [5-7].



Şekil 1.3 Birden Çok Boyanın Bulunduğu Sitometri Sisteminin Şematığı [4]

1.2. Mikro Akışkan Kanal Tasarımı

Mikro akışkan teknolojisi, son yıllarda hızla gelişmiştir ve biyolojik bilimlerde çok yönlü uygulama sunmaktadır. Yüksek analitik verim, artırılmış duyarlılık, gelişmiş analitik performans, çoğullama yoluyla kolay paralelleştirme, azaltılmış reaktif hacimlerini idare etme ve işleme yeteneği dahil olmak üzere sistem minyatürleşirmesinin sağladığı farklı avantajlardan dolayı mikro akışkan sistemleri ortaya çıktı.

İlaç geliştirme, klinik öncesi testler ve klinik denemeler gibi birkaç ana ve ara süreci içerir. Farmasötik analiz, tüm bu süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu karmaşık süreç, zaman tüketimi, düşük verim ve maliyet gibi önemli sorunlardan kaynaklanan bazı zorluklarla karşı karşıyadır. Bir minyatürleştirme teknolojisi olarak mikro akışkan sistemler, hassasiyet ve otomasyon kaybı olmadan eş zamanlı olarak analitik verimlilik ve yüksek üretim kapasitesi sağlayabilir. İlaç uygulama sürecinde, mikro akışkan teknolojisi sadece ilaç keşfinin terapid taraması ve analizi için güçlü bir araç olmakla kalmaz, aynı zamanda minyatürleştirilmiş cihazları sayesinde maliyetleri ve reaktif tüketimini düşürür. Mikro akışkan çip cihazının hacmi minimumdur ve birçok işlev birkaç santimetrelilik bir çip üzerine entegre edilebilir. Çipin iç boyutları mikrometreden milimetreye kadar değişir, bu nedenle numunelerin ve reaktiflerin tüketimi nano litre ve piko

litre seviyelerindedir. Çok kanallı ve dizi tasarımları, eleme hızını yüzlerce kat artırabilen ve maliyetleri düşürebilen yüksek verim elde edilmesini sağlar.

1990'ların başındaki öncü gelişmeden bu yana, mikro akışkan teknolojisi, kimyasal sentez, proteomik, tek hücreli analiz, doku mühendisliği, yüksek verimli tarama, çevre dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında uygulanmıştır. Bu tür platformlar biyolojik süreçlere yeni bakış açıları sağlar ve yeni farmasötik analizlerin verimli ve hızlı bir şekilde üretilmesini sağlar. Mikro akışkan cihazlar, yalnızca yer tasarrufu ve kıt / pahalı malzemeler için değil, aynı zamanda minyatürleştirme ve çeşitli ek üstünlükler sunduğu için avantajlıdır [8-12].

Mikroakışkanlar, en az bir boyutu (örneğin kanal derinliği, genişliği veya çapı) 1 mm'den küçük olan mikro kanallardaki akışkanları işleme bilim ve teknolojisidir. Mevcut mikroakışkan teknolojinin ilk uygulamaları arasında, mikroakışkan cihazların çok küçük hacimlerde numune ve reaktifler kullanması nedeniyle kısa sürede analiz yapmak için harekete geçirilen kan reolojisi ve kimyasal analiz bulunmaktadır, kısa difüzyon mesafeleri ve proses entegrasyonu sayesinde yüksek kompaktlık seviyeleri elde etmek, 1980'lerde başlayan silikon mikrofabrikasyon teknolojisindeki hızlı ilerleme, bu silikon bazlı mikro akışkan cihazların geliştirilmesini sağlamıştır. Saydam polidimetilsiloksan (PDMS) elastomer kullanılarak yeni bir dizi mikroakışkan cihaz üretilmiştir. Mikroakışkan cihaz (aynı zamanda bir çip üzerinde laboratuvar cihazı olarak da adlandırılır), tek bir ünite işlemine (örneğin, karıştırma, ayırma, damlacık oluşturma, partikül manipülasyonu, ısıtma ve algılama) izin verir veya birden fazla ünite işlemi içerir [1-8].

Mikroakışkan teknolojisi, hızla büyüyen disiplinler arası bir alandır ve son yirmi yılda akışkan fiziğinden biyotıpı kadar geniş bir alan yelpazesinde büyük ilgi görmüştür. Mikroakışkan cihazların ümit verici uygulamaları arasında ilaç keşfi, ilaç geliştirme ve ilaç sentezi de bulunmaktadır [13].

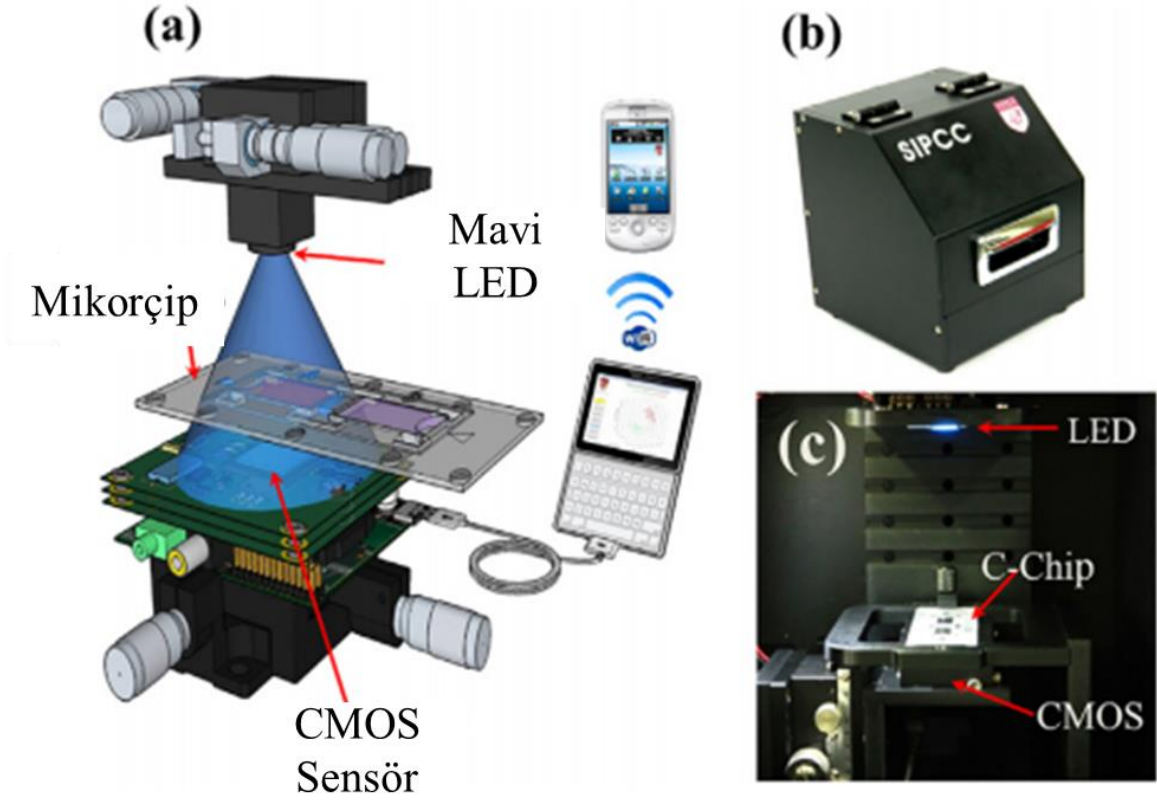
Çoğu mikro akışkan sistem, cam ve plastik substratlar üzerinde imal edilmiştir. Mikro sistemlerde kullanılan cam yüzeyler üzerindeki ilk çalışma, analitik yeteneklerini başarıyla göstermiştir. Yine de cam üretim süreçleri zaman alıcıdır ve ortaya çıkan mikroçipler genellikle uygun maliyetli bir şekilde tek kullanımlık cihazlar olarak kullanım için pahalıdır. Polimerler ise aksine, mikro akışkan sistemlerin toplu üretimi için substrat malzemeleri olarak cama uygun, düşük maliyetli bir alternatif sunar.

Plastik cihazlar oluşturmak için kullanılan üretim süreçleri, cam için kullanılanlardan önemli ölçüde daha düşük maliyetlerle cihaz yeniden üretilebilirliğini sağlayan döküm, kabartma veya enjeksiyonla kalıplama gibi yöntemlere dayanmaktadır. Bu avantajlar, "sahada" veya "bakım noktası" uygulamalarında tek kullanımlık cihazlar üretmek için polimerik çipleri çok daha uygun hale getirir. Polimetilmetakrilat (PMMA) bazlı mikroakışkan sistemlerin performans özelliklerini açıklayan çeşitli çalışmalar mevcuttur. PMMA, yaygın plastik malzemeler arasında en az hidrofobik olandır ve polidimetil-siloksan (PDMS) 'ın sınırlı stabilitesine kıyasla iyi bir hidrolitik stabilite gösterir. Aynı zamanda son derece ucuz bir substrat malzemesidir [14-16].

1.3.Gölge Görüntüleme

Tam kan sayımı (CBC), patoloji laboratuvarlarında temel ve önemli bir tanı prosedürüdür. Bir CBC tarafından belirlenen kırmızı kan hücresi (RBC) konsantrasyonu, beyaz kan hücresi (WBC) konsantrasyonu ve WBC alt popülasyonlarının (nötrofiller, lenfositler ve monositler) yüzdeleri, belirli bir hastalık veya bozukluğa karşılık gelen ana parametrelerdir. Tam kan sayımı (CBC) geleneksel olarak, geleneksel bir optik mikroskop altında 100 µm derinliğinde bir oda oluşturan dikdörtgen bir girintiye sahip mikroskobik bir cam slayt içeren bir hücre sayımı için tasarlanmış bir hemositometre ile gerçekleştirilir. Hemositometri, hücrelerin tanımlanması ve sayılması elle yapıldığından zaman alan bir süreçtir. Aksine, empedans veya akışsitometri tabanlı otomatik elektrik veya optik hücre sayma yaklaşımları hızlı ve doğru sonuçlar sağlar [17-19].

Mikroakışkan teknolojisi ile minyatürleştirilmiş tüm bu optik ve elektrik sitometri cihazları nispeten düşük maliyetlidir ve geleneksel otomatik hücre analizörlerinden (yani akış sitometreleri veya Coulter sayaçlarından) daha küçüktür. Bununla birlikte, bunların tümü, bir şırınga pompası gibi bağımsız bir sıvı akış kaynağı gerektiren ve taşınabilir bir toplam analiz sisteminde kolayca minyatürleştirilemeyen hidrodinamik sistemlerdir. Şekil 1.4'te gölge görüntüleme sisteminin temel bileşenleri gösterilmiştir.



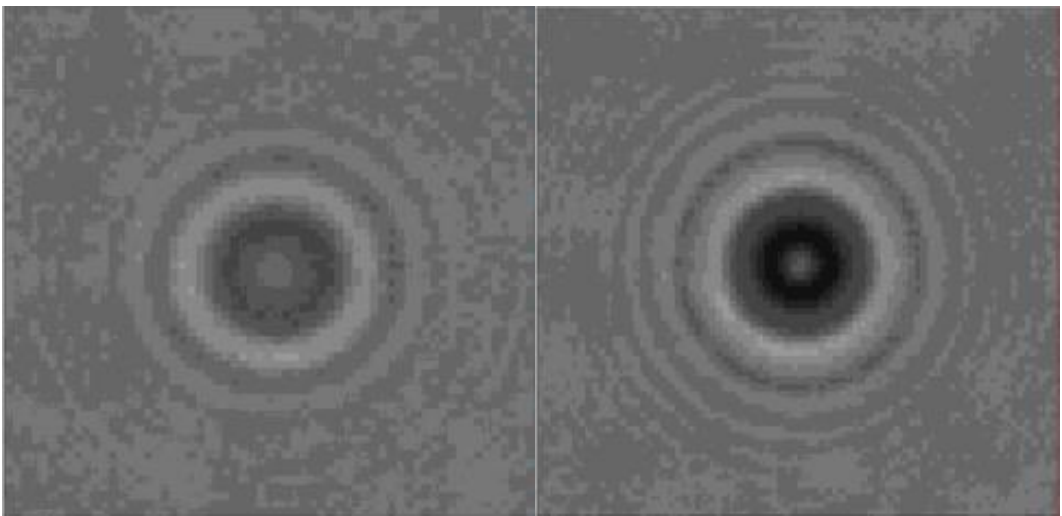
Şekil 1.4 (a) Lenssiz gölge görüntüleme sisteminin şematik diyagramı. (b) Cihazın dış görünümü. (c) Önerilen platformun basitliğini gösteren cihazın dahili görünümü. [23]

Kompakt ve düşük maliyetli, lens içermeyen tamamlayıcı metal oksit yarı iletken (CMOS) görüntü sensörüyle donatılmış bu cihaz, geleneksel mikroskopide olduğu gibi herhangi bir lens veya mekanik bir sahne gerektirmez. Lenssiz gölge görüntüleme tekniğinde, bir çipin içerdiği biyolojik hücreler veya mikro nesnelere, doğrudan CMOS görüntü sensörü yüzeyinin üstüne konumlandırılır ve çip, hücrelerin gölge modellerini oluşturmak için kısmen uyumlu bir ışık kaynağı ile aydınlatılır veya mikro nesnelere. Oluşturulan gölge desenleri (yani kırınım desenleri) daha sonra CMOS görüntü sensörü tarafından yakalanır ve hücre bilgisini çıkarmak için özel olarak geliştirilmiş bir algoritma ile işlenir. Daha önce bahsedilen hidrodinamik hücre analizi platformlarının aksine, bu, test edilen tüm hücrelerin veya mikro nesnelere hücre çipinde hareket etmediği bir hidrostatik hücre analizi yaklaşımıdır. Lenssiz görüntülemenin (yani odaklanma prosedürü olmadan) genişletilmiş görüş alanı nedeniyle, Hücreler veya mikro nesnelere hepsi paralel olarak karakterize edilir ve cihaza ultra yüksek verim sağlar. Bu tekniği kullanarak, tek bir örnekteki benzer büyüklükteki farklı mikro nesnelere gölge desenleri başarıyla

farklılaştırılmıştır. Şekil 1.5'te ve Şekil 1.6'da gölge görüntüleme sistemi ile elde edilmiş hücre görüntüleri gösterilmiştir [19-23].



Şekil 1.5 Gölge Görüntüleme Tekniği ile Elde Edilmiş Örnek Bir Görüntü [23]



Şekil 1.6 Gölge Görüntüleme Tekniği ile Elde Edilmiş Farklı Hücre Görüntüleri [23]

Bu teknik, heterojen bir çözeltide hücre tespiti ve farklılaşması, kan hücresi sayımı ve sürekli hücre proliferasyonu ve canlılık testi dahil olmak üzere kompakt ve uygun maliyetli bir hücre izleme uygulamalarını mümkün kılmıştır. Ek olarak, bu basit ve çok yönlü platform, hemoglobın veya antikor gibi moleküllerin doğru tespitini de sağlayabilir. Ayarlanabilir monokromatik aydınlatma ile birlikte, çeşitli hücre tipleri için çok renkli gölge görüntüleme yaklaşımı da geliştirilmiştir ve bir çip üzerinde heterojen bir çözeltinin yüksek verimli karakterizasyonuna uygulanmıştır. Hesaplamalı optikle güçlendirilen bu kompakt, hafif ve uygun maliyetli platform, lenssiz mikroskopiye dönüştürülebilir, hücre biyolojisi ve teşhis için yeni bir araçtır. Tomografi ve piksel süper çözünürlük teknikleriyle birleştiğinde bu güçlü teknik, bir hücredeki sıtma parazitlerini, nano partikülleri ve insan sperm hücrelerinin sarmal yörüngelerini tespit etmek için bile uygulanabilir [24].

1.4.Görüntü İşleme ile Hücre Belirleme

Hücrelerin analizi için bilgisayarların ilk kullanımları yarım yüzyıldan daha eskilere dayanıyor. Halihazırda 1950'lerin ortalarında, rahim ağzı kanseri için toplu taramayı mümkün kılmak amacıyla, pul pul dökülmüş hücrelerin smearlarının sınıflandırılmasını otomatikleştirmek için sistemler geliştirildi. Bu sistemler, bir numunenin seri tek boyutlu (1-D) mikroskobik çizgi taramalarına eşikleme tabanlı karar kuralları uyguladı. 1960'lar, basit kolorimetrik ve morfolojik ölçümlere dayanan ana sınıflarına göre beyaz kan hücrelerinin (lökositler) diferansiyel sayımı amacıyla iki boyutlu (2-D) görüntülerin otomatik olarak işlenmesinin ilk örneklerine tanık oldu. Bu rutin klinik testi gerçekleştirmek için kullanılan ticari sistemler, 1970'lerin ortalarında piyasaya çıktı ve hatta önceki hücrenin görüntüsünü analiz ederken, mevcut hücrenin görüntüsünü yakalarken ve aynı zamanda yerini tespit etmek için birden fazla bilgisayar devresi içeriyordu. örnekteki bir sonraki hücre. Bunlar aynı zamanda, nöronal hücrelerin izlenmesi ve morfolojik analizi için ilk bilgisayar destekli mikroskopların geliştirildiği dönemlerdir. 1980'lerde konfokal mikroskop sistemlerinin ortaya çıkışı, üç boyutlu (3-D) hücre görüntü analizinin kapısını açtı. Ancak, bilgisayarların 3 boyutlu verileri, hatta histopatolojideki gibi karmaşık 2 boyutlu verileri işleyecek kadar güçlü hale geldiği 1990'lara kadar, görüntü işleme ve bilgisayarla görme toplulukları gerçekten zorluğu üstlenmeye başladı. Hücre analizi için otomatik görüntü segmentasyonu, verilerin büyük değişkenliği ve karmaşıklığı nedeniyle genellikle büyük bir sorundur [25-29].

1.4.1. Yoğunluk Eşiği

Hücre segmentasyonuna yönelik ilk ve hala en çok kullanılan yaklaşımlardan biri yoğunluk eşiğidir. Altta yatan varsayım, hücrelerin arka plandan önemli ölçüde ve tutarlı bir şekilde farklı yoğunluklara sahip olduğudur, bu durumda sabit bir eşik yeterli olacaktır veya yerel olarak uyarlanabilir eşikleme gerektirecektir. Otomatik eşik seçimine yönelik yaklaşımlar, genellikle histogram kullanılarak global veya yerel görüntü yoğunluklarının istatistiksel analizine dayanır. Bununla birlikte, pratikte, temel varsayım sıklıkla ihlal edilir ve tek başına eşikleme, zayıf bölümlenme sonuçları üretir. Hiç değilse, çoğu hücre segmentasyon yöntemi eşiklemeyi yalnızca boru hattında ilk adım olarak uygular [30].

1.4.2. Nitelik Belirleme

Hücreler, mutlak yoğunluklarından ziyade, doğrusal görüntü filtreleme kullanılarak kolayca tespit edilebilen yoğunluktan türetilen özelliklere göre bölümlere ayrılabilir. Örneğin, düşük büyütme oranlarında, hücreler kompakt parçacıklara benzer ve Gaussian veya Laplacian-of-Gauss filtresi gibi bir damla detektörü kullanılarak bulunabilir. Daha yüksek büyütme oranlarında hücreler daha büyük bölgeler olarak görünür, ancak şekilleri nispeten değişmezse, görüntülerden özel bir filtre şablonu türetilir. Alternatif olarak, daha değişken senaryolarda, kenar algılama (birinci dereceden diferansiyel filtreleme) veya tepe algılama (ikinci dereceden diferansiyel filtreleme) sıklıkla kullanılır, ardından bazı bağlantı prosedürleri izlenir. Eşiklemeye benzer şekilde, bu tür filtreler tek başlarına kesin hücre ana hatları üretmezler, ancak boru hattındaki sonraki adımlar için yararlı ipuçları sağlayabilir [30].

1.4.3. Morfolojik Filtreleme

Bir başka popüler filtre sınıfı, matematiksel morfoloji alanındakilerdir. Doğrusal olmadıkları için, erozyon, genişleme, açma ve kapama gibi operatörler, görüntülerdeki nesnelerin geometrik ve topolojik özelliklerinin incelenmesine ve manipülasyonuna izin verir ve genellikle hücre segmentasyonu ile bağlantılı olarak kullanılır. Daha karmaşık filtreler, bu tür operatörlerin kombinasyonu veya art arda uygulanmasıyla kolayca oluşturulabilir. İkili morfoloji ve gri tonlama morfolojisi arasında bir ayrım yapılmalıdır. İlki yoğunlukla kaba bölümlenmeleri cilalamak için bir son işlem adımı olarak kullanılır, ikincisi ise bölümlenme için belirli görüntü yapılarını geliştirmek veya bastırmak için yoğunlukla bir ön işleme adımı olarak kullanılır [30].

1.4.4. Bölge Birikimi

Hücre segmentasyonuna alternatif bir yaklaşım, görüntüdeki seçilen çekirdek noktalarından başlamak ve etiketli bölgeler oluşturmak için yinelemeli olarak bağlantılı noktalar eklemektir. Bu fikrin en basit uygulaması, bağlı noktaların her mahalle katmanı için çalışan ve doğrudan görüntüye uygulandığında, yoğunluk eşiklemesinde olduğu gibi benzer bir görüntü modelini varsayan (ve bundan muzdarip olan) sıradan bölge büyümesidir. Hiyerarşik bölme ve birleştirme şemaları, çözünürlük katmanı başına işleyen ve bazı tekdüzelik koşulu kullanan da ara sıra kullanılmıştır. Diğer bir örnek, matematiksel morfolojiden ana segmentasyon yaklaşımı olan ve yoğunluk katmanı başına çalışan ve genellikle kenarlarda havza çizgilerinin olması arzu edildiği için kenarı geliştirilmiş bir görüntü (gradyan büyüklüğü) gerektiren havza dönüşümü. Açık farkla en popüler bölge biriktirme yaklaşımı olmasına rağmen, su havzası dönüşümü aşırı bölümlenme üretmekle meşhurdur ve genellikle daha fazla işlem gerektirir [30].

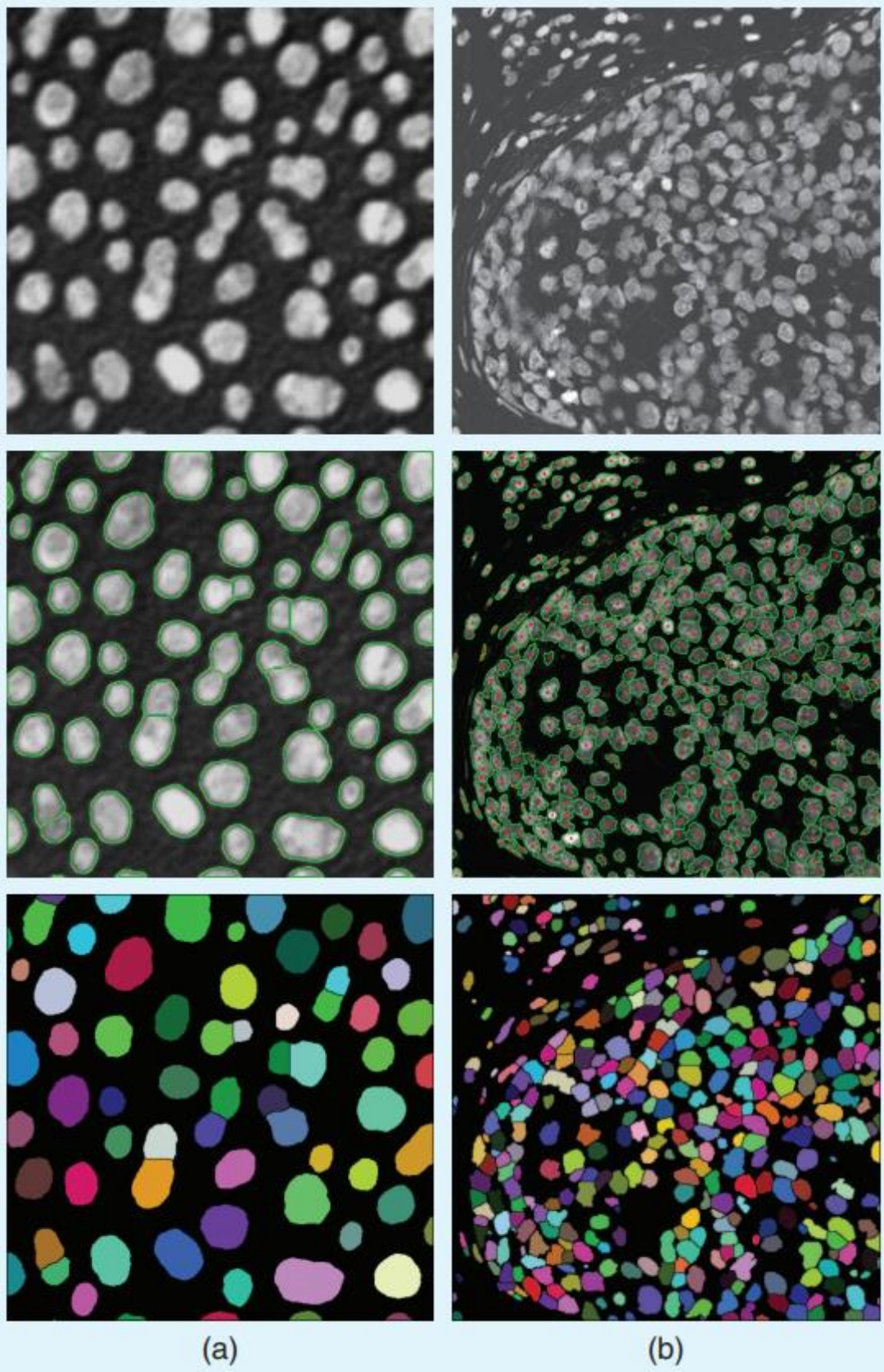
1.4.5. Deforme Edilebilir Model Uygulama

Burada bahsedilen hücre bölümlenme yaklaşımlarının son sınıfı, deforme olabilen bir modeli görüntü verilerine uyduran prosedürlerden oluşur. Deforme edilebilir modeller, açıkça, bir parametrik kontur (2-D) veya yüzey (3-D) olarak veya örtük olarak, boyutsallığa (nD) bölünecek görüntüden bir yüksek olan bir fonksiyonun sıfır seviyesi olarak formüle edilebilir. Seviye kümeleri, hücre bölünmesi gibi topolojik değişiklikleri doğal olarak ele alma avantajına sahiptir ve bu nedenle hücre izleme için caziptir. İlk, kaba bir bölümlenme ile başlatılan deforme edilebilir bir model, tipik olarak görüntü tabanlı ve şekil tabanlı terimlerden oluşan önceden tanımlanmış bir enerji işlevini en aza indirmek için yinelemeli olarak geliştirilir; ikincisi, sonuçları kısıtlamak için önceki bilgilerin dahil edilmesine izin verir. Hatalı segmentasyonu önlemek için enerji terimlerinin dikkatlice tasarlanması gerekir [31].

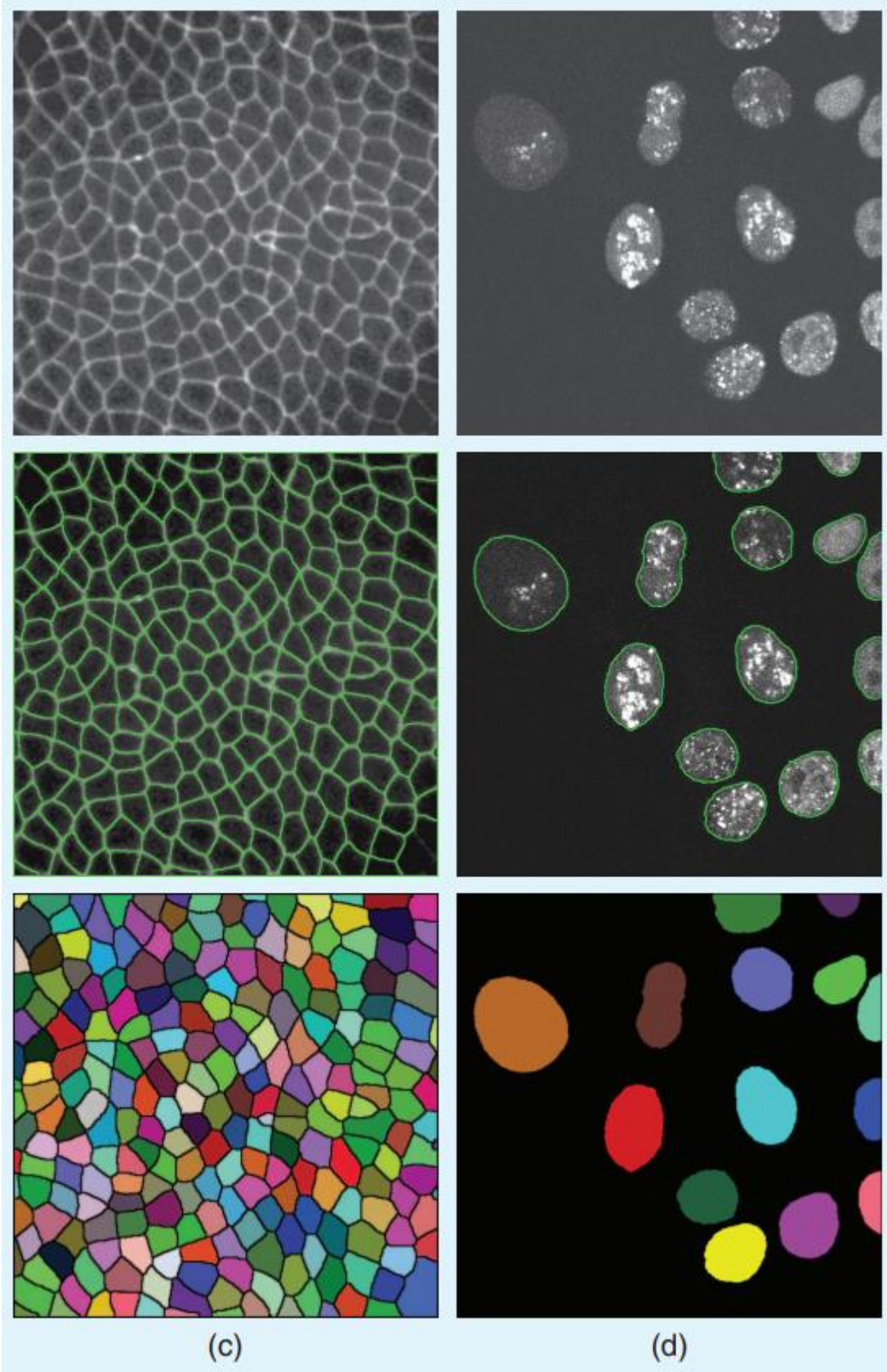
Şekil 1.7’de ve Şekil 1.8’de tartışılan yaklaşımlara dayalı olarak hücre görüntüsü bölümlenme örnekleri gösterilmiştir. Sütunlar sırasıyla giriş görüntülerini, otomatik olarak bulunan hücre dış hatlarını (yeşil üst üste bindirilmiş) ve karşılık gelen etiketli hücre bölgelerini (rastgele renkler) göstermektedir.

(a) Oldukça iyi ayrılmış ve arka plandan açıkça daha parlak olan hücreler, eşikleme kullanılarak kolayca bölümlere ayrılabilir. Birkaç kümelennmiş hücreyi bölmek için ikili nihai erozyon ve yeniden yapılandırma kullanıldı. (b) Daha yüksek hücre yoğunluklarına ve

yoğunluk varyasyonlarına sahip senaryolar, daha karmaşık yöntemler gerektirir. Burada kullanılan yöntem, grafik kesim tabanlı ikilileştirmeyi, Laplacian of Gauss tabanlı hücre algılamayı (kırmızı noktalara bakınız) ve işaretçi tabanlı kümelemeyi içerir. (c) Membran lekeli görüntüler, su havzası tabanlı bölümlenme için ideal olarak uygundur. Gri tonlu morfolojik ön filtreleme, hem arka plan tahmini (açma işlemi) hem de kusurlu şekilde boyanmış bölümleri doldurma (kapatma işlemi) için kullanılmıştır. (d) Hücre içi dinamik süreç çalışmaları, genellikle önemli yoğunluk varyasyonlarına (hem uzay hem de zamanda) sahip görüntülerle sonuçlanır ve sağlam hücre segmentasyonu ve izleme yöntemleri gerektirir. Burada kullanılan yöntem seviye setlerine dayanmaktadır [32].



Şekil 1.7 Örnek Ayrılmış Hücre Görüntüleri



Şekil 1.8 Örnek Ayrılmış Hücre Görüntüleri

1.5.Video Görüntü İşleme

Video akışlarında hareketli nesnelere algılanması ve bölümlere ayrılması, video gözetimi, insan izleme, trafik izleme ve videoların anlamsal ek açıklamaları dahil olmak üzere birçok bilgisayar görüntü uygulamasında bilgi çıkarma için gerekli bir işlemdir [33]. Gözetim sistemi, bir sahnede hedeflerin (insan, araç, vb.) Faaliyetlerini izlemek için video kameralar kullanır. Gerçek görüntülerle çalışabilen otomatik bir hareket segmentasyon algoritması elde etmek için çözülmesi gereken birkaç sorun vardır, özellikle önemli olanlar şunlardır: gürültü, eksik veri ve önsel bilgi eksikliği. Ana sorunlardan biri gürültünün varlığıdır. Bazı uygulamalar için gürültü seviyesi kritik hale gelebilir. Hareketli nesne algılamaya yönelik üç geleneksel yaklaşım vardır: arka plan çıkarma, zamansal farklılık ve optik akış [34].

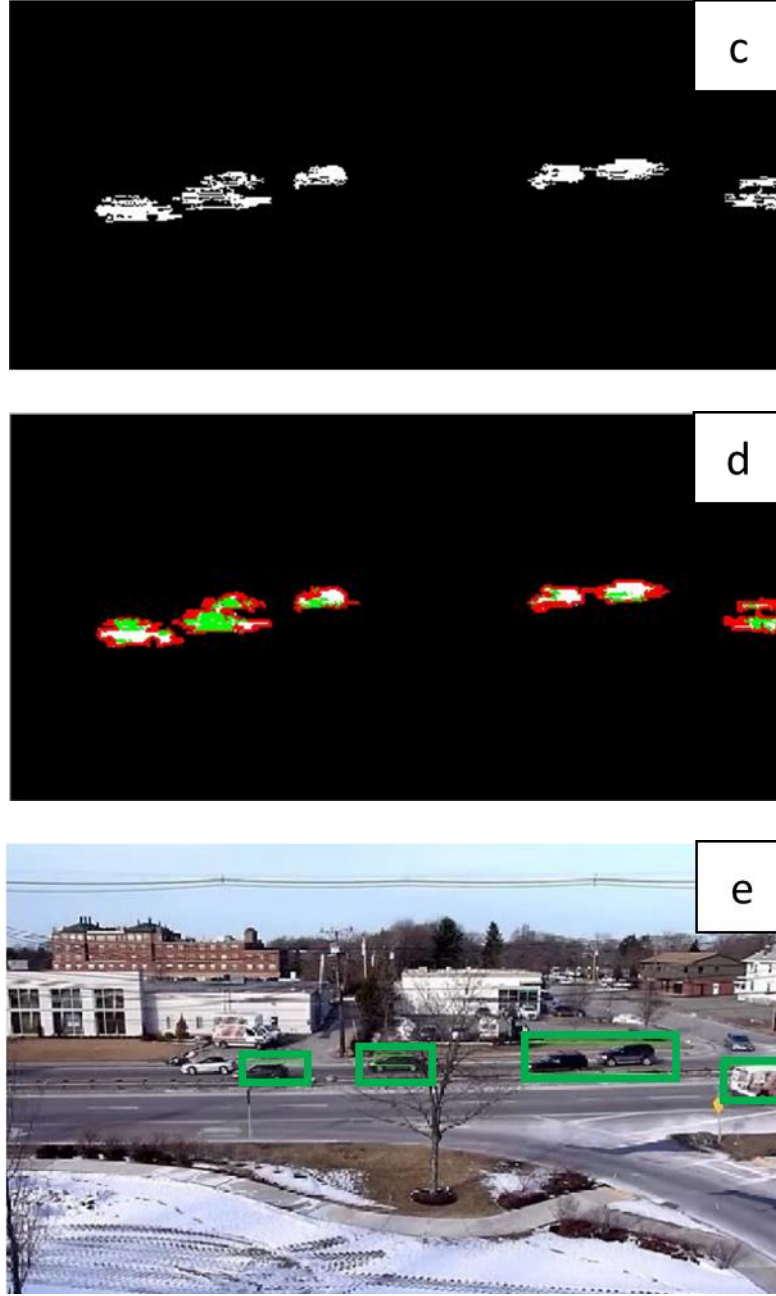
Arka plan çıkarma, video akışlarında yenilik tespiti için en popüler yöntemlerden biridir. Arka Plan Çıkarma, her kare için bir ön plan maskesi oluşturur. Bu adım, basitçe arka plan görüntüsünü geçerli çerçeveden çıkararak gerçekleştirilir. Ön plan nesnelere hariç tutulan arka plan görünümü mevcut olduğunda, ön plan nesnelere arka plan görüntüsü mevcut video karesiyle karşılaştırılarak elde edilebileceği açıktır. İki ana adıma odaklanır: Birincisi, temsili, gürültüye karşı dayanıklı ve yeni nesnelere duyarlı olan arka planın istatistiksel bir temsili oluşturmak; ikincisi, sahnede meydana gelen değişiklikleri temsil eden "ön plan" adlı başka bir istatistiksel model oluşturmak. Bu yaklaşımı her kareye uygulayarak, herhangi bir hareketli nesne etkin bir şekilde izlenebilir. Ayrıca, bir arka plan görüntüsü, giriş çerçevesini arka plan görüntüsü ile karşılaştırarak ve farklılıkları ön plan nesnelere işaretleyerek ön plan nesnelere belirlemek için zarif bir şekilde kullanılabilir. Bu teknik, genellikle arka plan çıkarma veya değişiklik algılama olarak bilinir [35-36].

Segmentasyon işleminde, görüntü / çerçeve, herhangi iki bitişik olanın benzer olmayacağı şekilde, üst üste binmeyen tekdüze bağlı bölgelere bölünür. Görüntülerin ve hareketli nesnelere karmaşıklığı ve çeşitliliği nedeniyle zor bir işittir. Etkileyen faktörler aydınlatma, kontrast ve çerçeveler arasında değişir. Bu bölümlenme algoritmalarının çoğu benzerliğe, farklılığa dayanmaktadır ve özellikle farklı kategorilere ayrılabilir: eşik, şablon eşleştirme, bölge büyütme, kenar algılama ve kümeleme. Bu yöntemlerin birçok uygulamada başarılı olduğu kanıtlanmıştır, ancak bunların hiçbiri genel olarak tüm görüntülere ve hareketli nesnelere uygulanabilir değildir ve farklı algoritmalar genellikle belirli bir uygulama için eşit derecede uygun değildir. Görüntü bölümlenme, bir görüntünün

İlgilenilen nesnelere bölünmesidir. Bu bölümlenme bazı öznel kriterlere göre yapılır ve genellikle görüntüdeki nesnelere ayırmayı amaçlar. İlgi Bölgesi (ROI) olarak bilinen nesne segmentasyon teknikleri, son zamanlarda görüntü sıkıştırma topluluğunda büyük ilgi gördü. ROI uygulamaları, tarama, dijital görüntü arşivi ve teletıp içerir. Görüntü hareketini analiz etmek için birçok bilgisayarla görme yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler, düzgün optik akış, bir kapatma sınırı boyunca kesintili optik akış ve hareket şeffaflığı dahil olmak üzere çok çeşitli doğal hareket kategorilerini ele almıştır. Bu çalışmada, video karelerindeki nesnelere algılanması ve segmentasyonu için bir algoritma sunulmuştur. Algoritma, arka plan çıkarma yöntemini kullanarak arka plandan nesne algılamaya ve eşikleme ve kenar algılamayı kullanarak segmentasyona dayanır. Farklı örnek videolar ile bu yöntemler kullanılarak performans değerlendirmesi bu çalışmada ele alınmıştır [37-39].

Arka plan çıkartma algoritmasının işleyişi ve nesne belirleme işlemi Şekil 1.9'da gösterilmiştir.





Şekil 1.9 (a) Birinci Kare (b) İkinci Kare (c) Arka Planın Sıyrılmış Görüntüsü (d) Nesnelerin Tespiti (e) Tespit Edilmiş Nesnelere [40]

1.6.Hücre Sayma Algoritması

İnsan kanı, kırmızı kan hücresi (RBC), beyaz kan hücresi (WBC) ve trombositler (PLT) gibi üç tür kan hücresinden oluşur. Kırmızı kan hücresi veya eritrositler, insan vücudundaki daha fazla sayıda kan hücresidir. Genellikle doktorlar, çeşitli hastalıkları teşhis etmek için ana bilgilerden biri kırmızı kan hücresi sayımıdır. Kırmızı kan hücresinin temel işlevi vücutta oksijen taşımaktır. Oksijen, her insanın hayatını sürdürebilmesi için önemlidir. Bu nedenle kırmızı kan hücreleri, insanlar için çok önemli kan hücreleridir. Amerikan

Kanser Derneği'ne (2009) göre, insan vücudundaki normal kırmızı kan hücresi, Tablo 1.1'de listelenen dört yaş kategorisine ayrılmıştır [41].

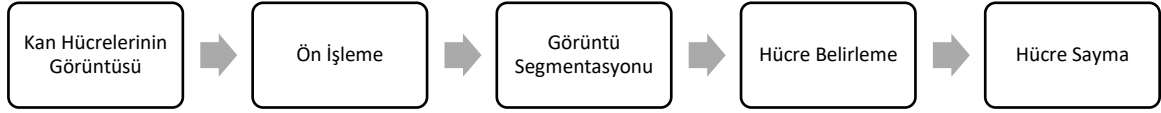
Tablo 1.1 Kırmızı Kan Hücrelerinin Normal Aralıkları

Yaş Kategorileri	Mikrolitredeki Hücre Sayısı (Milyon)
Yeni Doğan	4.8-7.2
Çocuk	3.8-5.5
Kadın	4.2-5.0
Erkek	4.6-6.0

Normalde kırmızı kan hücresi veya eritrositler, küçük disk şekilli hücrelerdir ve vücudun her iki tarafında içbükeydir. Kenarlar merkezden daha kalın ve yuvarlak olduğundan içbükey bir şekle benzerdir. Çekirdekleri yoktur. Hemoglobin olarak bilinen özel bir protein içerirler. Hemoglobin aynı zamanda kana kırmızı rengi verir. Hücrenin iç ve dış tabakası proteinden oluşur. Kan miktarı hemoglobin düzeyi kullanılarak ölçülür. Kanımızdaki hemoglobin seviyesi çeşitli hastalıklara neden olarak sağlığımızı etkilemektedir.

Düşük kırmızı kan hücresi sayısı, anemi, kan kaybı, lösemi ve yetersiz beslenme gibi çeşitli hastalıkların göstergesidir. Daha az sayıda kırmızı kan hücresi olan kişilerde, özellikle demir olmak üzere bazı besin maddelerinde eksiklik olabilir. Kronik böbrek hastalığı olan kişilerde eritropoetin üretimi bozulur ve bu da RBC üretiminin azalmasına neden olur [42].

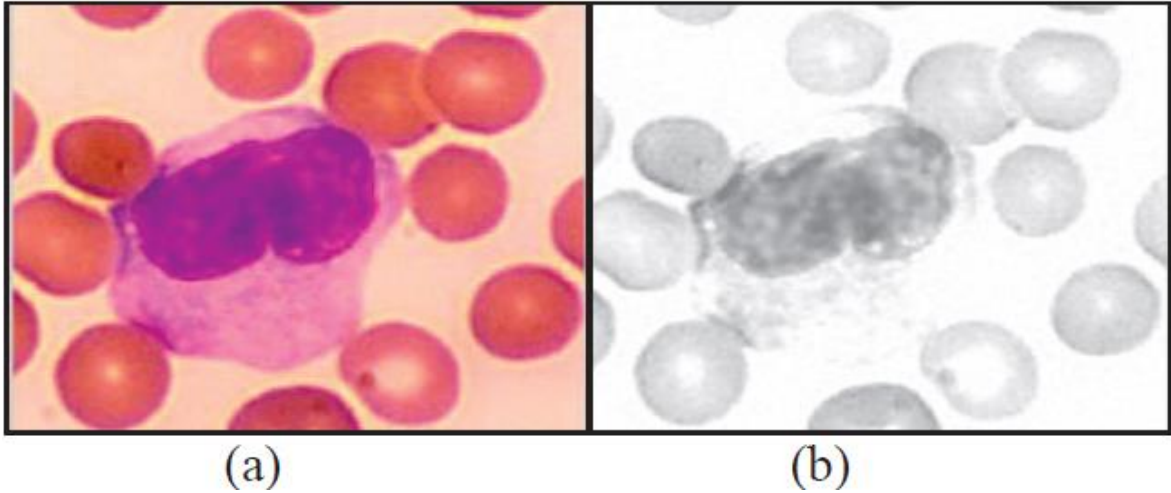
Kırmızı kan hücrelerini sayma sürecinde yer alan beş temel adım vardır. Bunlar girdi görüntüsü elde etme, yeniden işleme, bölümleme, özellik çıkarma, RBC sayımıdır. Ön işleme adımında, orijinal kan yayma görüntüsü doygunluk görüntüsüne dönüştürülür. Segmentasyon, histogram eşikleme ve morfolojik işlemlerle yapılır. Kırmızı kan hücresini, diğer hücreleri (WBC ve trombositler) ve arka planı ayırt etmek için morfolojik işlemler yoluyla bir sonraki özellik ekstraksiyonu gerçekleştirilir. Son adım, Hough Transform tekniğini kullanarak kan yayma görüntüsünden kırmızı kan hücresi sayısını bulmaktır. Şekil 1.10'da işlemin basamakları gösterilmiştir [43-48].



Şekil 1.10 İşlemin İş Akışı

1.6.1.Ön İşleme

Görüntü ön işleme, görüntüleri hesaplama işleminin bir sonraki adımı için uygun ayarlama tekniğidir. Bu aşamada, görüntüyü geliştirmek için basit görüntü işleme tekniğini kullanılmıştır. Önce giriş görüntüsü gri skala görüntüsüne dönüştürülmüştür ve bu gri skala görüntüsünden, doygunluk bileşenin analizi yapılmıştır, çünkü gri skala görüntüsü WBC ve trombositler gibi parlak nesnelere açıkça göstermektedir. Bu nedenle kırmızı kan hücrelerini ayırt etmek kolaydır. Şekil 1.11’de orijinal girdi görüntüsü ve gri skala görüntüsü gösterilmiştir [49-50].



Şekil 1.11 (a) Girdi Görüntüsü (b) Ön İşleme Sonucu [58]

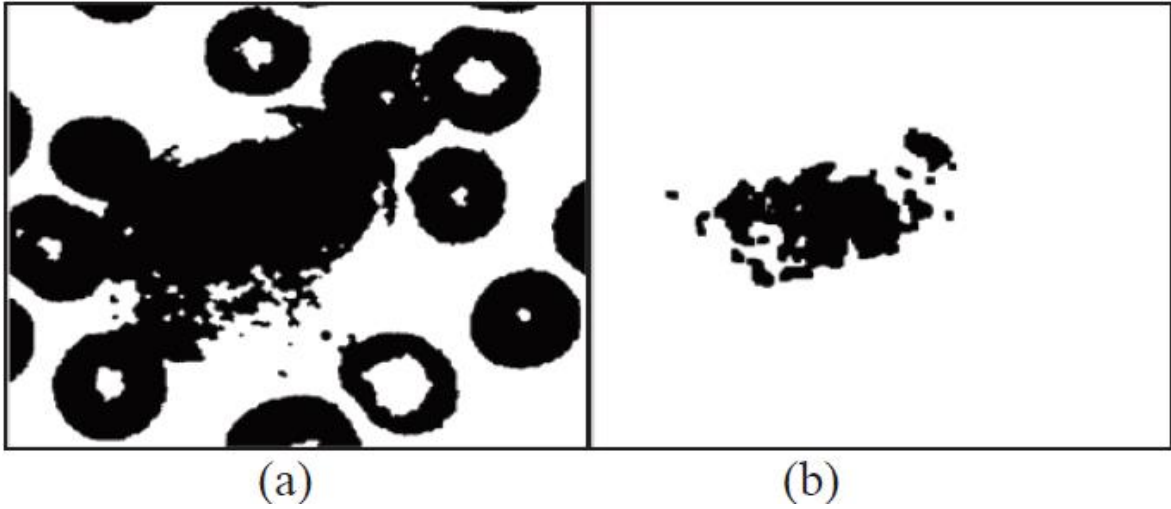
1.6.2.Görüntü Segmentasyonu

Bu aşamada, kırmızı kan hücresi ile diğer hücreler arasındaki yoğunluk farkı kavramı, diğer hücrelerden RBC'yi ayırmak için kullanılır. Ön işleme aşaması uygulandıktan sonra, görüntünün sonucu segmentasyon aşamasından geçirilir. Segmentasyon, histogram eşiklerine ve morfolojik işlemlere göre gerçekleştirilir. Matematiksel morfoloji, görüntüleri bölümlere ayırmak için önemli bir araçtır ve ayrıca bölge şekli, iskelet, sınırlar ve doku gibi bölge şeklini tanımlamak için kullanışlıdır. Bu segmentasyon aşamasındaki ilk adım, doygunluk görüntüsünün histogram görüntüsünden alt ve üst eşik değerini bulmaktır. Ardından doygunluk görüntüsünü bu eşik değerlerine göre iki ikili görüntüye bölünmüştür.

Eşik değeri, görüntüden herhangi bir T noktasını seçerek nesnelere arka plandan bölümlere ayırmak için kullanılan tekniklerden biridir. Görüntüdeki herhangi bir nokta (x, y) şeklinde ele alındığında, $f(x, y)$ fonksiyonu için, $f(x, y) > T$ olduğunda bir nesne noktası olarak adlandırılır, $f(x, y) \leq T$ ise de nokta arka plan noktası olarak adlandırılır [51-52].

$$g(x, y) \begin{cases} 1 & \text{eğer } f(x, y) > T \\ 0 & \text{eğer } f(x, y) \leq T \end{cases}$$

1 değerini alan pikseller nesne piksellerine karşılık gelir, 0 değerini aldıkları takdirde arka plan piksellerine denk gelmektedir. Morfolojik işlem, daha düşük ve daha yüksek piksel değerlerine sahip iki ikili görüntüye uygulanır. Şekil 1.12’de morfolojik işlemlerin sonucu gösterilmiştir.



Şekil 1.12 (a) Daha Düşük Eşik Değeri ile Alınan Görüntü (b) Daha Yüksek Eşik Değeri ile Alınan Görüntü [58]

1.6.3. Hücre Belirleme

Kırmızı kan hücrelerini diğer hücrelerden ve arka plandan çıkarmak için bu aşamada morfolojik işlemler, mantıksal işlemler ve Hough Transform tekniği kullanılır. Morfolojik ve XOR işlemi iki ikili görüntüye uygulanmıştır ve sonucu Şekil 1.13’te gösterilmiştir. Bu işlemden sonra kırmızı kan hücrelerini saymak için bu görüntüye Hough Transform uygulanmıştır.

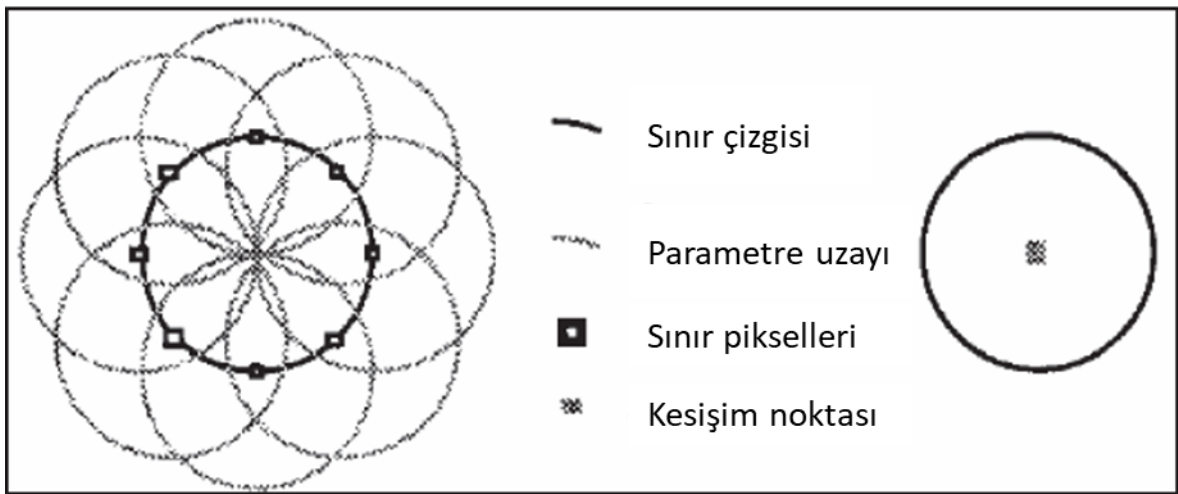


Şekil 1.13 Morfolojik Filtreleme ve XOR İşlemleri Sonrası Görüntü [58]

XOR işleminden sonra görüntü yumuşatılacak ve ardından görüntüye Circular Hough Transform uygulanacaktır. Hough Transform (HT), görüntülerdeki parametrik eğrilerin saptanması için çok güçlü bir araç olarak kabul edilmiştir. Görüntü kenar noktalarını uygun şekilde tanımlanmış bir parametre alanında manifoldlara eşleyen bir oylama işlemi uygular. Circular (Dairesel) Hough Transform (CHT), HT'nin değiştirilmiş versiyonlarından biridir. CHT, bir görüntü içinde dairesel desenler bulmaya odaklanır. CHT, bir merkez noktası (x_0, y_0) ve bir yarıçap (r) ile karakterize edilen bir çemberi bulmak için tasarlanmıştır. Bir daire modeli aşağıdaki denklem ile tanımlanır [53-54].

$$(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 = r^2$$

Burada x_0 ve y_0 , merkezin koordinatlarıdır ve r , dairenin yarıçapıdır. Geleneksel CHT, oylama prosedürüne göre çalışmaktadır. Şekil 1.14'te çalışma protokolü gösterilmiştir.



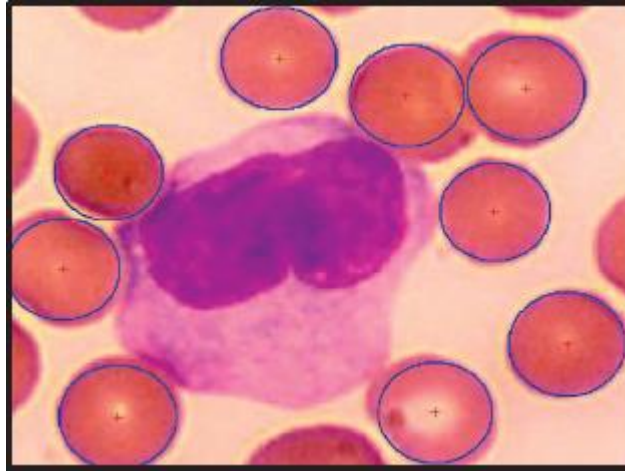
Şekil 1.14 Oylama Prosedürü [58]

1.6.4.Hücre Sayma

Şekil 1.12'de elde edilen sonuçta kırmızı kan hücreleri siyah renkte ve arka planda beyaz olarak gösterilmiştir. Filtre kullanılarak bu görüntüden parazit giderilir ve ardından CHT tekniği için girdi görüntüsü olarak kullanılır. Bu işlem için kırmızı kan hücrelerinin merkez noktasına ihtiyaç vardır. Her çemberin merkez noktasını tahmin etmek için çemberin yarıçapına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, kullanılan programlama dilindeki gerekli komutu kullanarak görüntüdeki minimum ve maksimum daire yarıçapı bulunur. Daha sonra her iki yarıçap da bilindiğinde CHT uygulanır. Bu işlem aşağıdaki denklem ile ifade edilebilir [55-60].

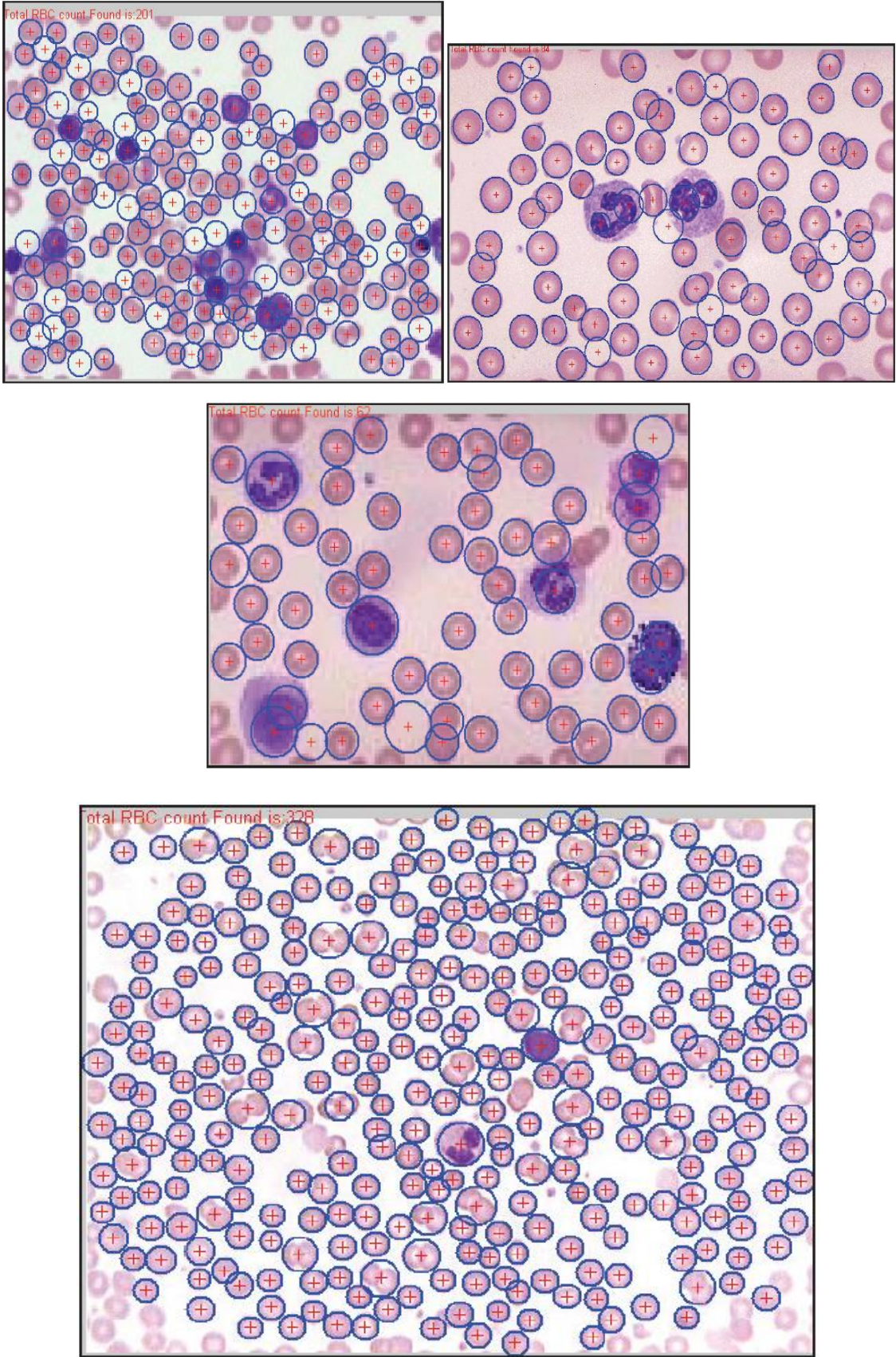
$$r \in (\max r; \min r) \begin{cases} x_0 = r \sin \theta \\ y_0 = r \cos \theta \end{cases}$$

Bu yöntemle aşağıdaki Şekil 1.15'te gösterildiği gibi hücre belirleme işlemi yapılabilir ve belirlenen hücreler sayılabilir.



Şekil 1.15 CHT Yöntemi ile Belirlenen Hücreler [58]

Aşağıdaki Şekil 1.16'da ise kullanılan ve denenen test görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 1.16 Test Görüntüleri [58]

1.7.Gölge Görüntüleme Sistemi ile Mikrokanallarda Kan Hücresi Sayımı

Bu çalışmada gölge görüntüleme sisteminin prensipleri kullanılarak, PMMA, DSA ve cam slayt ile üretilen mikrokanallar üzerinde kan hücresi sayımı gerçekleştirilmiştir.

Kurulan sistemin elemanları;

- LED ışık
- LED sürücüsü
- Kamera
- PMMA gölge görüntüleme sistemi
- Enjeksiyon pompası
- Mikroçip
- Enjektör
- Enjektör iğnesi
- Enjeksiyon borusundan oluşmaktadır.

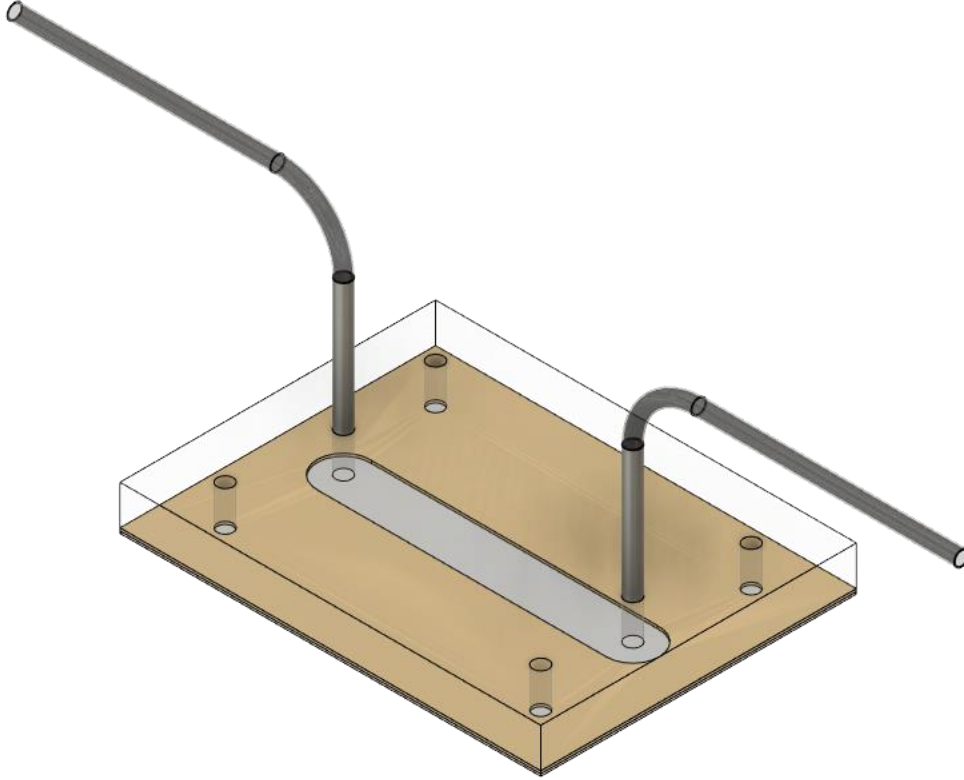
Çalışmada öncelikle gölge görüntüleme sistemi kurulmuş ve test işlemleri gerçekleştirilmiştir. Test sürecinde kamera ile boş görüntüler ve kamera çipinin üzerine su damlatılmış cam slaytlar ile deneme görüntüleri alınmıştır. Görüntüler elde edildikten sonra mikroçip yapım sürecine geçilmiştir. Bu aşamada öncelikle PMMA ve DSA için AutoCAD programı ile lazer kesiciye gönderilmek üzere çizim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çizim işlemlerinin ardından kesilen PMMA ve DSA malzemeler laboratuvar ortamında temizlenerek, çeker ocak içerisinde birleştirilmiştir. Temizleme ve birleştirme aşamalarının her birinde hem PMMA malzemeler hem de cam slaytlar gölge görüntüleme sistemini altında incelenmiştir ve temizlendikleri teyit edilmiştir. Birleştirme işleminin ardından da örnekten alınan kan ile görüntüler alınmıştır ve algoritma çalışmaları yapılmıştır. Kan hücrelerinin şekil olarak tam daireye benzemesi sebebiyle algoritmada Hough Circle Transform yöntemi kullanılmıştır ve hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde tasarlanan ve kullanılan malzemeler ve yöntemler açıklanmıştır.

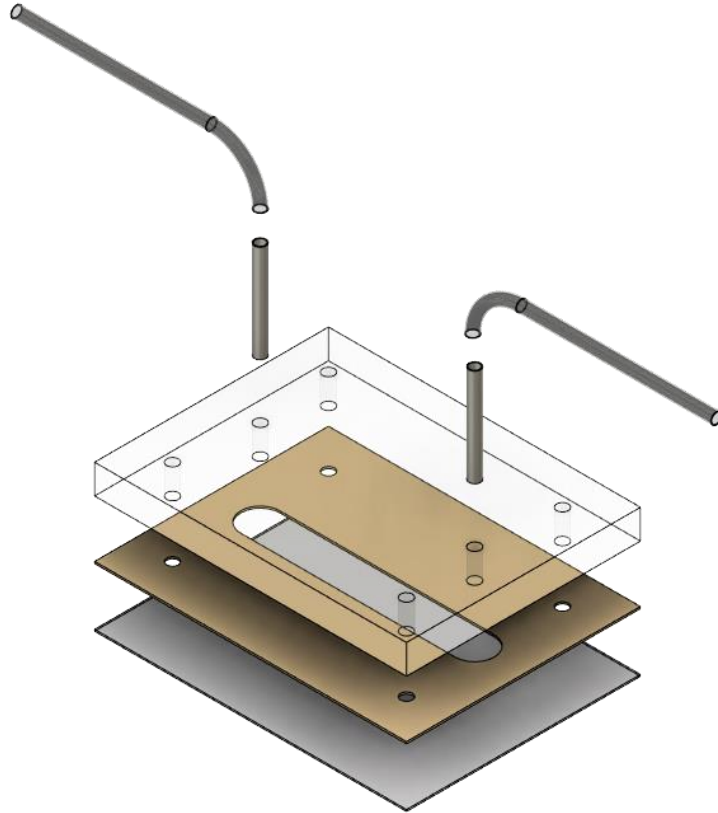
2.1.Mikroakışkan Çip Tasarımı

Mikroakışkan çipler kan hücrelerinin sayımı için geliştirilmişlerdir. Sayılan hücreler numaralandırılabilir. Hücre sayımı çeşitli yöntemlerle yapılabilir. Bu çipler kalıp baskı yöntemleri kullanılmadan, lazer kesici vasıtası ile üretilebilir. Çip yapısı genel olarak beş katmandan oluşmaktadır. Bunlar cam, çift taraflı yapıştırıcı, PMMA, enjektör uçları ve pvc hortumdur. En alt katmanda cam yüzey bulunmaktadır, bir üst katmanda hem kanalı oluşturan hem de cam yüzey ile PMMA'yi birleştiren çift taraflı yapıştırıcı bulunmaktadır, çift taraflı yapıştırıcının da üzerinde bulunan PMMA, örnek girişinin ve çıkışının yapılacağı bölgedir, enjektör uçları PMMA yüzeyin üzerinde bulunup, pvc hortumlar ile örneği kanalın içine taşımak için kullanılmıştır. Kanala örnek pompalanması, enjeksiyon pompası vasıtası ile gerçekleşmektedir. Tasarımın basit bir çizimi Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Mikroçipin Genel Görünümü

Katmanların ayrı ayrı çizimleri ise Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Katmanların Ayrı Ayrı Gösterimi (Aşağıdan yukarıya: Cam, çift taraflı yapıştırıcı, PMMA, enjektör uçları, PVC hortum)

2.1.1.Cam Yüzey

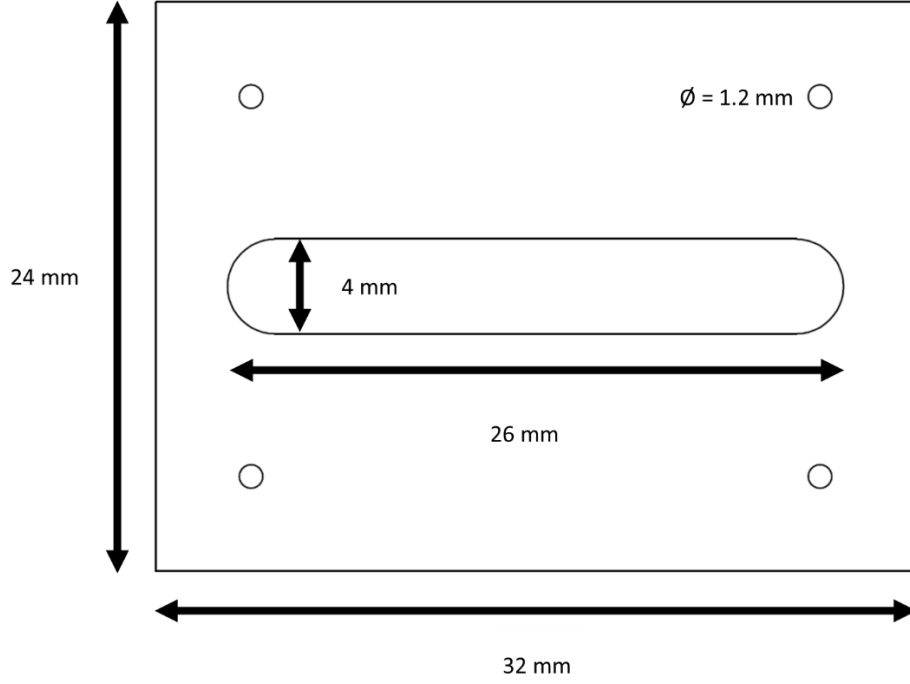
Cam yüzey, sıradan örnek camıdır. ISOLAB markasının ürünüdür. Boyutları ise $24 \text{ mm} \times 32 \text{ mm} \times 0.15 \text{ mm}$ ’ dir. Şekil 2.3’te cam yüzey gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Cam Yüzey

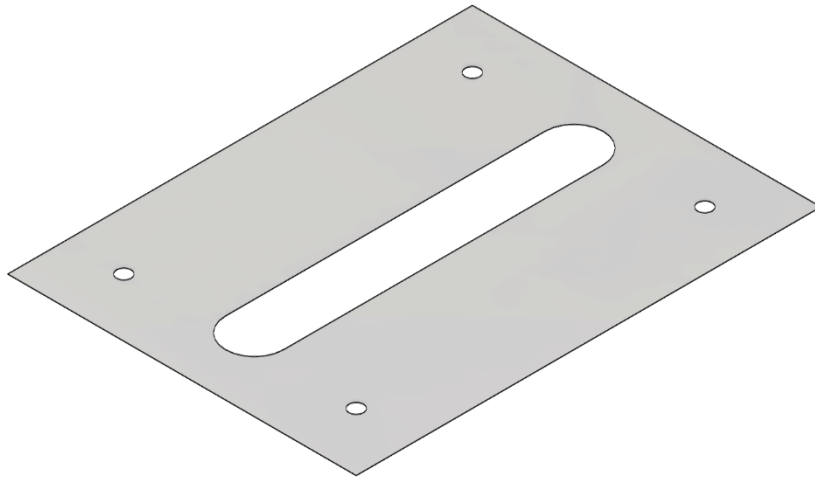
2.1.2.Kanal Katmanı

Kanal katmanı, örnek için bir kanal vazifesi görmektedir. Bu katman 3M markasının 8212CL isimli DSA malzemesi ile oluşturulmuştur. Kanal katmanında, bir adet kanal boşluğu ve dört adet kılavuz deliği bulunmaktadır. Kanal lazer kesici ile kesilmiştir. Yüksekliği $100\mu\text{m}$ 'dir. Şekil 2.4'te kanal katmanının CAD çizim gösterilmiştir.



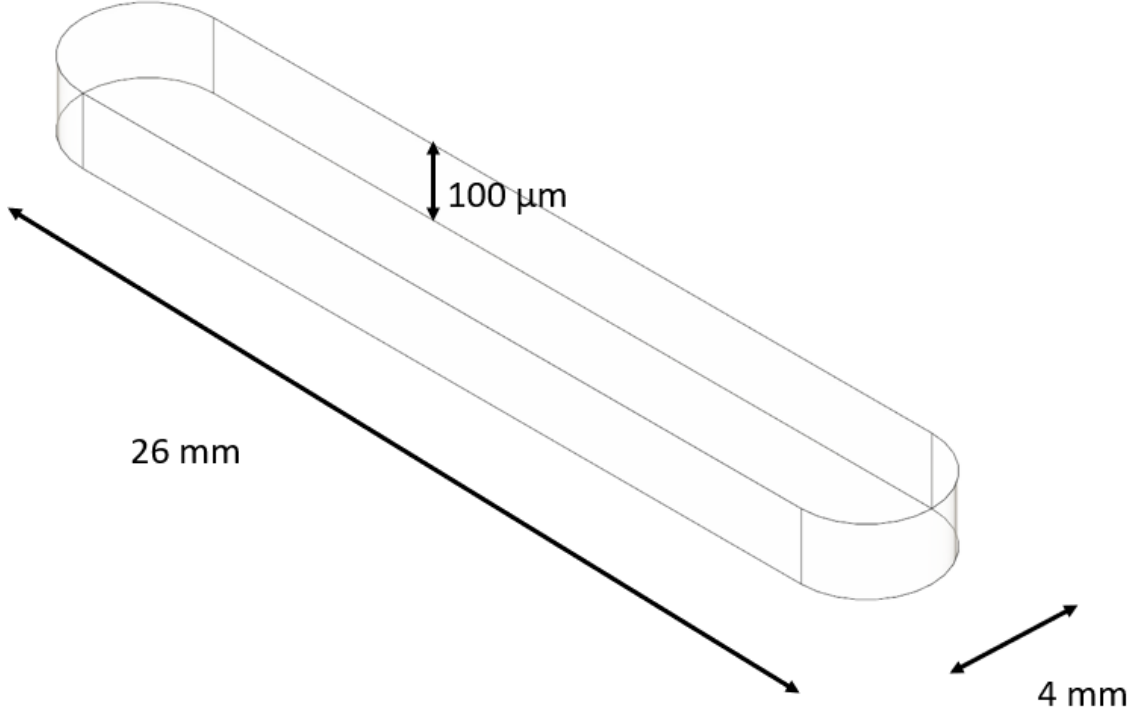
Şekil 2.4 Kanal Katmanının CAD Çizimi

Şekil 2.5'te ise kanal katmanının üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Kanal Katmanının Üç Boyutlu Çizimi

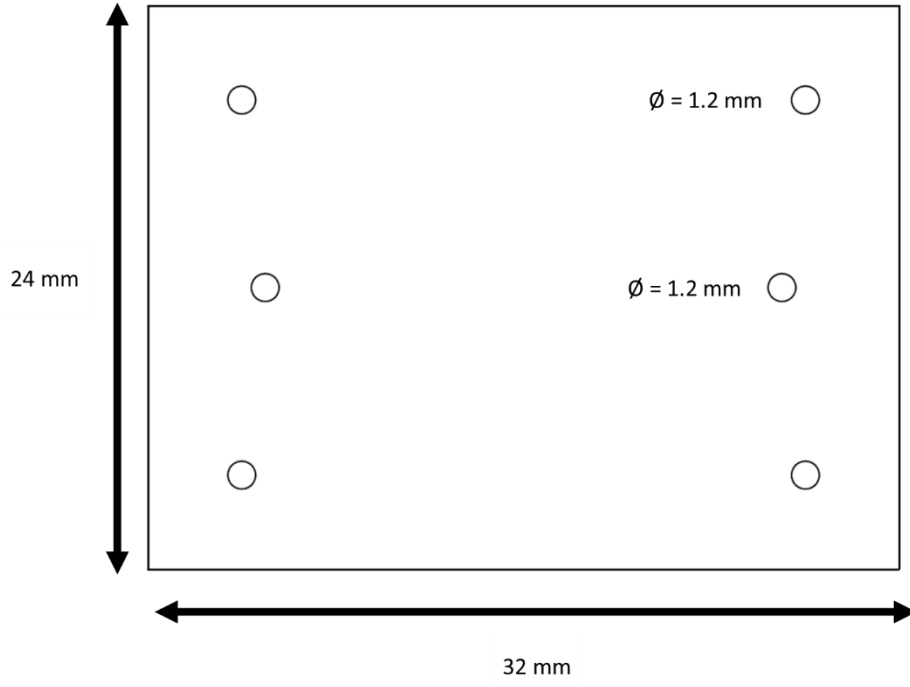
Şekil 2.6'da ise kanalın üç boyutlu yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Kanalın Üç Boyutlu Yapısı

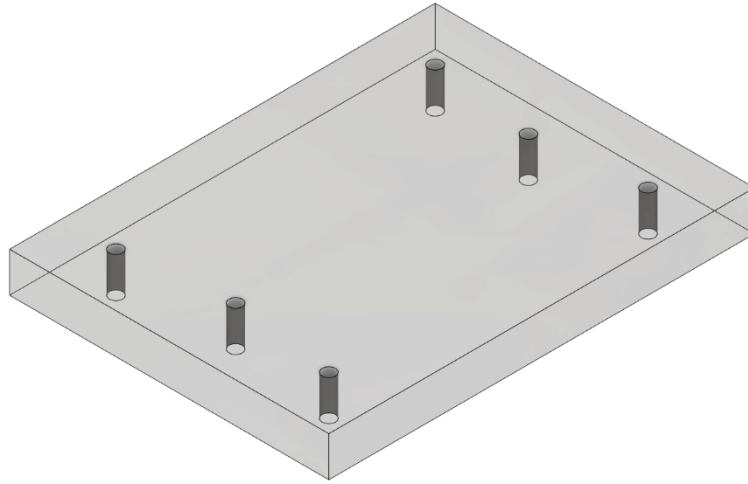
2.1.3.Giriş Çıkış Katmanı

Giriş çıkış katmanı, örnek giriş ve çıkışının yapıldığı katmandır. Lazer kesici ile kesilmiştir. Bu katmanda PMMA malzeme kullanılmıştır. PMMA malzeme akrilik cam olarak da bilinmektedir ve lazer kesici ile kolay bir şekilde işlenebilmektedir. Bu katmanın kalınlığı 3 mm'dir ve Cast Acrylic markasının ürünüdür. Katmandaki delik çapları 1.2 mm'dir ancak yüksek sıcaklıkta PMMA eridiği için çaplar 1.25 mm olmuşlardır. Şekil 2.7'de bu katmanın CAD çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Giriş Çıkış Katmanının CAD Çizimi

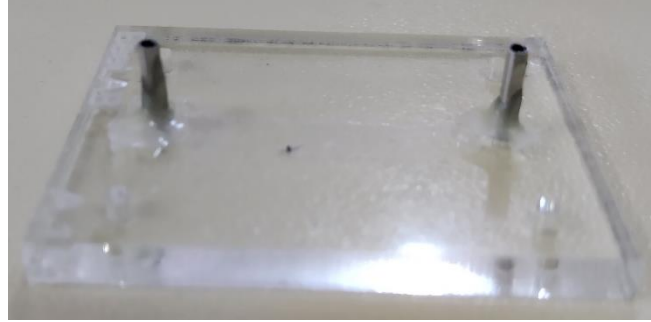
Şekil 2.8’de ise giriş çıkış katmanının üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Giriş Çıkış Katmanının Üç Boyutlu Çizimi

2.1.4.Enjektör Uçları

Çip sisteminde örnek giriş çıkışı sürekli olacağı için, örnek giriş ve çıkış bölümlerine enjektör uçları iliştirilmiştir. Bu sayede örneğin giriş ve çıkışı kolaylaştırılmıştır. Enjektör uçları Beybi markasını 18G pembe uçlu, 1.25 mm çaplı enjektörleri düzleştirilerek elde edilmiştir. Şekil 2.9’da düzleştirilmiş enjektör uçları gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Enjektör Uçlarının Çipe Yapıştırılmış Görüntüsü

2.1.5.PVC Hortum

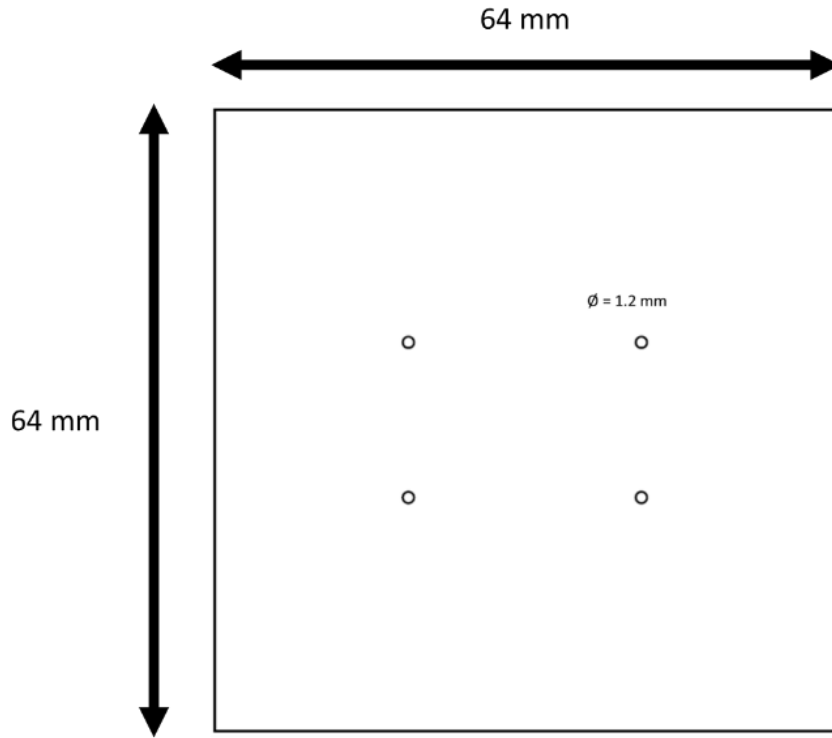
Enjeksiyon pompası ile basılan örneğin önce enjektör ucuna ardından da çipin içerisine ulaşmasını sağlamak ve örneği çipten tahliye etmek için şeffaf PVC hortum kullanılmıştır. PVC hortum Orlab markasının 1.8 mm dış çaplı ve 1 mm iç çaplı ürünüdür. Şekil 2.10’da PVC hortum gösterilmiştir.



Şekil 2.10 PVC Hortum

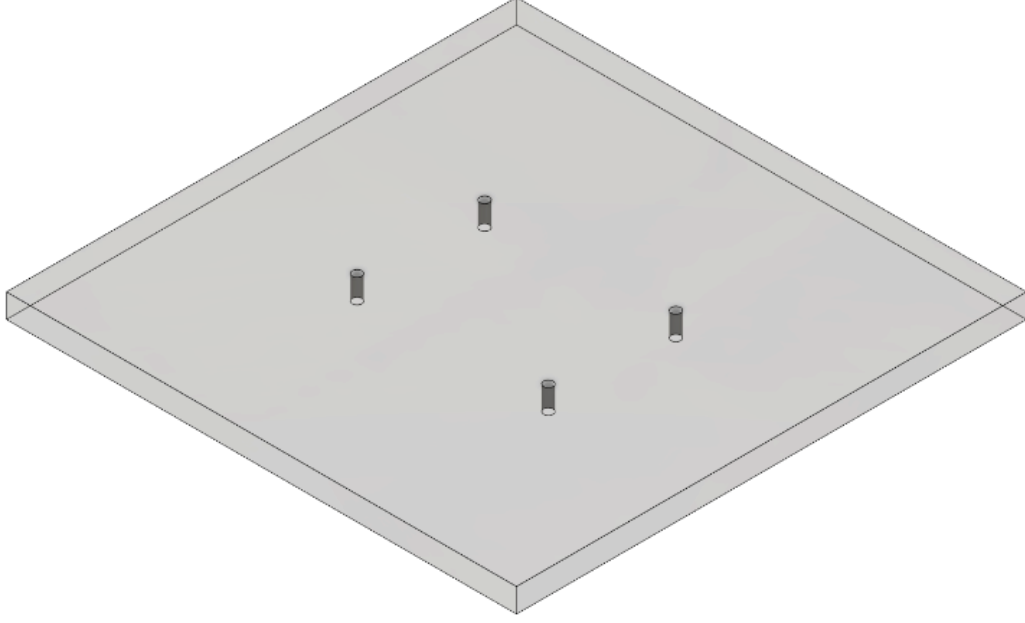
2.1.6. Katmanların ve Parçaların Birleştirilmesi

İlk önce PMMA ve DSA katmanının birleştirilmesi için bir kılavuz çizilmiştir. Bu kılavuz PMMA ve DSA katmanlarının köşelerinde bulunan kılavuz deliklerine uygun şekilde tasarlanmıştır. Şekil 2.11’de kılavuzun CAD çizimi gösterilmiştir.



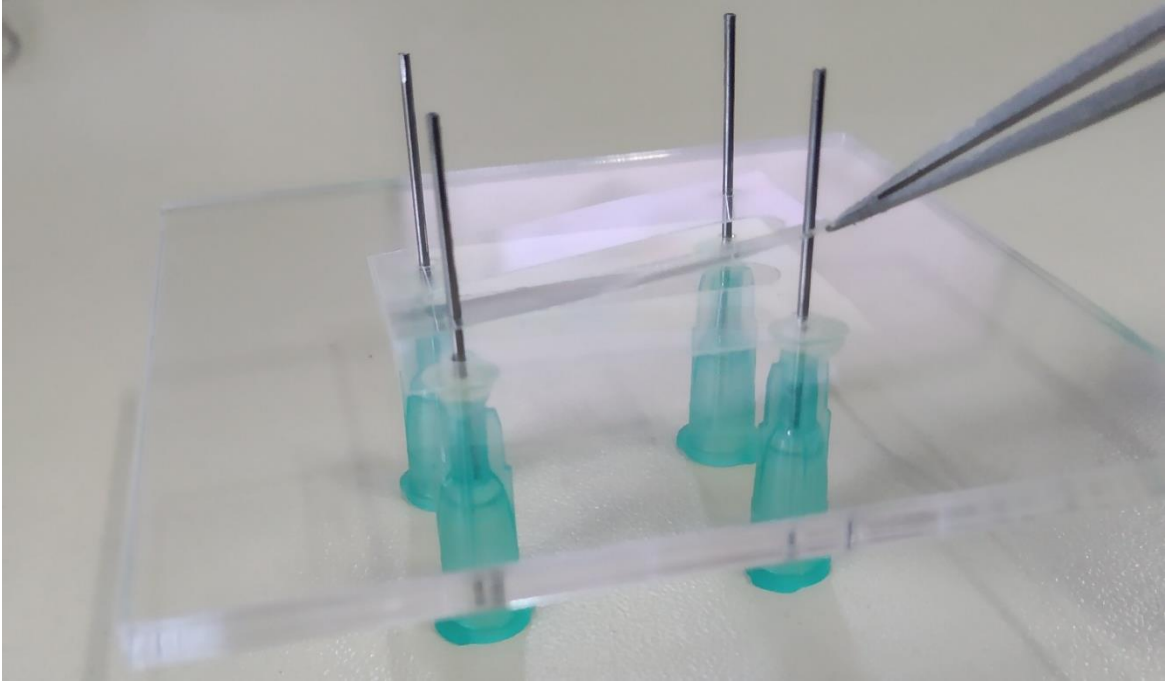
Şekil 2.11 PMMA ve DSA Katmanların Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun CAD Çizimi

Şekil 2.12’de kılavuzun üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.12 PMMA ve DSA Katmanların Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun Üç Boyutlu Çizimi

Kılavuza ilk önce DSA katmanı yerleştirilmiştir, ardından bu katmanın yapışkan yüzeyini koruyan tabakası çıkarılmıştır ve üzerine PMMA katman yerleştirilmiştir. Böylece PMMA ve DSA katmanları birleştirilmiştir. Şekil 2.13'te DSA katmanının bir yüzeyinin açılması gösterilmiştir, Şekil 2.14'te ise bu katmanların birleştirilmiş hali gösterilmiştir.

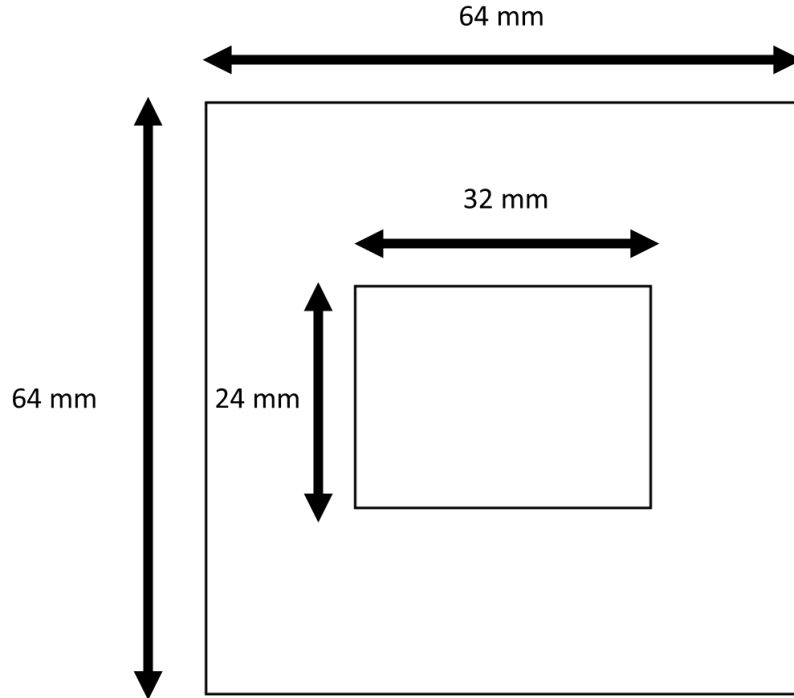


Şekil 2.13 DSA Katmanının Bir Yüzeyinin Açılması



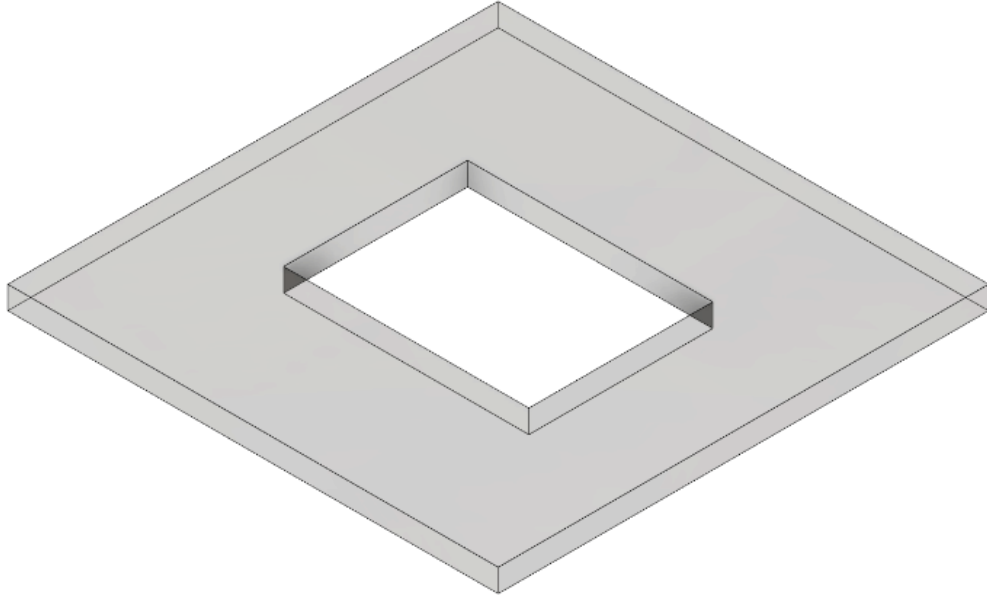
Şekil 2.14 DSA ve PMMA Katmanlarının Birleştirilmiş Görünümü

Daha sonra DSA in diğer yüzü ile cam yüzeyin birleştirilmesi için başka bir kılavuz çizilmiştir. Bu kılavuz cam yüzeyin ve PMMA in boyutlarına uygun şekilde tasarlanmıştır. Şekil 2.15'te kılavuzun CAD çizimi ve üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



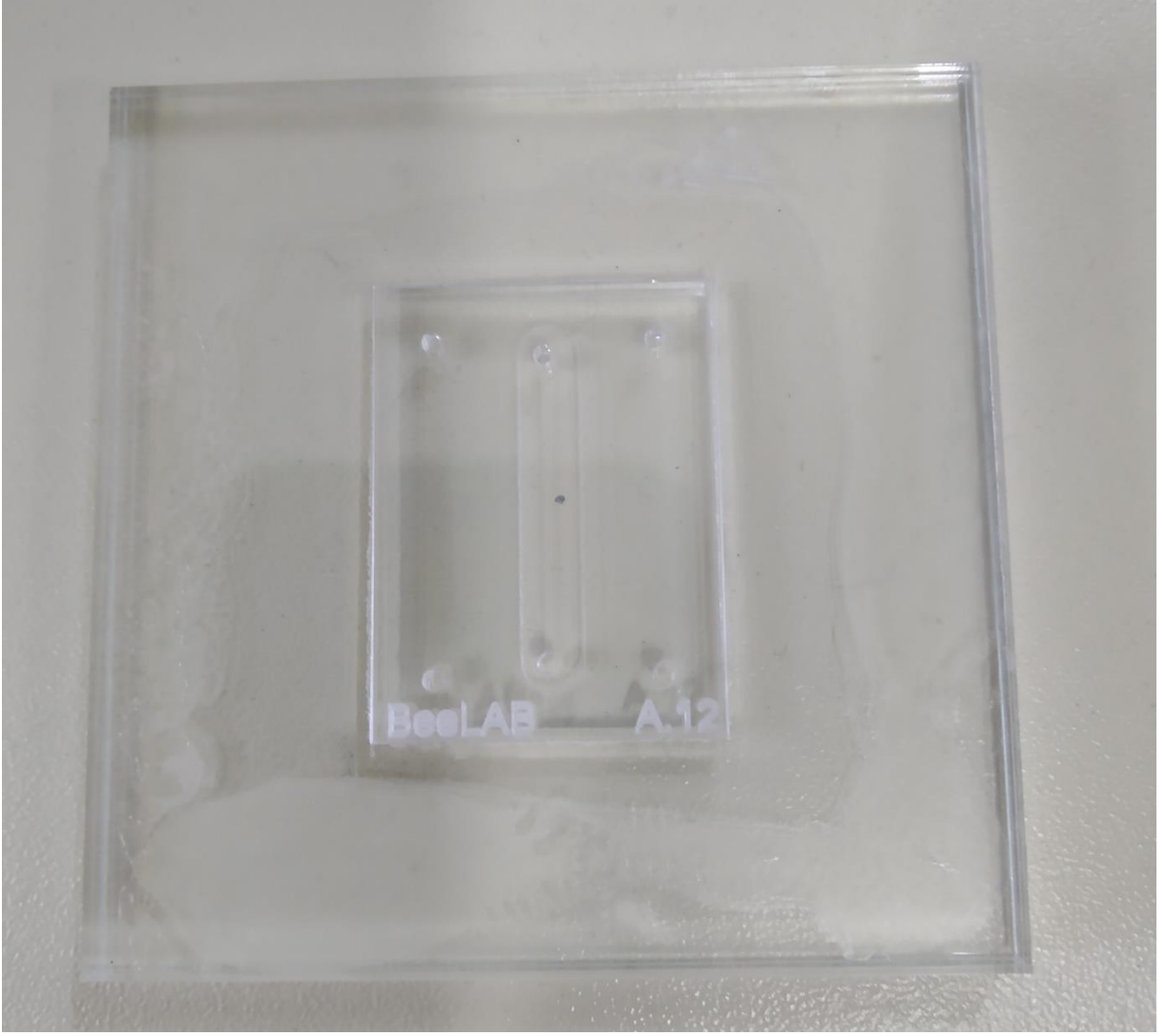
Şekil 2.15 Daha Öncesinde Birleştirilen PMMA ve DSA Katmanların Cam Yüzey ile Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun CAD Çizimi

Şekil 2.16'da kılavuzun üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.16 Daha Öncesinde Birleştirilen PMMA ve DSA Katmanların Cam Yüzey ile Birleştirilmesi İçin Kullanılacak Kılavuzun Üç Boyutlu Çizimi

Kılavuza önce cam yüzey yerleştirilmiştir. Ardından DSA in ikinci yapışkan yüzeyinin koruyucu tabakası çıkarılarak kılavuza yerleştirilmiştir. Böylece PMMA, DSA ve cam yüzey katmanları birleştirilmiştir. Şekil 2.17'de bu katmanların birleştirilmiş hali gösterilmiştir.



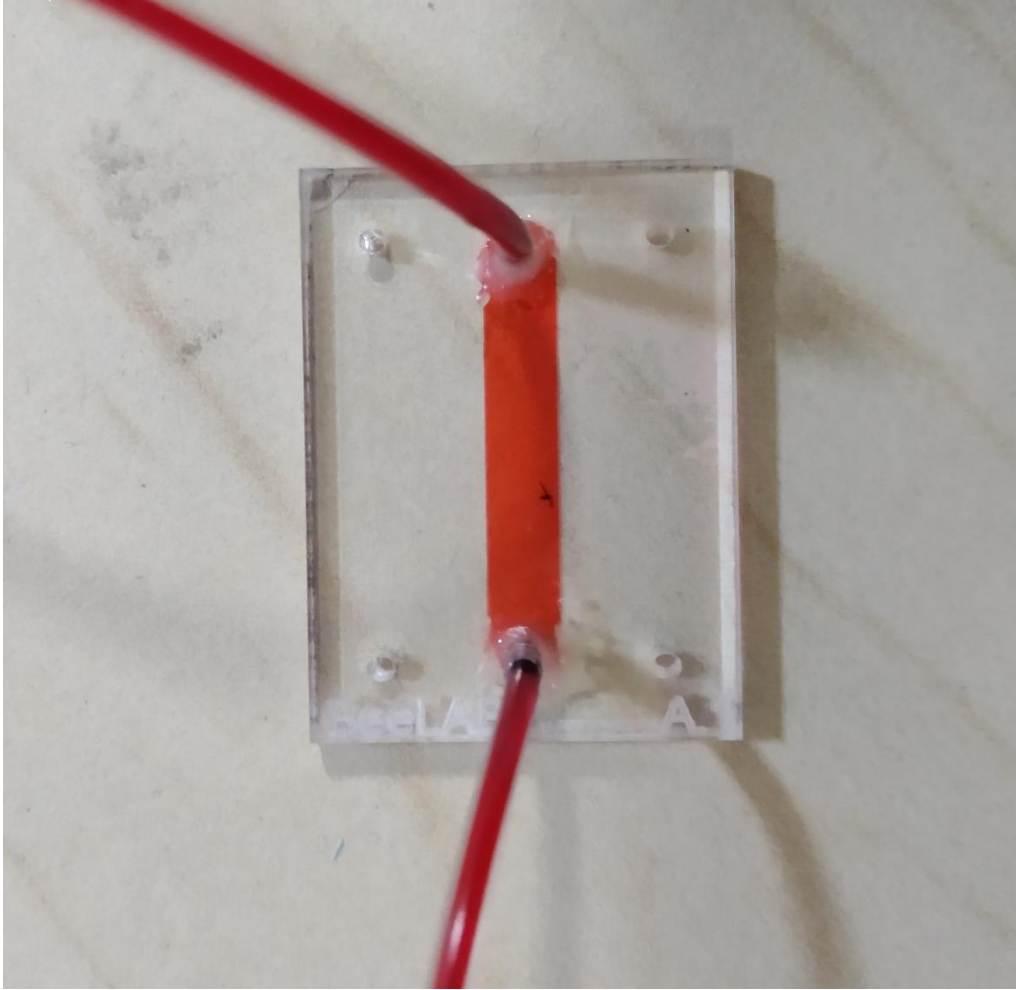
Şekil 2.17 PMMA, DSA ve Cam Yüzeylerin Birleştirilmiş Görünümü

Son olarak, daha öncesinde kesilmiş ve PVC hortum ile birleştirilmiş olan enjektör uçları epoksi reçine ile çipin PMMA yüzündeki giriş çıkış deliklerine yapıştırılmıştır. Şekil 2.18'de tüm parçaların birleştirilmiş hali gösterilmiştir.



Şekil 2.18 Tüm Parçaların Birleştirilmiş Görünümü

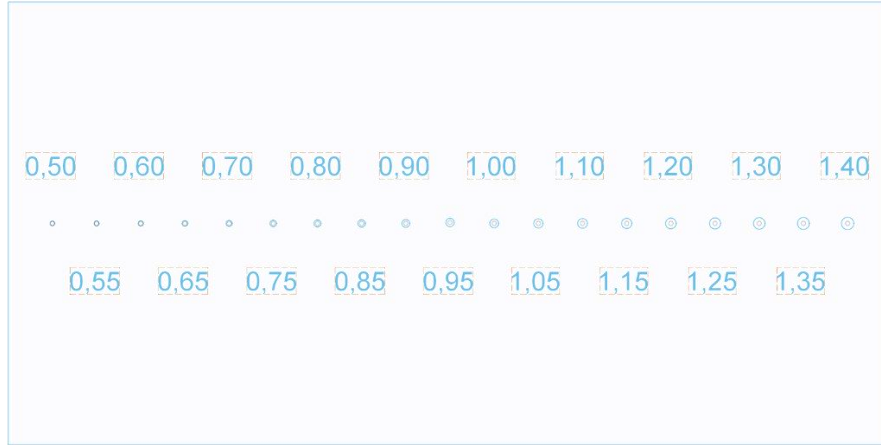
Şekil 2.19'da ise kanal içerisine gıda boyası enjekte edilmiş görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 2.19 Kanal İçerisine Gıda Boyası Enjekte Edilmiş Görünüm

2.1.7.Malzemelerin Kalibrasyonu

Yüksek sıcaklıkta PMMA ve DSA malzemeler erimekteyirler. Lazer kesici ile de erime sıcaklıkları aşıldığı için bu malzemelerin erime payları bulunmaktadır. Bu sebeple de çizimler yapılırken bu erime payları göz önüne alınmak zorundadır. Tüm bunlardan dolayı malzemelerin kalibrasyonu gerekmektedir. Bunun için Şekil 2.20’de gösterilen kalibrasyon delikleri çizilmiştir.



Şekil 2.20 Kalibrasyon İçin Yapılan Çizim

2.1.8.Malzeme Temizlik Protokolleri

DSA, temiz bir şekilde lazer kesim cihazından geçirilerek hazır olarak elde edilmiştir. Çip yapımına başlamadan önce PMMA ve cam slaytların temizlenmesi gerekmektedir.

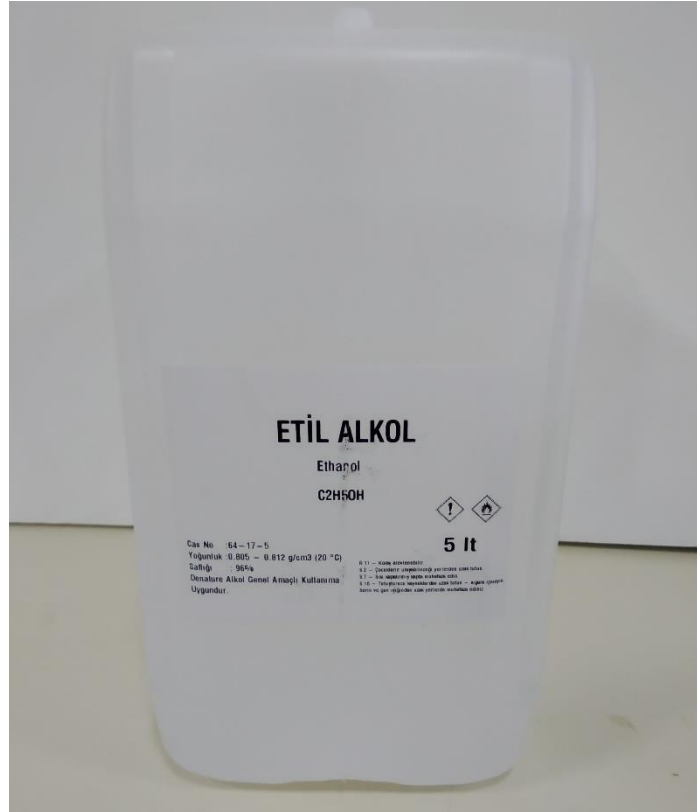
PMMA Temizliği:

- PMMA’lerin teker teker yerleştirilebileceği bir cam kap olan şale içerisine 4 adet PMMA dizilir.
- %70’lik etil alkol çözeltisi PMMA’lerin tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklenir.
- 15 dakika süre ile 35 kHz’de en yüksek seviyede ultrasonik banyoda yıkanma işlemi gerçekleştirilir.
- Temizlenen PMMA’ler içi saf su ile dolu beherler içerisine daldırılıp çıkarılarak durulanır.
- Durulanan PMMA’ler N2 gazı ile kurutulur.
- Son aşamada steril haldeki PMMA’ler petri kaplarına yerleştirilir.

Cam Slaytların Temizliği:

- Şale içerisine 4 adet cam slayt dizilir.
- Cam slaytların üzerine %70'lik etil alkol zeltisi tüm yüzeyi kaplayacak Şekilde eklenir.
- Ultrasonik banyoda (15 dakika- 35 kHz) yıkanma işlemi gerçekleştirilir.
- Temizlenen cam slaytlar, içi saf ile doldurulmuŐ beherler içerisine daldırılıp çıkarılır. Durulanma işlemi gerçekleştirilir.
- DurulanmıŐ cam slaytlar, N2 gazı ile kurutulur ve petri kaplarına yerleştirilir.
- Petri kapları streç folyo ile kaplanır.

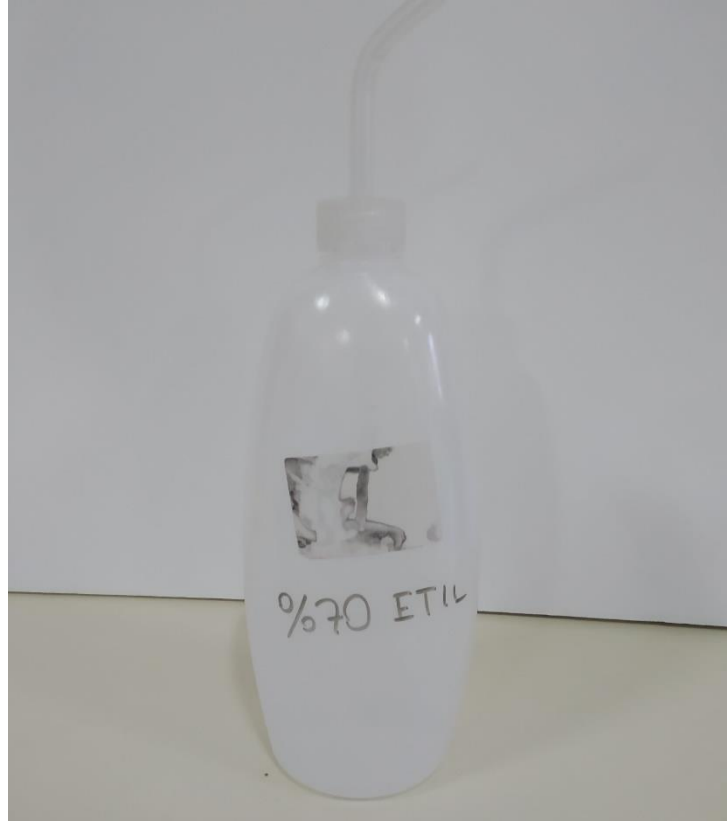
Şekil 2.21,2.22,2.23,2.24,2.25 ve 2.26'da kullanılan malzemeler gösterilmiştir.



Şekil 2.21 Etil Alkol



Şekil 2.22 Distile Su



Şekil 2.23 %70 Etil Alkol Solüsyonu



Şekil 2.24 Ultrasonik Banyo



Şekil 2.25 Şale



Şekil 2.26 Petri Kabına Yerleştirilen Çipler

2.2.Gölge Görüntüleme Sistemi Tasarımı

Gölge görüntüleme sistemi bir lenssiz geniş alan mikroskopi yöntemidir. Bu yöntemde örnek, görüntü sensörü ile ışık kaynağı arasına yerleştirilir ve örneğin üzerine düşen ışığın oluşturduğu hücrelerin gölgesi sensörün tarafından algılanır. Görüntünün kalitesi sıradan mikroskop görüntüleri kadar iyi değildir, ancak görüntüleme alanı sensörün alanı kadar geniştir. Bu bölümde sistemin yapısı anlatılmaktadır.

Gölge görüntüleme sistemi temelde 4 ana bölümden oluşmaktadır. Bunlar, ışık kaynağı, ışık yolu, görüntü sensörü ve sensör standıdır. Yapılan araştırma sonucunda kullanılan görüntü sensörü ile birlikte optimum değeri veren 455nm'lik dalga boyunda ışık yayan Thor Labs. Marka M455L3 model ışık kaynağı LED kullanılmıştır. Şekil 2.27'de kullanılan ışık kaynağı gösterilmiştir.



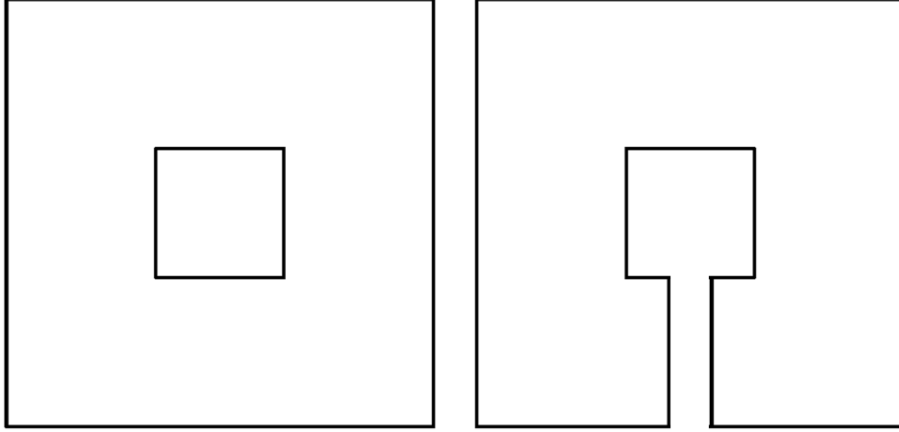
Şekil 2.27 LED Işık Kaynağı

Görüntü sensörü olarak 10 mega piksel çözünürlüğe sahip CMOS kamera kullanılmıştır. Bu kamera IDS Imaging Development Systems markasının UI-1492LE-M modeli gri skalada çalışan tek renkli üründür. Sensör alanı 6.4 mm x 4.6 mm 'dir ve sensör üzerinde 3840 x 2748 piksel bulunmaktadır. Piksel büyüklüğü ise 1.67 μm x 1.67 μm 'dir. Şekil 2.28'de kullanılan kamera gösterilmiştir.



Şekil 2.28 Görüntü Sensör CMOS Kamera

Görüntü sensörünün standı siyah PMMA'den lazer kesici vasıtası ile kesilerek üretilmiştir. Sensör, üzerinde bulunan montaj kısımlarından ilgili bölgeye monte edilmiştir. Şekil 2.29'da üretilen sensör standının CAD çizimi gösterilmiştir.



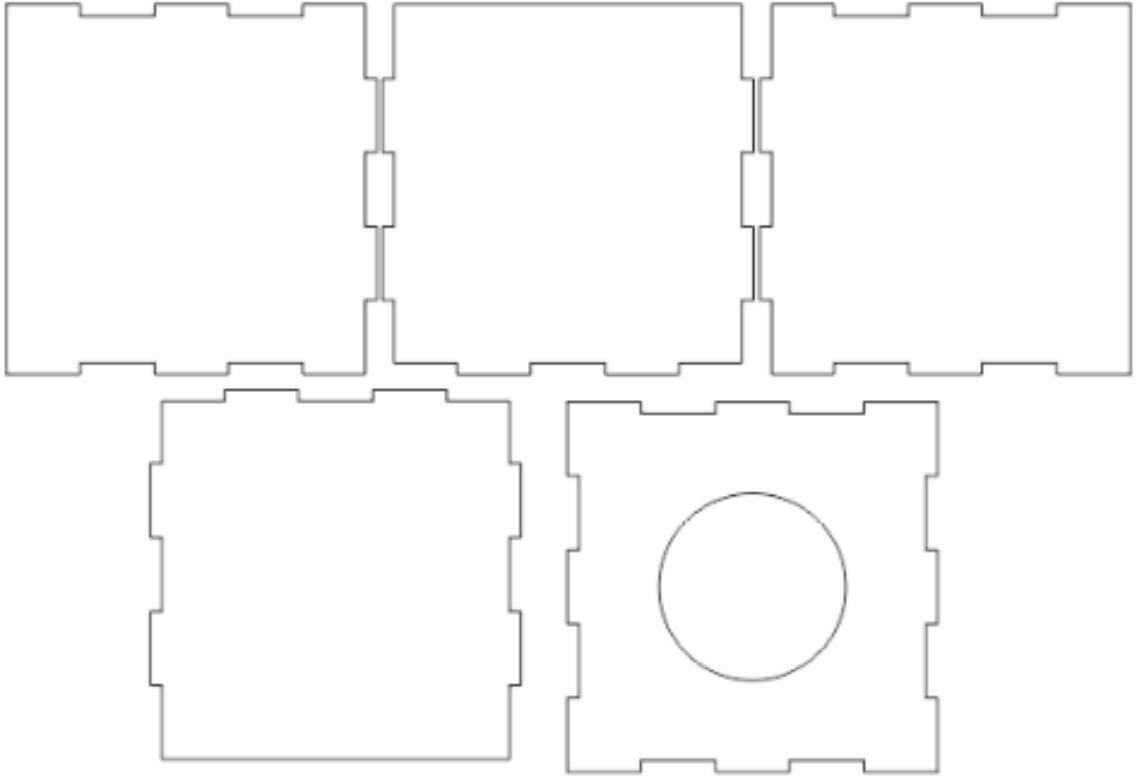
Şekil 2.29 Sensör ve Kablosu İçin Tasarlanan Standın CAD Çizimi

Işık yolu veya optik yol LED ile sensör arasındaki 20 cm 'lik mesafeyi sabitlemek için tasarlanmıştır. Işık yolu toplam 4 parçadan oluşmaktadır, bunlardan üçü Thor Labs. markasının SM2L30, SM1A2 ve SM2T2 modeli ışık yolu aparatlarıdır. Dördüncü parça ile yine siyah PMMA kullanılarak üretilen bir kutu tasarımıdır. Bu üç parça Şekil 2.30'da gösterilmiştir.



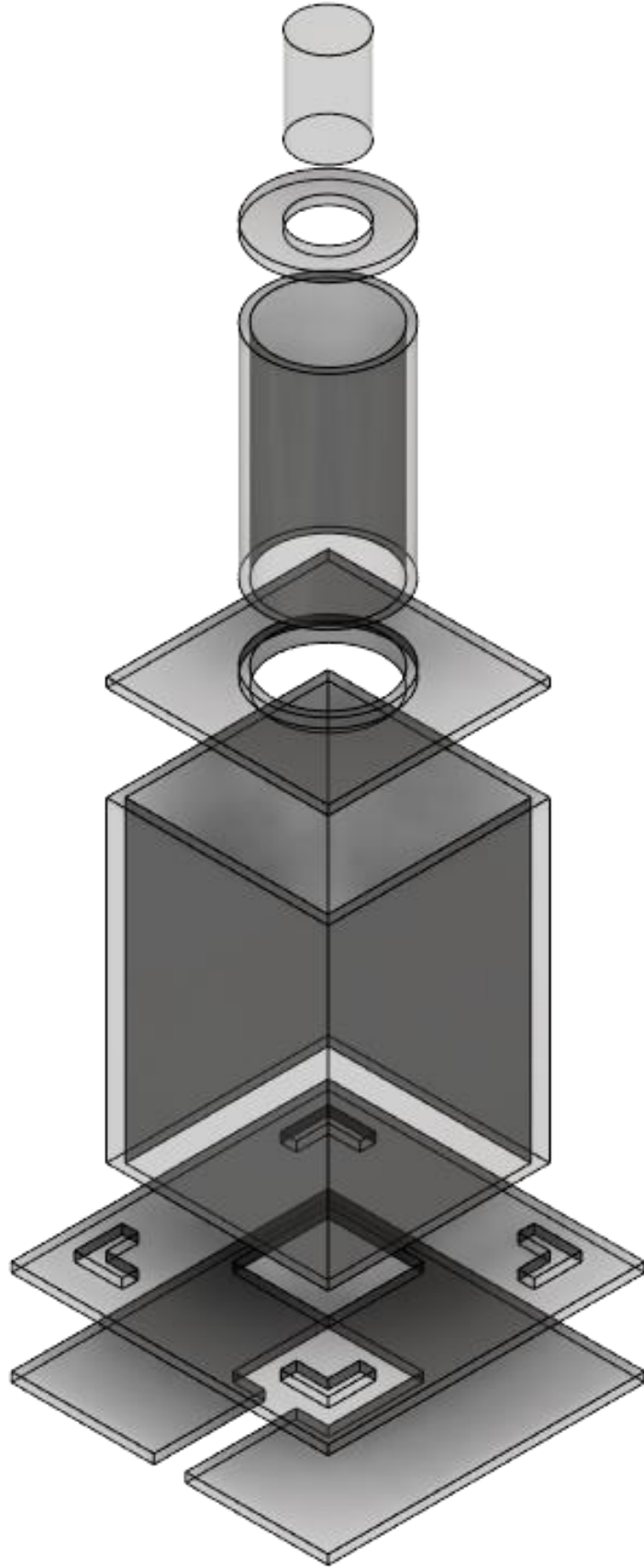
Şekil 2.30 (soldan sağa) Lens Tüpü, LED ile Tüpün Adaptörü, Tüp ile Kutunun Adaptörü

Kutu tasarımının CAD çizimleri ise Şekil 2.31'de gösterilmiştir.



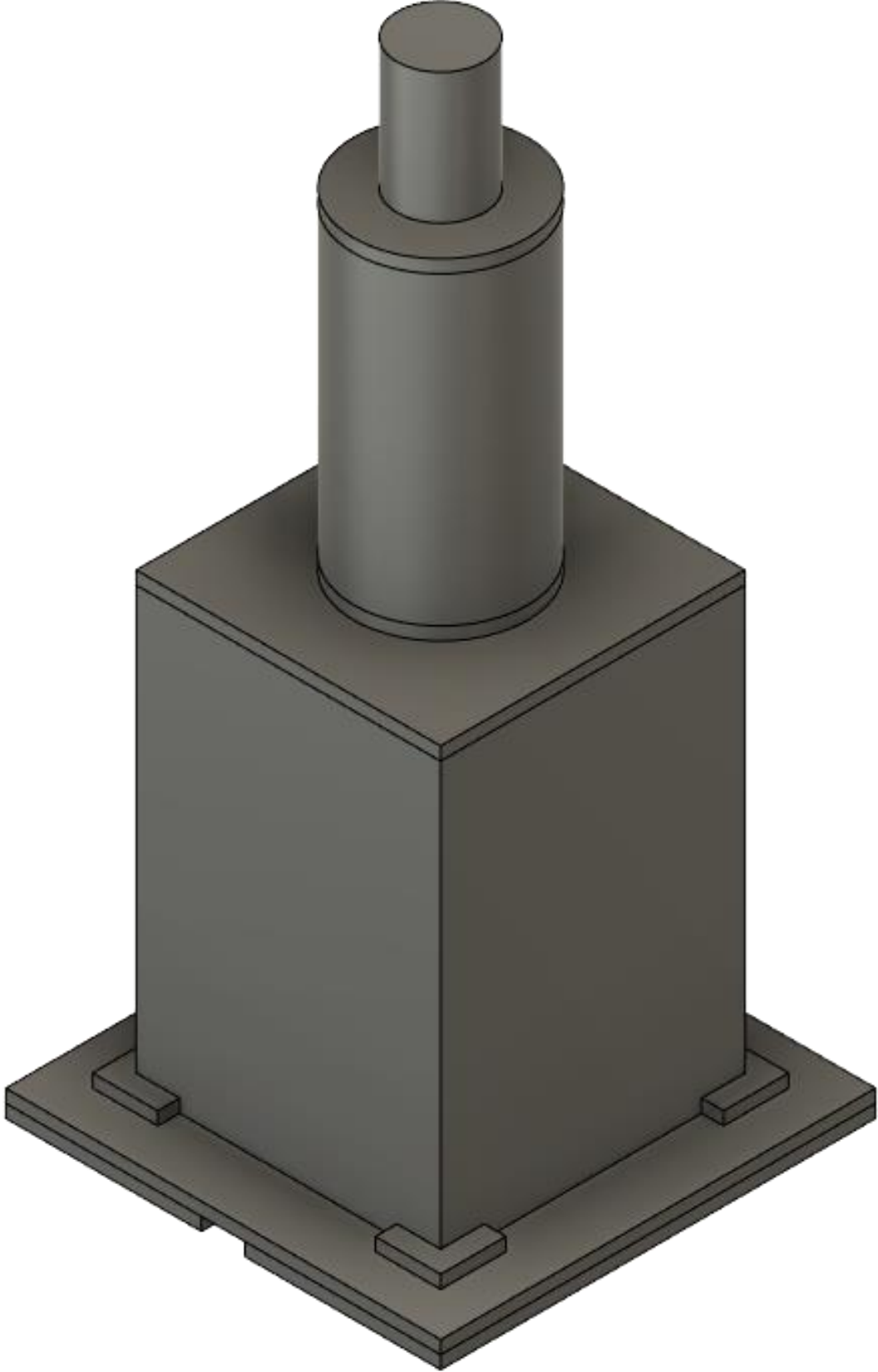
Şekil 2.31 Kutu Tasarımının CAD Çizimi

Şekil 2.32’de ise tüm tasarımın parçalarının ayrı ayrı üç boyutlu çizimi gösterilmiştir.



Şekil 2.32 Tasarımın Tüm Parçalarının Üç Boyutlu Çizimi

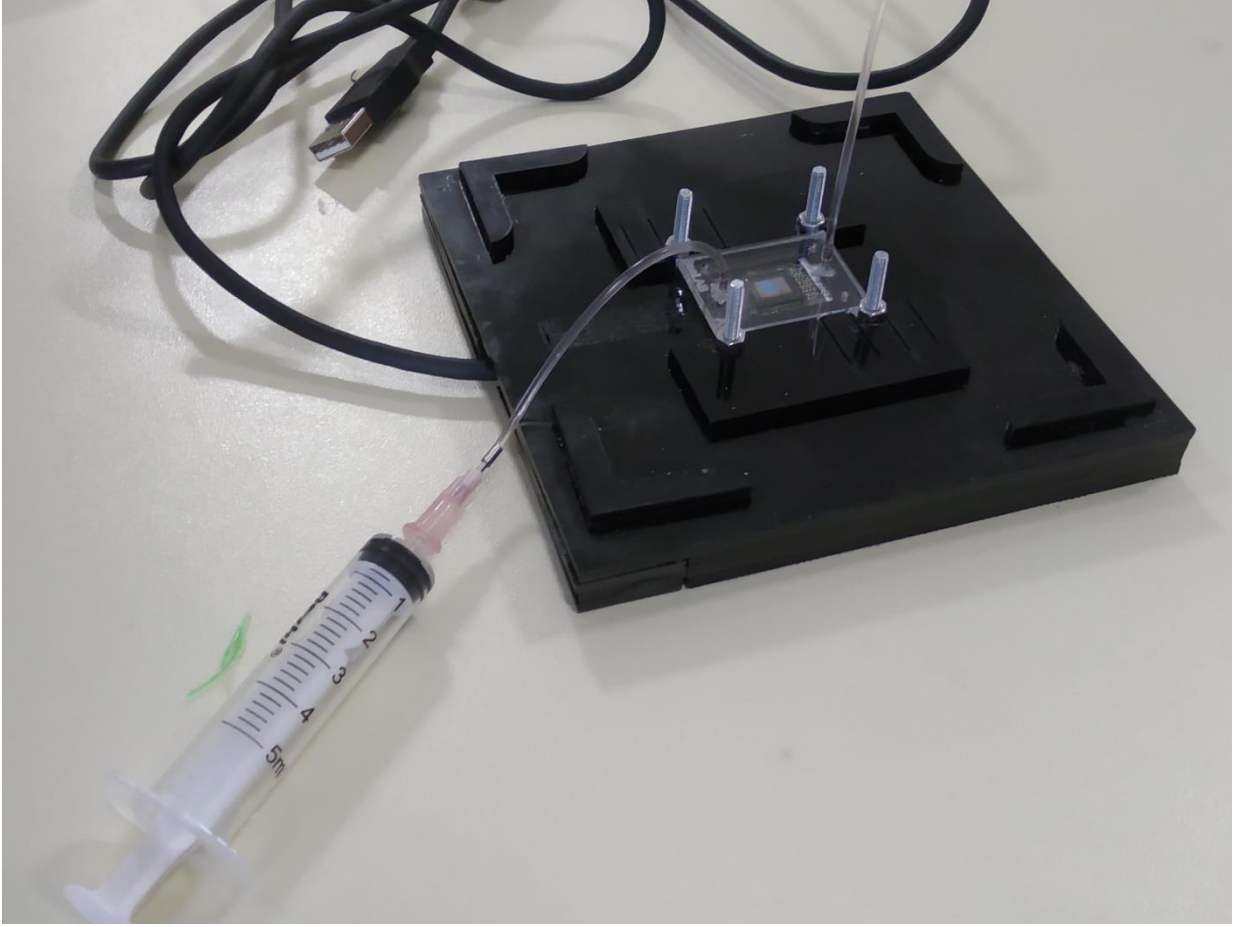
Şekil 2.33’de ise Şekil 48’de gösterilen parçaların birleştirilmiş hali gösterilmiştir.



Şekil 2.33 Tasarımın Tüm Parçalarının Birleştirilmiş Üç Boyutlu Çizimi

Görüntü sensörü için tasarlanan stant aynı zamanda örnek için bir tutucu görevi görmektedir. Örnek ışık yolu sistemi yerinden kaldırılarak sensör standının üzerinde bulunan tutucuya yerleştirilir ardından ışık yolu kapatılarak karanlık oda elde edilir. Daha sonra LED, LED sürücüsüne bağlanarak çalışmaya başlatılır. Son olarak sensör bilgisayara bağlanarak görüntü almaya başlanır. Sensörün hassasiyetine göre LED'in parlaklığı ayarlanabilir.

Şekil 2.34'te sensör standı ve örneğin sensör üzerindeki konumu gösterilmiştir.



Şekil 2.34 Sensör Standı ve Örneğin Konumu

Şekil 2.35'te gölge görüntüleme sisteminin tüm elemanlarının birleşmiş görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2.35 Gölge Görüntüleme Sisteminin Tüm Elemanlarının Birleşmiş Gösterimi

Şekil 2.36'da gölge görüntüleme sistemi ve enjeksiyon pompası birlikte gösterilmiştir.



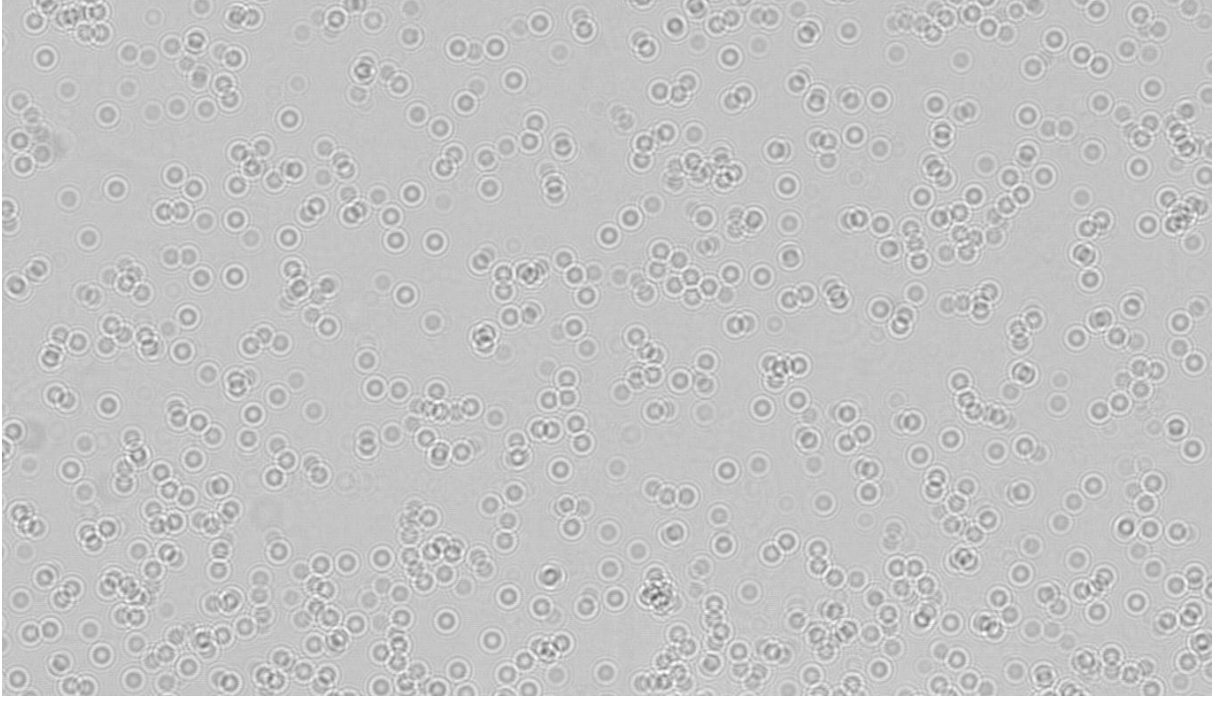
Şekil 2.36 Enjeksiyon Pompası ve Gölge Görüntüleme Sistemi

2.3.Hücre Sayma Algoritması Tasarımı

Hücre sayma algoritması Python programlama dili ile tasarlanmıştır. Görüntünün açılacağı, parametrelerin girileceği ve sonucun verileceği bir GUI oluşturulmuştur.

2.3.1.Ham Görüntünün Alınması ve Yöntemin Seçilmesi

Gölge görüntüleme sistemi kullanılarak, örnekten alınan kan 1/10000 oranında seyreltilerek çipin içerisine enjeksiyon pompası ile 0.01 ml/s hızı ile enjekte edilmiştir. Bu işlem gerçekleştirildikten sonra kamera yazılımı ile görüntüler alınmıştır. Şekil 2.37'de alınan görüntülerden bir tanesinin bir bölümü gösterilmiştir.



Şekil 2.37 Ham Görüntü

Şekilden de görüleceği üzere hücre şekilleri tam daireseldir. Bu sebeple Hough Circle Transform algoritması ile hücre sayımı gerçekleştirilebilir.

2.3.1.1. Hough Dönüşümü

Hough dönüşümü, görüntü analizi, bilgisayarla görme ve dijital görüntü işlemede kullanılan bir özellik çıkarma tekniğidir. Tekniğin amacı, belirli bir şekil sınıfındaki nesnelerin kusurlu örneklerini bir oylama prosedürü ile bulmaktır. Bu oylama prosedürü, Hough dönüşümünü hesaplamak için algoritma tarafından açık bir şekilde inşa edilen sözde toplayıcı uzayda yerel maksimumlar olarak nesne adaylarının elde edildiği bir parametre uzayında gerçekleştirilir. Klasik Hough dönüşümü, görüntüdeki çizgilerin tanımlanmasıyla ilgiliydi, ancak daha sonra Hough dönüşümü, çoğunlukla daireler veya elipsler olmak üzere rastgele şekillerin konumlarını belirlemeye genişletildi. Bugün evrensel olarak kullanıldığı şekliyle Hough dönüşümü, 1972'de Richard Duda ve Peter Hart tarafından icat edildi ve bunu Paul Hough'un ilgili 1962 patentinden sonra "genelleştirilmiş Hough dönüşümü" olarak adlandırdı.

2.3.2. Yöntem Basamaklarının Belirlenmesi

Hough Circle Transform daha çok net şekildeki dairelerin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu sebeple alınan ham görüntünün işlenerek, hücrelerin sayılabilir hale getirilmesi gereklidir, bu yüzden de ham görüntü Gaussian Filtre veya Median Blur Filtre gibi alçak geçiren filtreler ile filtrelenmelidir. Ardından da binary görüntüye çevrilerek hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirilmelidir. Şekil 2.38'de algoritma akış şeması gösterilmiştir.



Şekil 2.38 Algoritma Akış Şeması

2.3.3. Parametre Optimizasyonu

2.3.3.1. Gaussian Filtre Parametre Belirleme

Görüntü işlemede, Gauss bulanıklığı, Gauss yumuşatma olarak da bilinir, bir Gauss işleviyle bir görüntüyü bulanıklaştırmanın ve gürültüden arındırmanın bir yoludur. Genellikle görüntü parazitini ve ayrıntıları azaltmak için grafik yazılımlarında yaygın olarak kullanılan bir efekttir. Gauss düzeltmesi, farklı ölçeklerde görüntü yapılarını geliştirmek için bilgisayarla görme algoritmalarında bir ön işleme aşaması olarak da kullanılır.

Matematiksel olarak, bir görüntüye Gauss bulanıklığı uygulamak, görüntüyü bir Gauss işleviyle birleştirmekle aynıdır. Bu aynı zamanda iki boyutlu bir Weierstrass dönüşümü olarak da bilinir. Bir Gauss'un Fourier dönüşümü başka bir Gaussian olduğundan, Gauss bulanıklığının uygulanması görüntünün yüksek frekans bileşenlerini azaltma etkisine sahiptir; Gauss bulanıklığı bu nedenle alçak geçiren filtredir. Gauss bulanıklığı, görüntüdeki her piksele uygulanacak dönüşümü hesaplamak için bir Gauss işlevi kullanan bir görüntü filtresi türüdür. Bir boyuttaki Gauss fonksiyonunun formülü şu şekildedir:

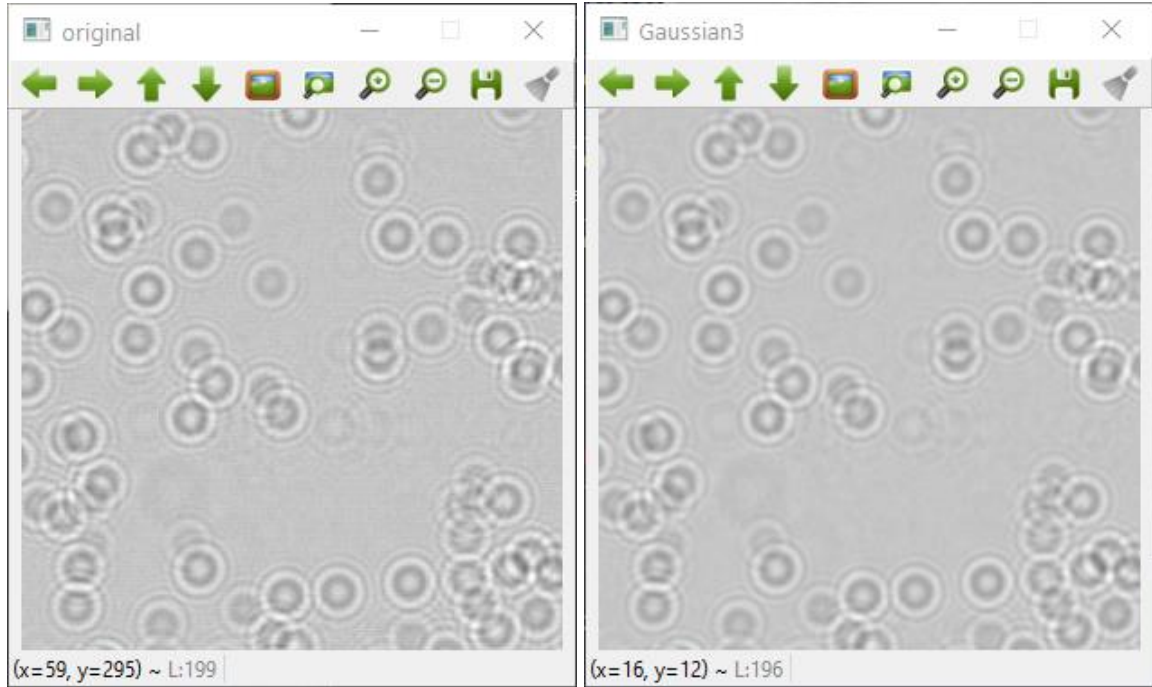
$$G(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

İki boyuttaki Gauss fonksiyonunun formülü ise şu şekildedir:

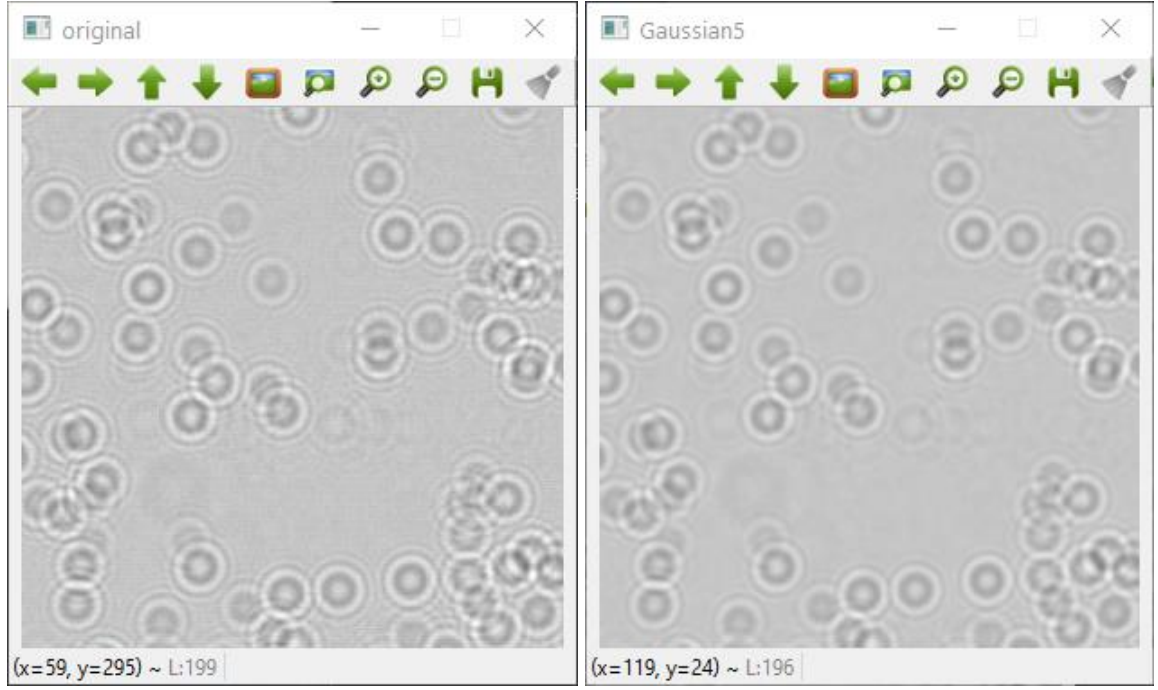
$$G(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}}$$

Burada x, yatay eksendeki orijinden olan mesafedir, y dikey eksendeki orijinden olan mesafedir ve σ , Gauss dağılımının standart sapmasıdır. İki boyutta uygulandığında, bu formül, merkez noktasından Gauss dağılımına sahip eş merkezli daireler olan bir yüzey üretir [61-63].

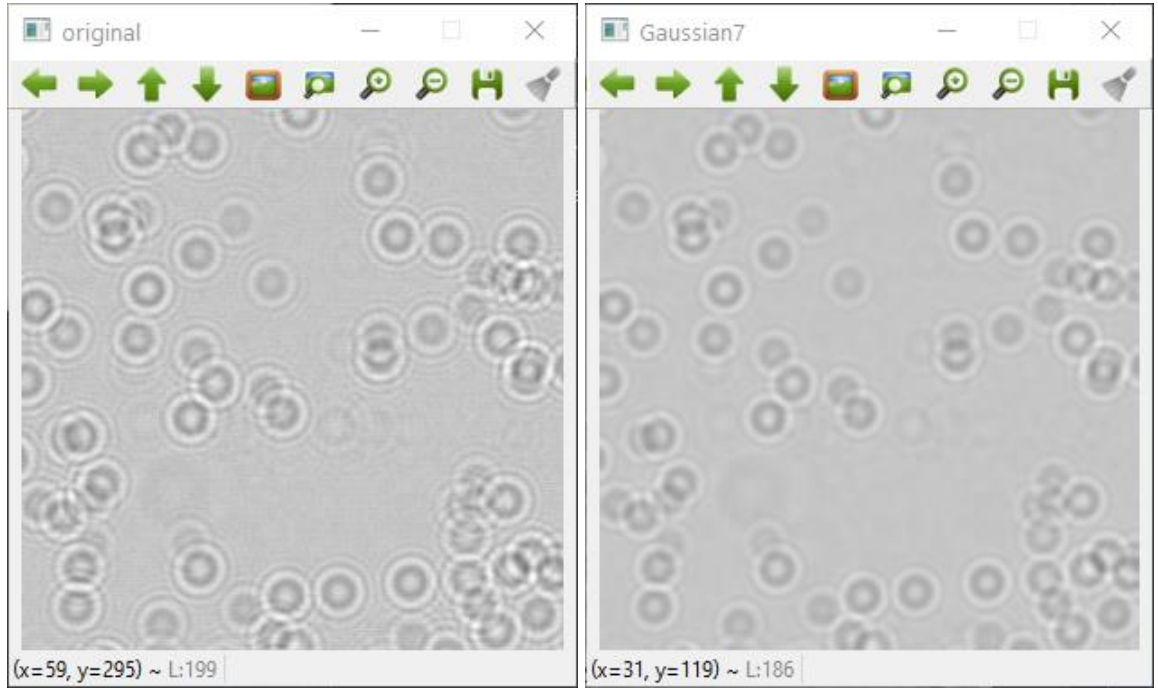
Python programlama dilinin kütüphanesi olan OpenCV'nin içerisindeki Gaussian bulanıklaştırma fonksiyonunun iki parametre içermektedir. Bu parametreler piksellerin sigma değerlerinin belirleyen faktörlerdir ve yalnızca tek sayı olabilirler. Aşağıdaki Şekil 2.39, 2.40 ve 2.41'de filtre katsayısının 3, 5 ve 7 olarak belirlenmiş görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 2.39 Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 3 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü



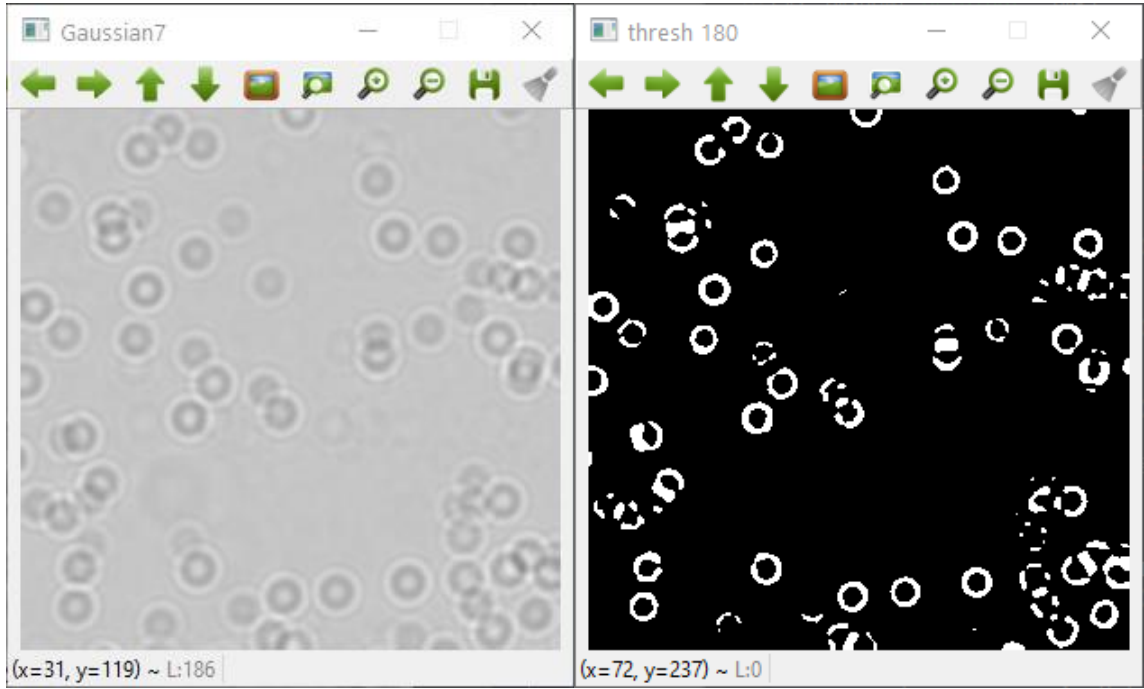
Şekil 2.40 Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 5 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü



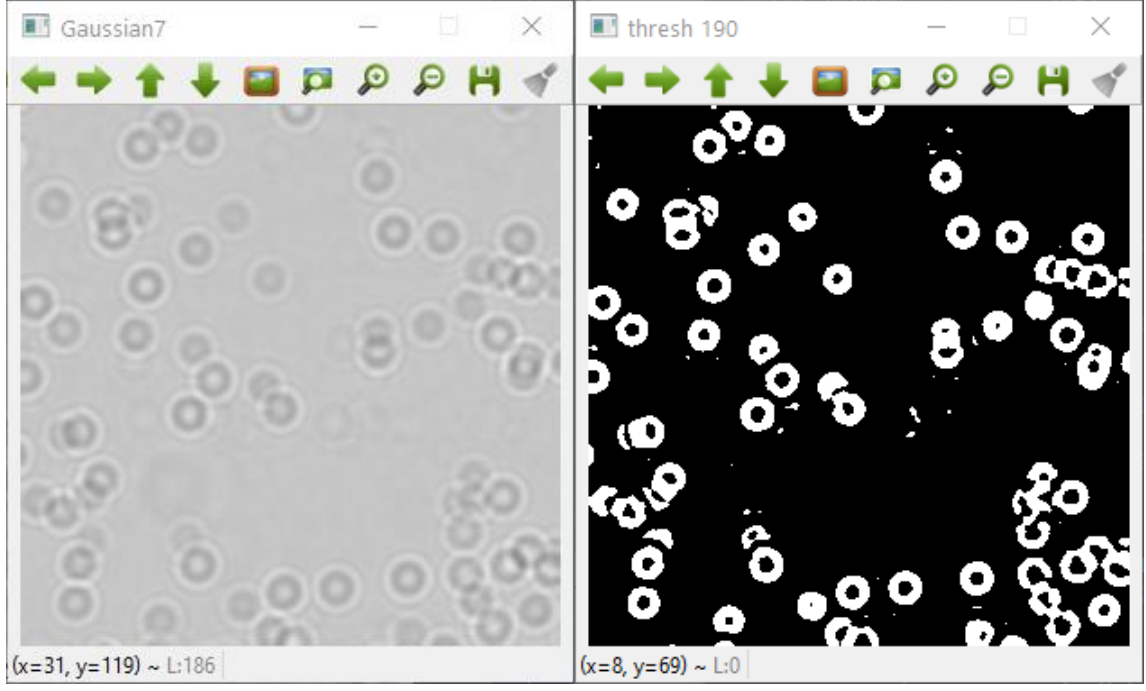
Şekil 2.41 Orijinal Görüntü ve Filtre Katsayısı 7 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü

2.3.3.2. 1. Eşik Değeri Parametre Belirleme

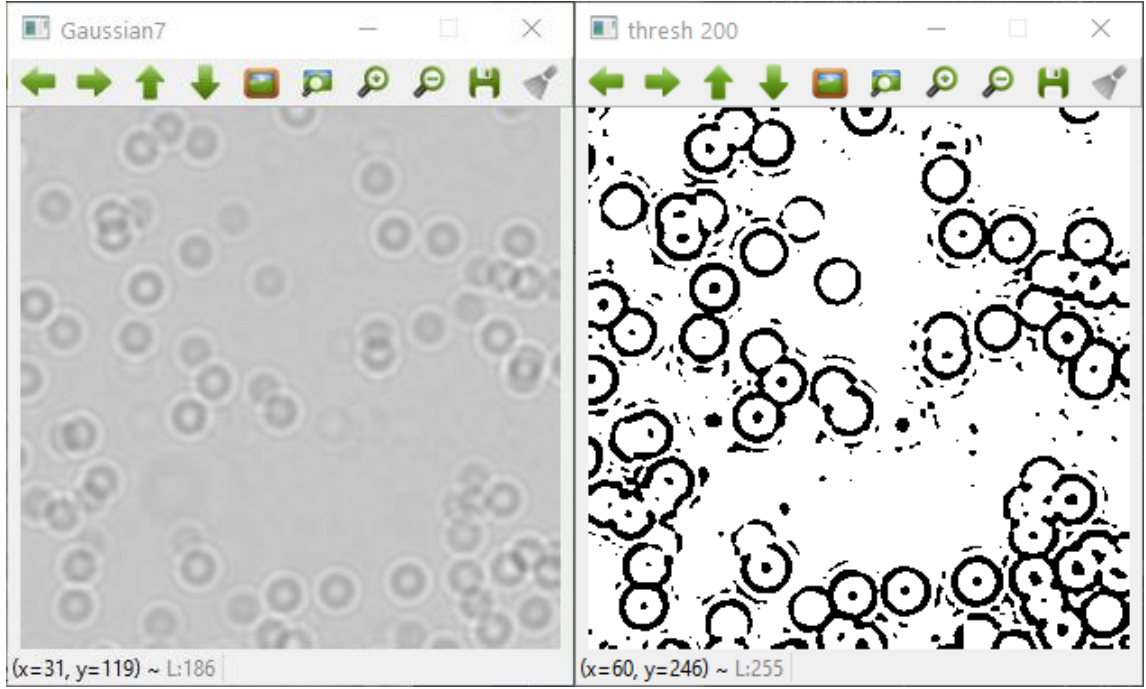
Dijital görüntü işlemede eşikleme, görüntüleri bölümlere ayırmanın en basit yöntemidir. Gri tonlamalı bir görüntüden, ikili görüntüler oluşturmak için eşikleme kullanılabilir. En basit eşikleme yöntemleri, bir görüntüdeki her pikseli, görüntü yoğunluğu, sabit bir değerden azsa siyah pikselle veya görüntü yoğunluğu bu sabitten büyükse beyaz pikselle değiştirir. Şekil 2.42,2.43 ve 2.44'te farklı eşik değerleri ile eşikleme işlemleri yapılmış görüntüler gösterilmiştir.



Şekil 2.42 Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 180 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü



Şekil 2.43 Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 190 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü



Şekil 2.44 Filtre Edilmiş Görüntü ve Eşik Değeri 200 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü

2.3.3.3. Medyan Filtre Parametre Belirleme

Medyan filtre, genellikle bir görüntü veya sinyalden gürültüyü gidermek için kullanılan doğrusal olmayan bir dijital filtreleme tekniğidir. Bu türde parazit azaltma işlemi, sonraki işlemin sonuçlarını iyileştirmek için tipik bir ön işleme adımıdır. Medyan filtreleme, dijital görüntü işlemede çok yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü belirli koşullar altında, gürültüyü ortadan kaldırırken kenarları korur ve ayrıca sinyal işlemede uygulamaları vardır [64].

Medyan filtrenin çalışma mantığını göstermek için, bir girişin hemen önünde ve sonrasında üç pencere boyutu kullanılarak, aşağıdaki basit tek boyutlu sinyale bir medyan filtresi uygulanacaktır:

$$x = (2, 3, 80, 6, 2, 3)$$

Dolayısıyla, medyan filtrelenmiş çıktı sinyali y şöyle olacaktır:

$$y_1 = \text{med}(2, 3, 80) = 3,$$

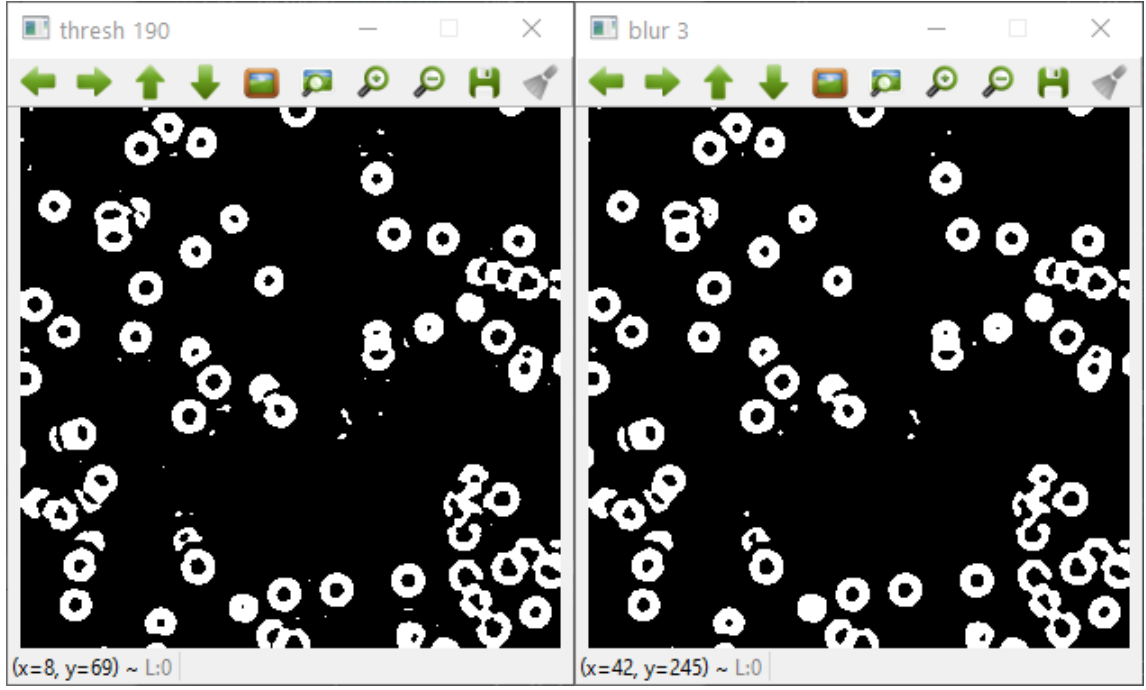
$$y_2 = \text{med}(3, 80, 6) = \text{med}(3, 6, 80) = 6,$$

$$y_3 = \text{med}(80, 6, 2) = \text{med}(2, 6, 80) = 6,$$

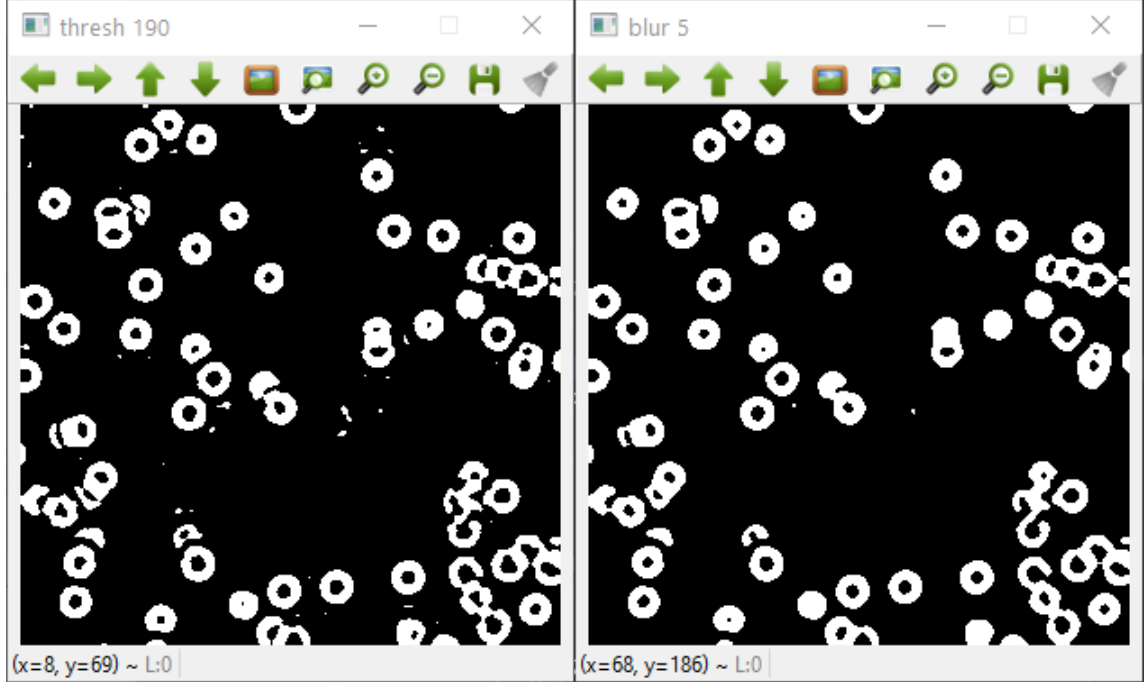
$$y_4 = \text{med}(6, 2, 3) = \text{med}(2, 3, 6) = 3,$$

yani $y = (3, 6, 6, 3)$ olur.

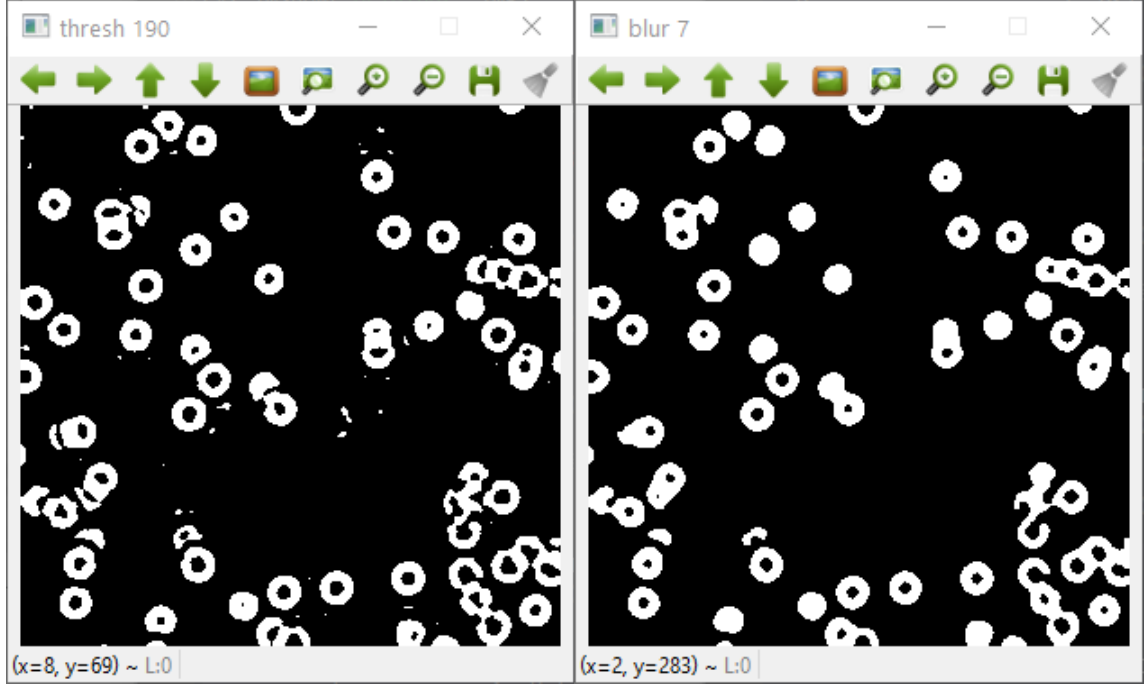
Şekil 2.45, 2.46 ve 2.47'de farklı parametre değerleri seçilmiş medyan filtre sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 2.45 Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 3 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü



Şekil 2.46 Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 5 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü

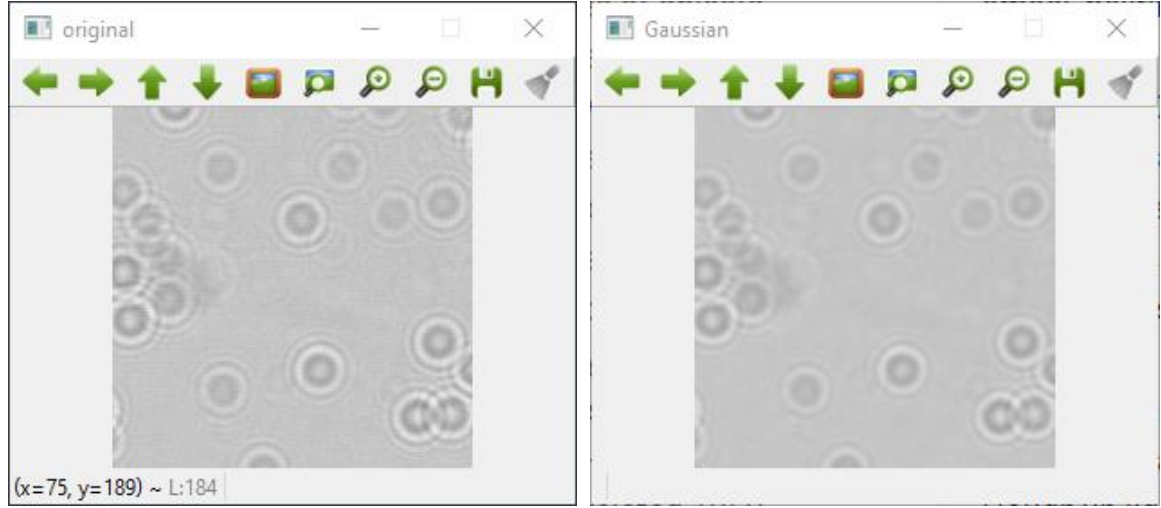


Şekil 2.47 Eşiklenmiş Görüntü ve Filtre Katsayısı 7 Olarak Belirlenmiş Filtrelenmiş Görüntü

2.3.4. Yöntemin Uygulanması

2.3.4.1. Ham Görüntünün Filtre Edilmesi

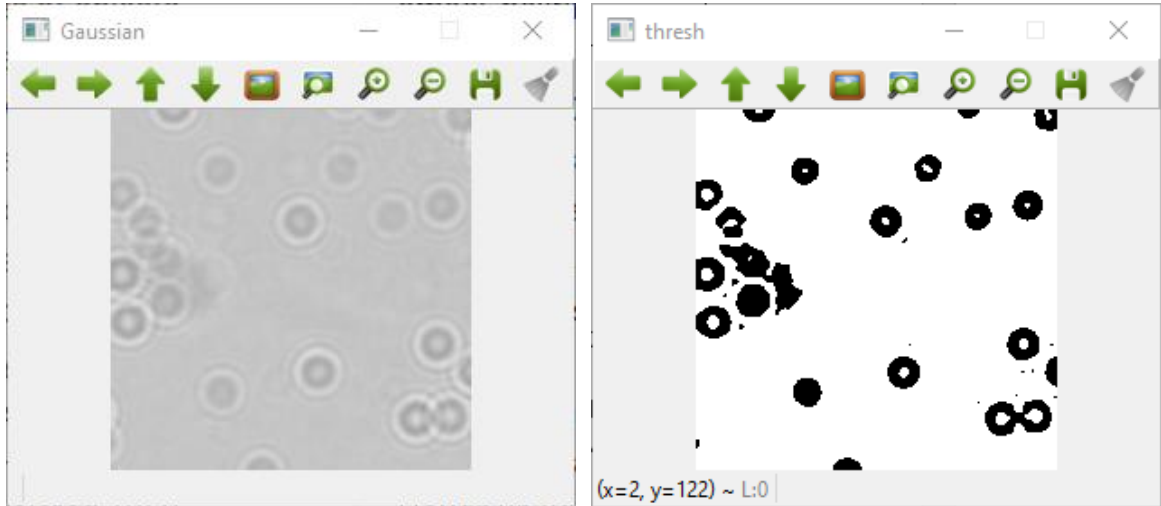
Ham görüntü alındıktan sonra Python programlama dili içerisinde görüntü dosyası yüklenmiştir. Bu programlama dilinin görüntü işleme için özel olarak kullanılan OpenCV kütüphanesi kullanılmıştır. OpenCV kütüphanesinde bulunan GaussianBlur isimli fonksiyon sayesinde görüntünün ilk alçak geçiren filtre işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.48’de ham görüntünün filtre edilmeden önceki ve sonraki hali gösterilmiştir.



Şekil 2.48 Orjinal Görüntü ve Filtrelenmiş Görüntü

2.3.4.2. Filtrelenmiş Görüntünün Binary Görüntüye Çevrilmesi

Filtrelenen görüntüde bulunan hücrelerin daha net görüntülenmesi için binary görüntüye çevrilmesi gerekmektedir. Bu işlem için de yine OpenCV kütüphanesinin hazır fonksiyonu olan threshold fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyonda görüntü istenen eşik değerine göre binary görüntüye çevrilmektedir. Şekil 2.49’da filtrelenmiş görüntü ve binary görüntü gösterilmiştir.



Şekil 2.49 Filtrelenmiş Görüntü ve Binary Görüntü

Binary görüntü beyazın üstünde siyah halkalar şeklinde oluşturulmuştur ancak Hough Circle Transform algoritması, siyah üzerindeki beyaz şekilleri bulma konusunda daha etkili sonuçlar vermektedir. Bu sebeple oluşturulan binary görüntüde siyah bölgelerin ve beyaz bölgelerin yer değiştirmesi gerekmektedir. Bu işlem için yine OpenCV kütüphanesinin

invert isimli fonksiyonu kullanılmıştır. Şekil 2.50’de siyah ve beyaz bölgelerin yer değiştirmiş görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 2.50 Oluşturulan Yeni Binary Görüntü

2.3.4.3. Binary Görüntünün Filtrenmesi

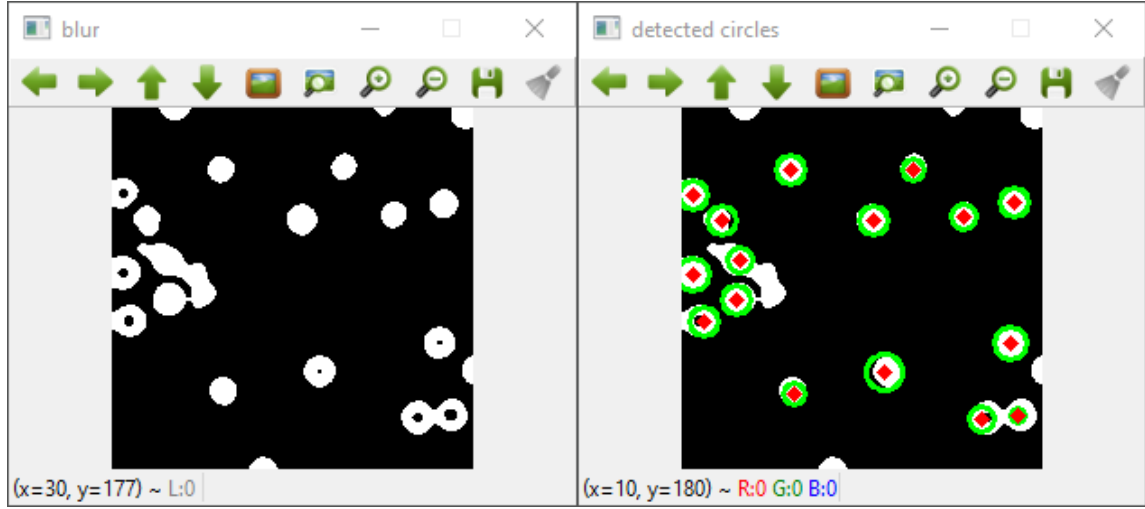
Binary görüntüde şekilde görüldüğü üzere halen daha ufak gürültüler mevcuttur, bu gürültüleri gidermek adına ikinci bir alçak geçiren filtre olan Median Blur Filtre uygulanmıştır. Şekil 2.51’de filtre uygulanmış görüntü ve uygulanmadan önceki görüntü gösterilmiştir.



Şekil 2.51 Binary Görüntü ve Filtrenmiş Binary Görüntü

2.3.4.4. Hough Circle Transform İşleminin Uygulanması

Hough Circle Transform işlemi için yine OpenCV kütüphanesinde bulunan HoughCircles isimli fonksiyon kullanılmıştır. Bu fonksiyon içerisine bulunacak dairelerin maksimum ve minimum yarıçapları ve dört adet özel parametre değeri girilmiştir. Şekil 2.52’de binary görüntü üzerinde Hough Circle Transform işlemi ve işlemin uygulanmadan önceki görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 2.52 Binary Görüntü ve Hough Circle Transform İşlemi Uygulanmış Görüntü

Şekil 68’de de gösterildiği gibi Hough Circle Transform işlemi binary görüntü üzerinde yüksek başarımla sonuç vermiştir. Ancak görüldüğü üzere bazı hücre yapılarını veya görüntü üzerinde bulunan yarım yapıdaki hücreleri saymamıştır.

2.3.5. Arayüz

Projenin amacı akış halindeki hücrelerin sayımı olduğu için, tek görüntü üzerinden akıştaki hücreleri saymak amacıyla enjeksiyon hızı ve kameranın çip büyüklüğünün bilinmesi halinde sayım işlemi gerçekleştirilebilmektedir, bu sebeple arayüz ekranına bu değerlerin de girilebilmesi gerekmektedir. Şekil 2.53’ de arayüz ekranı gösterilmiştir.



Şekil 2.53 Program Arayüzü

3. DENEYLER VE SONUÇ

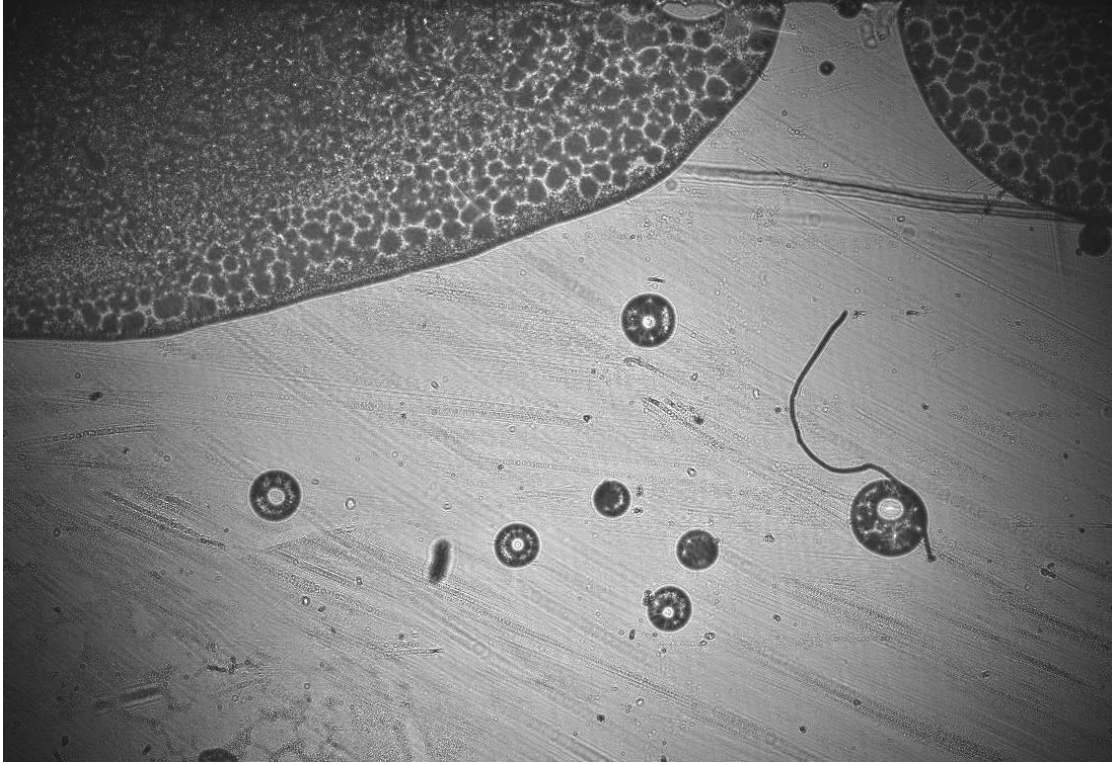
3.1.Görüntüleme Sisteminin Testi

Gölge görüntüleme sisteminin ilk testlerinde görüntü boş cam slayt üzerine sıvı damlatılarak alınmıştır. Bu aşamada görüntü netliğinin kazanılması, kontrast ayarlarının yapılması ve ışığın şiddetinin belirlenmesi gibi çalışmalar yürütülmüştür. Öncelikle kamera çipinin temizliği sağlanarak boş görüntüler elde edilmiştir. Şekil 3.1’de temizlenmiş kamera çipi ile elde edilen görüntü gösterilmiştir.



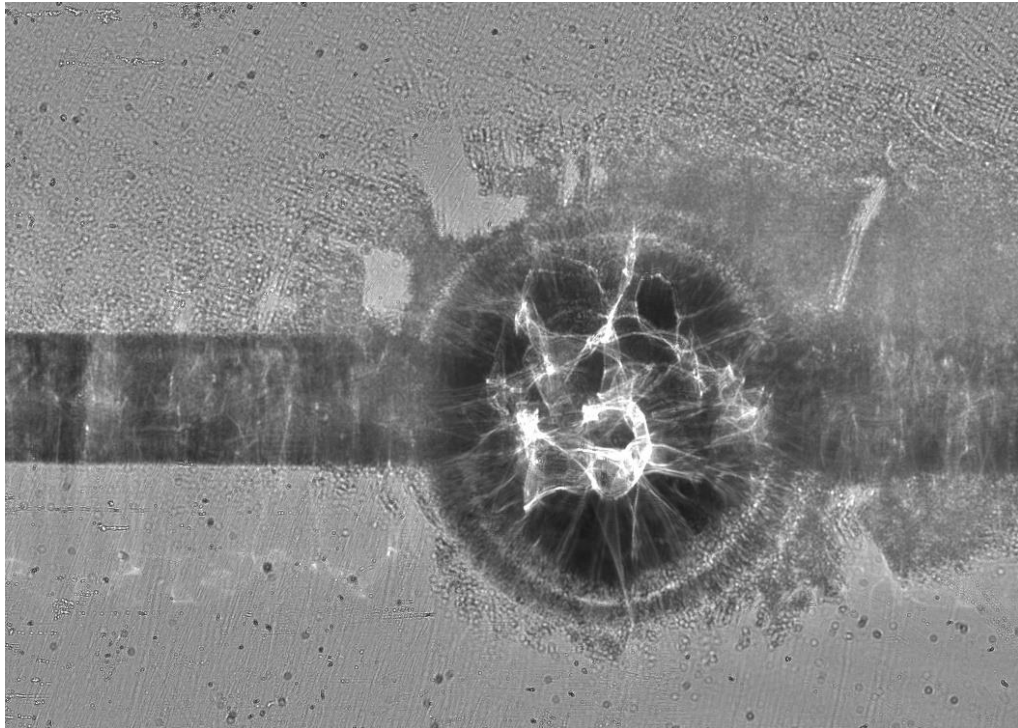
Şekil 3.1 Kamera Çipinin Temizlenmiş Görüntüsü

Ardından cam slaytın gölge görüntüleme sistemi ile denenmesi aşamasına geçilmiştir. Şekil 3.2’de cam slayt üzerine damlatılmış sıvının görüntüsü gösterilmiştir.



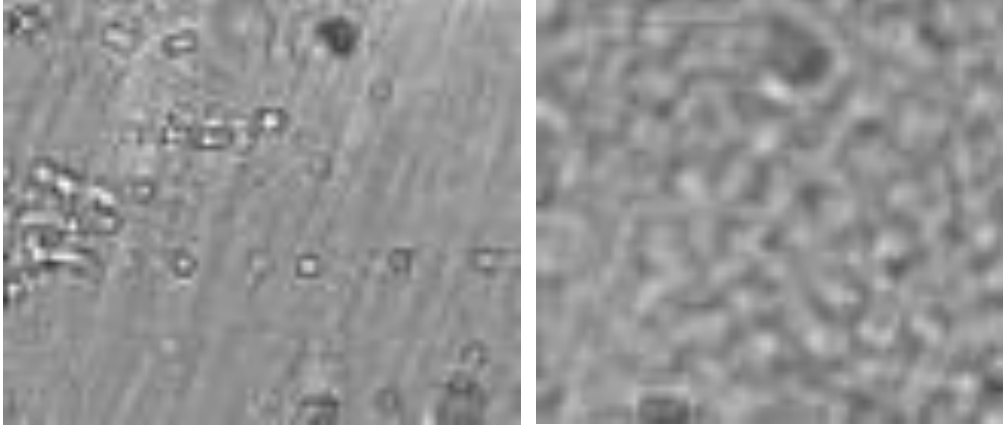
Şekil 3.2 Boş Cam Slayt Üzerindeki Sıvının Görüntüleme Sistemi ile Alınan Görüntüsü

Daha sonrasında görüntüdeki ışığın seviyesi belirlenerek daha net çekimler yapılmıştır. Şekil 3.3'te PMMA çip ile yapılmış bir çekim gösterilmiştir.



Şekil 3.3 PMMA Çipin Görüntüleme Sistemindeki Görüntüsü

PMMA kalınlığı cam slayta göre daha fazla olduğu için, üst katmandaki görüntülerde çipin üzerine gürültü faktörü olarak düşebilmektedir. Gürültü faktörü olarak düşen bu görüntüler, alt katmandaki görüntülere oranla daha büyük ve daha bulanıktırlar. Büyük olmasının sebebi ışık kaynağına üst katmanın daha yakın olması iken, bulanık olmasının sebebi ise üst katmanın çipten uzakta olmasıdır. Şekil 3.4'te PMMA'dan alınan görüntüler gösterilmiştir.



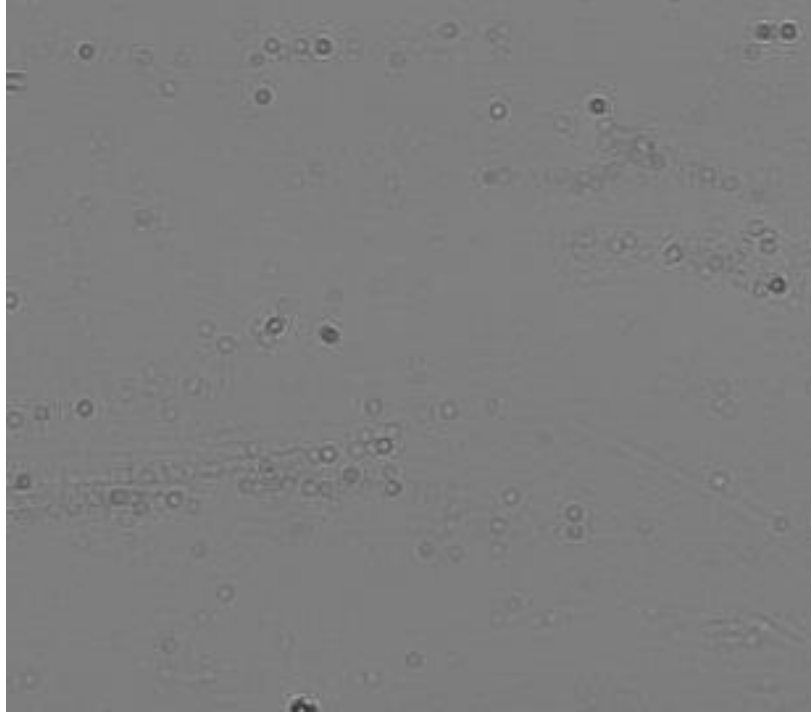
Şekil 3.4 Soldaki: Alt Katman, Sağdaki: Üst Katman

PMMA'nın alt ve üst katmanlarındaki görüntülerin her ikisi de çipin üzerine düştüğü için ve üst katmandaki gereksiz görüntü, gürültü oluşturduğu için PMMA'nın temizliği de en az cam slayt kadar önemlidir. Çipin tasarımı, üst katmanda PMMA, orta katmanda DSA ve alt katmanda cam slayt olacak şekilde tasarlandığı için, cam slaytın üzerinden alınan görüntüler daha net olmuştur.

3.2.Mikroakışkan Çipin Testi

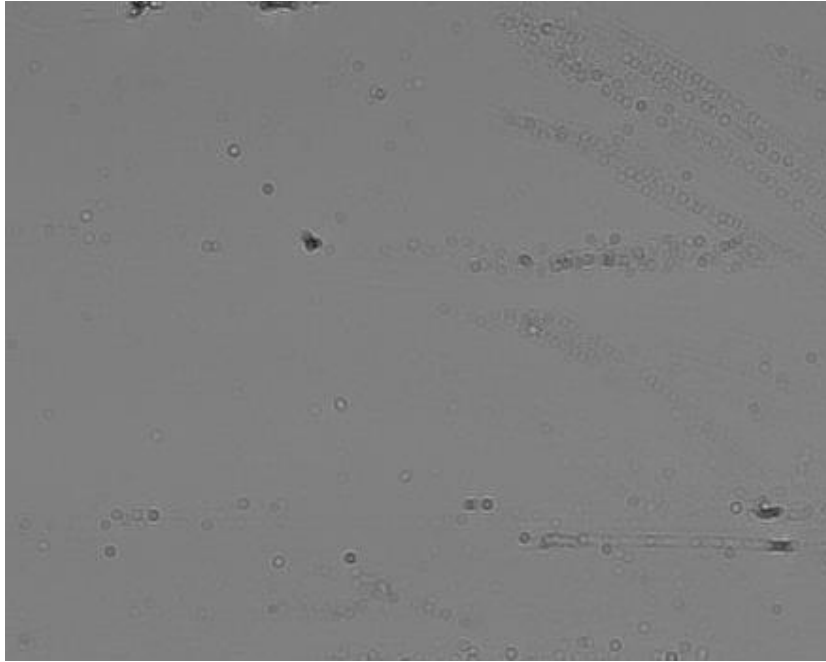
Mikroakışkan çipler üretim aşamasından sonra, temizlik protokolüne göre temizlenmiştir ve her temizleme işleminden sonra görüntüleme sistemi altında görüntülenmiştir. Cam slaytlar da aynı şekilde PMMA gibi temizleme protokolünden sonra gölge görüntüleme sistemi altında görüntülenmiştir ve en temiz görüntü alınmaya kadar bu işlem devam ettirilmiştir.

Temizlik esnasında distile su veya etil alkolün yeterince saf olmaması veya iyi süzülmemiş olması gibi etkenlerden dolayı cam slaytın üzerinde veya PMMA üzerinde hücre benzeri lekeler kalmaktadır. Şekil 3.5'te cam slayt üzerinde temizlik protokolü sonrasında kalan lekeler gösterilmiştir.



Şekil 3.5 Cam Slayt Üzerindeki Hücre Benzeri Lekeler

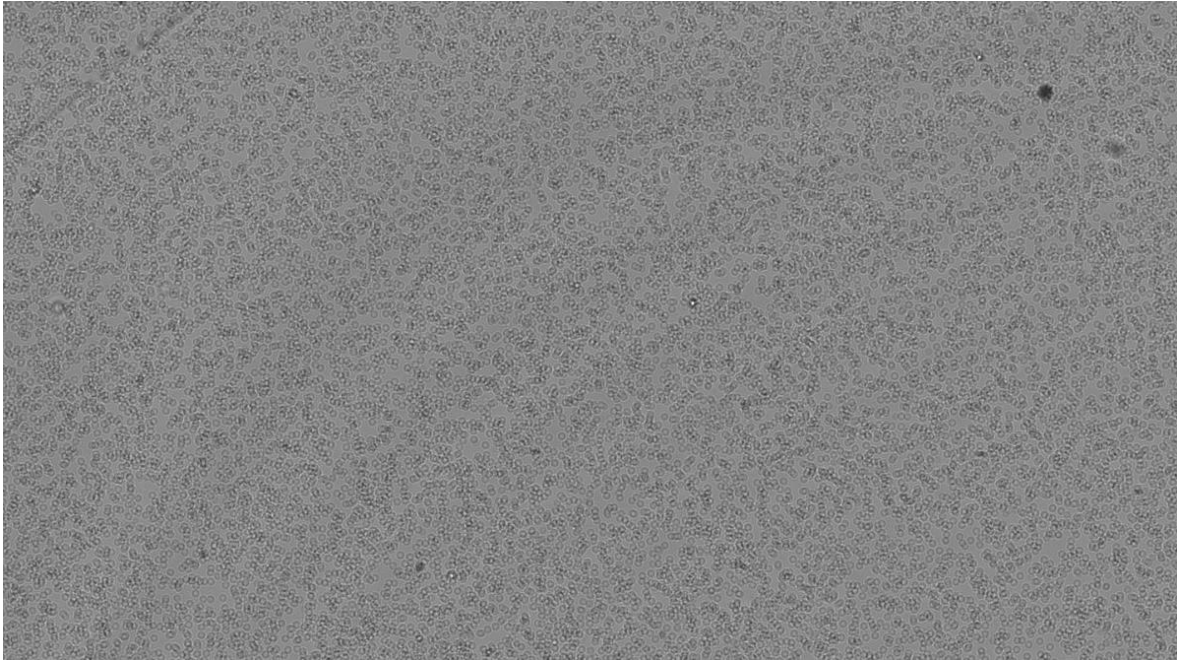
Cam slayt üzerindeki benzer şekilde temizlik protokolü sonrasında veya temizlikten önceki üretim aşamasında meydana gelen muhtemel çiziklerden dolayı PMMA üzerinde de gürültü oluşturabilecek şekiller gözlemlenmiştir. Şekil 3.6'da PMMA üzerinde bulunan gürültünün gölge görüntüleme sistemi ile alınmış görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.6 PMMA Üzerindeki Hücre Benzeri Lekeler ve Çizikler

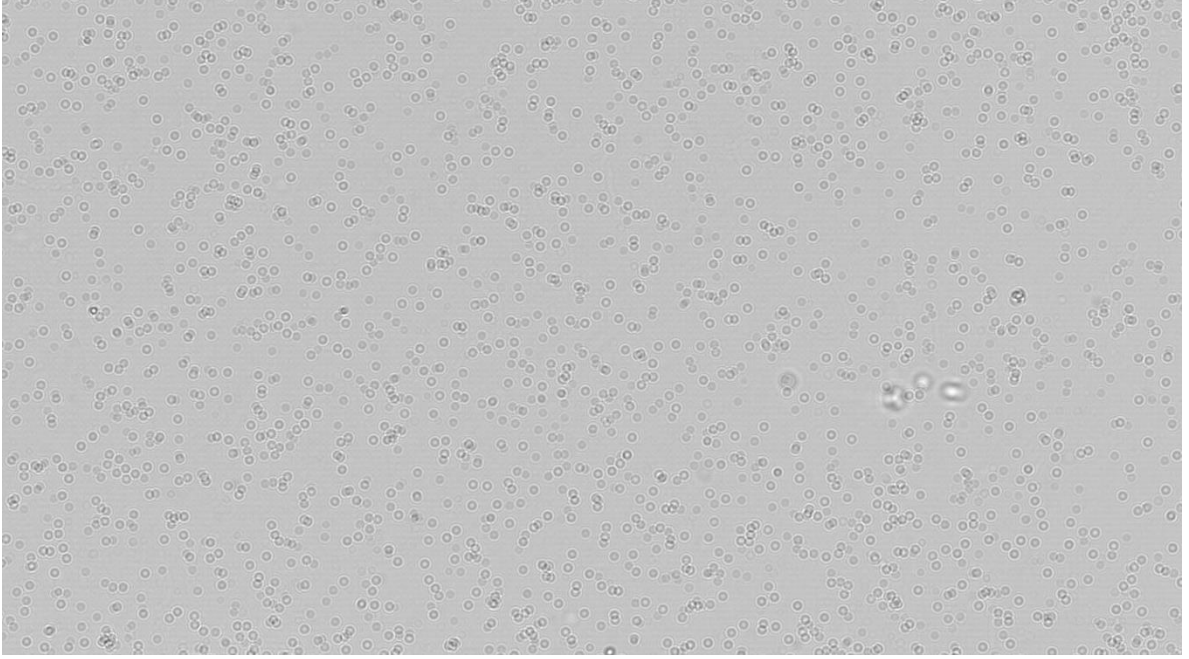
Hem cam slayt üzerindeki hem de PMMA üzerindeki lekeler veya çiziklerin en aza indirilmesi için tekrar tekrar temizlik protokolü uygulanmış ve tekrar tekrar görüntüler alınarak en uygun görüntünün elde edilmesi sağlanmıştır.

Cam Slayt ve PMMA'lar neredeyse hiç lekesiz şekilde elde edilmeye başlandıktan sonra, PMMA ve cam slaytların birleştirme işlemine başlanmıştır ve içerisine kan enjekte edilerek görüntü alınmıştır. Şekil 3.7'de 1/1000 oranında seyreltilmiş kan enjekte edilmiş bir çipin görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.7 1/1000 Oranında Seyreltilmiş Kanın Gölge Görüntüleme Sistemi Üzerindeki Görüntüsü

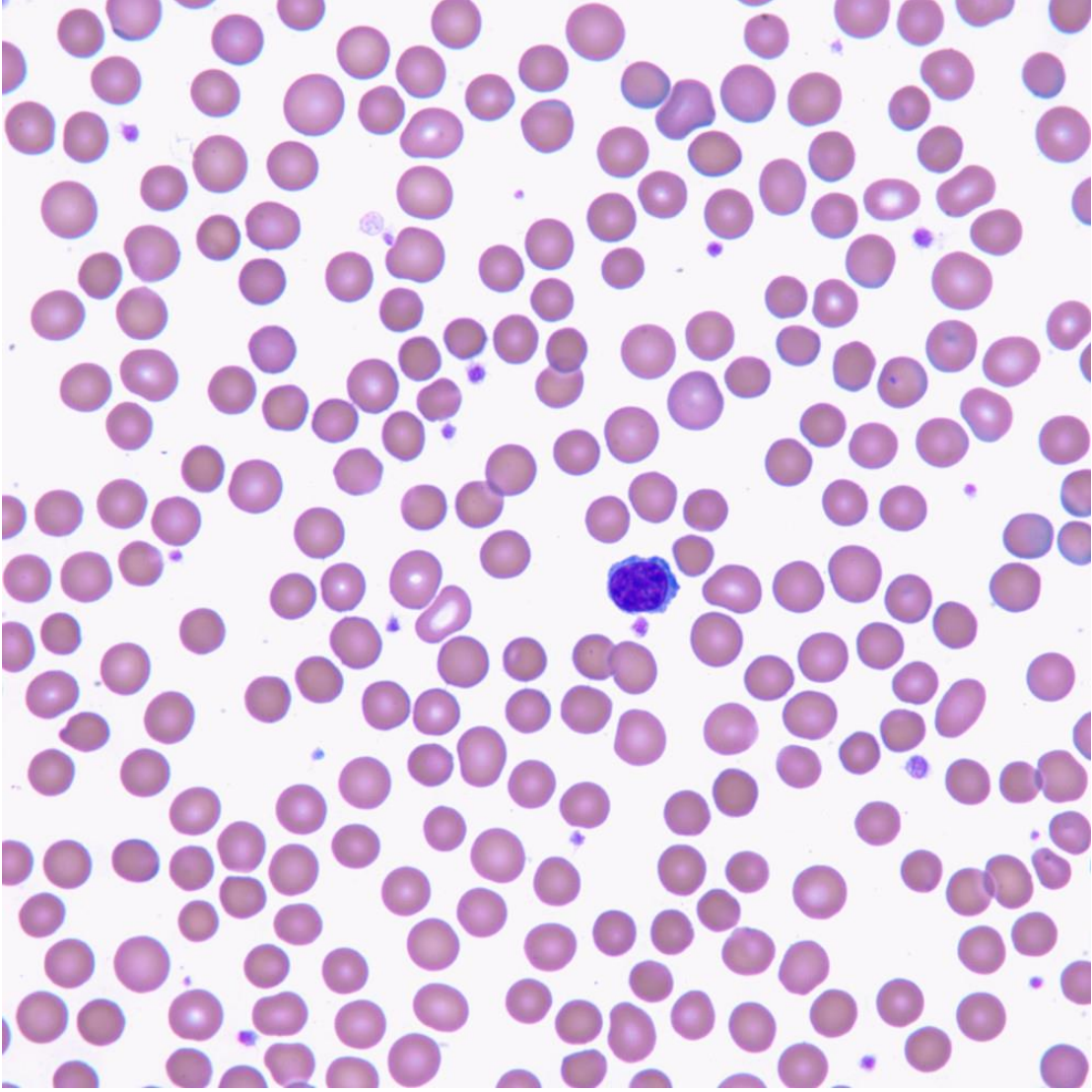
Ancak şekilde de görüldüğü üzere hücre görüntüleri birbirine çok yakın ve üst üste binmiş halde görüntülenmiştir. Bu sebeple kanın seyreltilme oranı değiştirilerek 1/10000 yapılmıştır. Daha sonra başka bir çipe enjekte edilen bu kan ile Şekil 3.8'deki görüntü alınmıştır.



Şekil 3.8 1/10000 Oranında Seyreltilmiş Kanın Gölge Görüntüleme Sistemi Üzerindeki Görüntüsü

3.3.Algoritmanın Testi

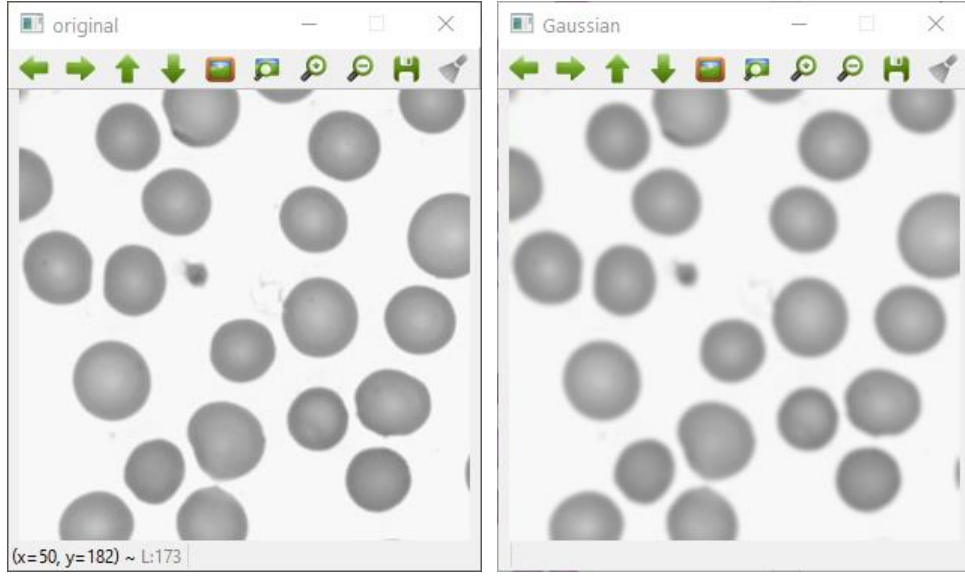
Algoritma testi hücre görüntüleri alınmadan önce yapıldığı için alınan hücre görüntüleri yerine hazır bulunan hücre görüntüleri kullanılmıştır. Şekil 3.9’da hücre görüntüleri yerine kullanılan görüntü gösterilmiştir.



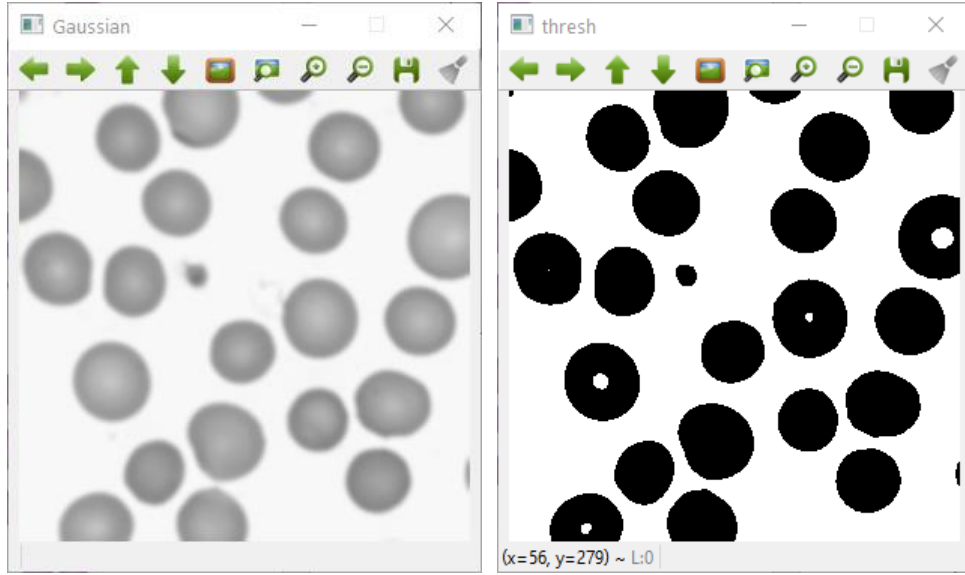
Şekil 3.9 Hücre Görüntüleri Yerine Kullanılan Görüntü

Şekil 3.9'daki görüntünün kullanılma sebebi kan hücrelerinin mikroskop ile alınmış bir görüntüsünün olmasıdır. Yani kan hücreleri de bu şekildeki yapılar gibi gözükeceği için bu görüntü tercih edilmiştir.

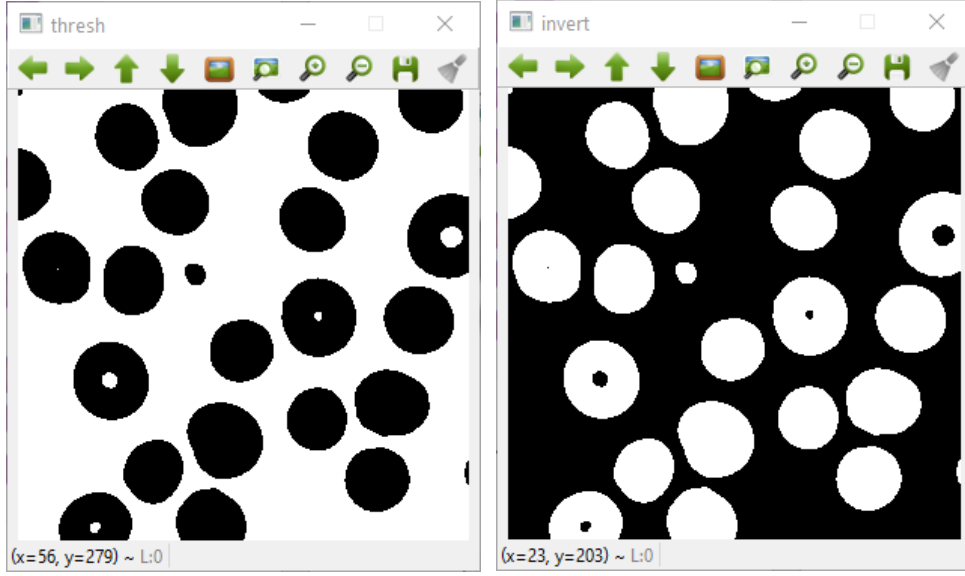
Görüntü algoritma ile birlikte uygulandığında hücre sayım işlemi yapılmıştır. Şekil 3.10,3.11,3.12,3.13 ve 3.14'te örnek görüntü üzerinde uygulanan algoritmanın basamakları ve sonucu gösterilmiştir.



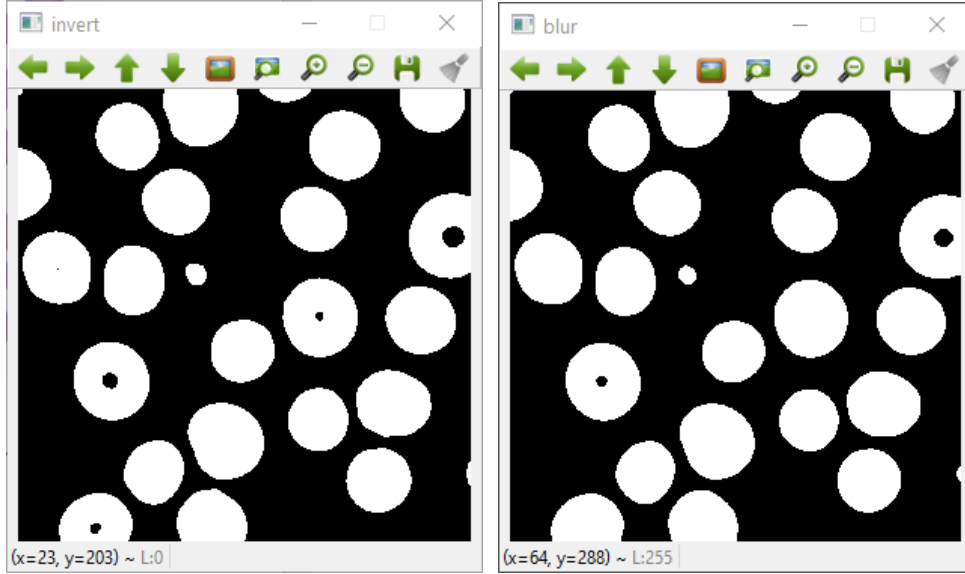
Şekil 3.10 Gri Skala Görüntüsüne Gaussian Blur Uygulanması



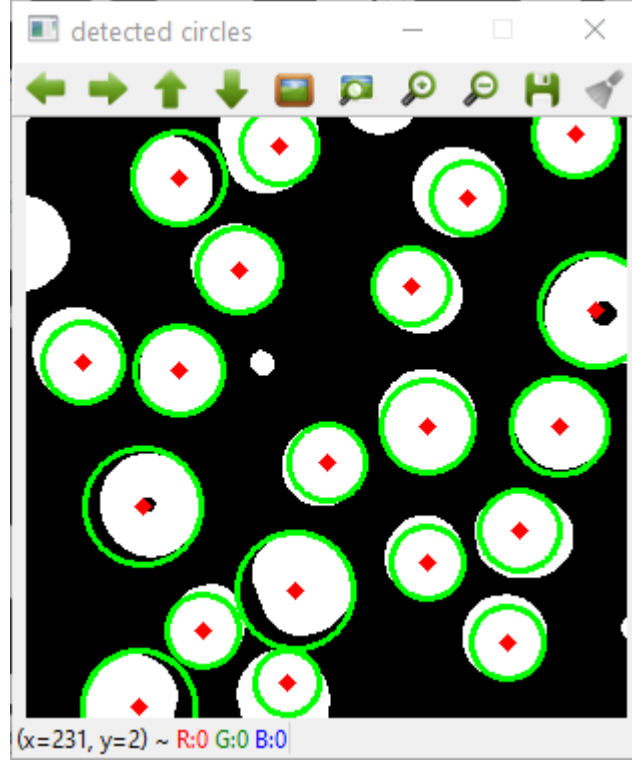
Şekil 3.11 Filtrelenmiş Görüntünün Binary Görüntüye Çevrilmesi



Şekil 3.12 Binary Görüntünün Renklerinin Ters Çevrilmesi



Şekil 3.13 Binary Görüntünün Median Blur Filtre ile Filtrelenmesi



Şekil 3.14 Hücrelerin Sayım İşleminin Gerçekleştirilmesi

Algoritmanın başarılı sonuçlar vermesi neticesinde, hücre görüntüleri alındıktan sonra hücre görüntüleri ile de denenmiş ve yine başarılı sonuçlar vermiştir. Hücre görüntüleri ile denenen algoritmanın çıktılarına materyal metot kısmında değinilmiştir.

3.4. Akış Sitometrisinin Testi

Akış sitometrisi akış üzerinden gerçek zamanlı ölçüm ile yapılan bir hücre sayım yöntemidir. Klasik akış sitometrisinde sayım tek bir hücrenin geçebileceği bir kanaldan yapılır. Ancak kurulan gölge görüntüleme sistemi ve alınan görüntüler ile yapılabilecek akış sitometrisinde tek bir görüntü üzerinden değil birden çok görüntü üzerinden hücreler takip edilerek hücre sayımı yapılabilir. Bu işlemin yapılabilmesi için gerekli olan temel malzeme yüksek FPS değerine sahip bir kameradır. Pandemi sürecinde uluslararası satış ve lojistik faaliyetlerindeki aksamadan dolayı istenilen özelliklerdeki kamera alınamamıştır. Bunun yerine ise yeni bir yöntem geliştirilerek tek bir görüntü üzerinden, saniyede belli bir alandan geçen ortalama hücre sayısı bulunmuştur. Bu şekilde akış üzerinden hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

4. SONUÇ

Çalışma akışı, parça çizimlerinin gerçekleştirilmesi, malzemelerin temin süreci, parça çıktılarının alınması, alınan çıktılar ile mikro akışkan çiplerin ve gölge görüntüleme sisteminin oluşturulması, gölge görüntüleme sisteminin testleri, oluşturulan çiplerin gölge görüntüleme sistemi ile testleri, algoritma oluşturma süreci, algoritmanın denenmesi, kan kullanılarak tüm sistemin denenmesi, akış sitometrisi testi şeklinde gerçekleşmiştir.

Sistemin bileşenlerinin özgün çizimleri AutoCAD programının Educational sürümü ile gerçekleştirilmiştir. Ardından G-Code halinde lazer kesiciye yüklenen çizimler PMMA malzeme üzerine uygulanarak mikroakışkan çipler ile DSA malzeme elde edilmiştir. Ayrıca yine lazer kesiciyle siyah PMMA malzemedan gölge görüntüleme sisteminin parçaları da kesilmişlerdir. Malzeme temin sürecinde enjektör, enjektör iğnesi, kılcal boru gibi malzemeler alınmıştır. Kamera, led, led sürücüsü gibi malzemeler ise halihazırda bulunan malzemelerdir. Oluşturulan çipler gölge görüntüleme sistemi ile temizlik protokolü öncesi ve sonrası test edilmişlerdir. Görüntü elde edilmeye başlandıktan sonra algoritma geliştirme süreci başlamıştır. Algoritma geliştirildikten sonra örnekten kan alınarak tüm sistem test edilmiştir. Son olarak enjeksiyon pompası ile akış sağlanarak akış sitometrisi de test edilerek sistemin çalışır olduğu kanıtlanmıştır.

Akış sitometrisi ile kurulan sistem kıyaslandığında;

- Akış sitometrisinin sonuç verme süresi uzunken, kurulan sistemin sonuç verme süresi daha kısadır. Akış sitometrisinde sonuç birkaç gün içerisinde çıkar, kurulan sistemde ise görüntü büyüklüğüne bağlı olarak maksimum bir dakikada sonuç alınır.
- Akış sitometrisinde kullanılan elemanlar gereği sistemin maliyeti yüksektir. Kurulan sistemde ise maliyet düşüktür. Akış sitometrisi cihazının maliyeti 15.000 €' dan başlarken, kurulan sistemin yaklaşık toplam maliyeti 1.500 €'dur. Tablo 4.1'de detaylı maliyet gösterilmiştir. Prototip için kullanılan gelişmiş kamera ve ışık sistemi için uygun maliyetli çözümler önerildiğinde 200 Avro'ya kadar maliyet azaltılabilir.
- Sistem 40 ul solüsyondaki 1666 hücreyi 1 saniyede sayabilmektedir.

Tablo 4.1 Maliyet Tablosu

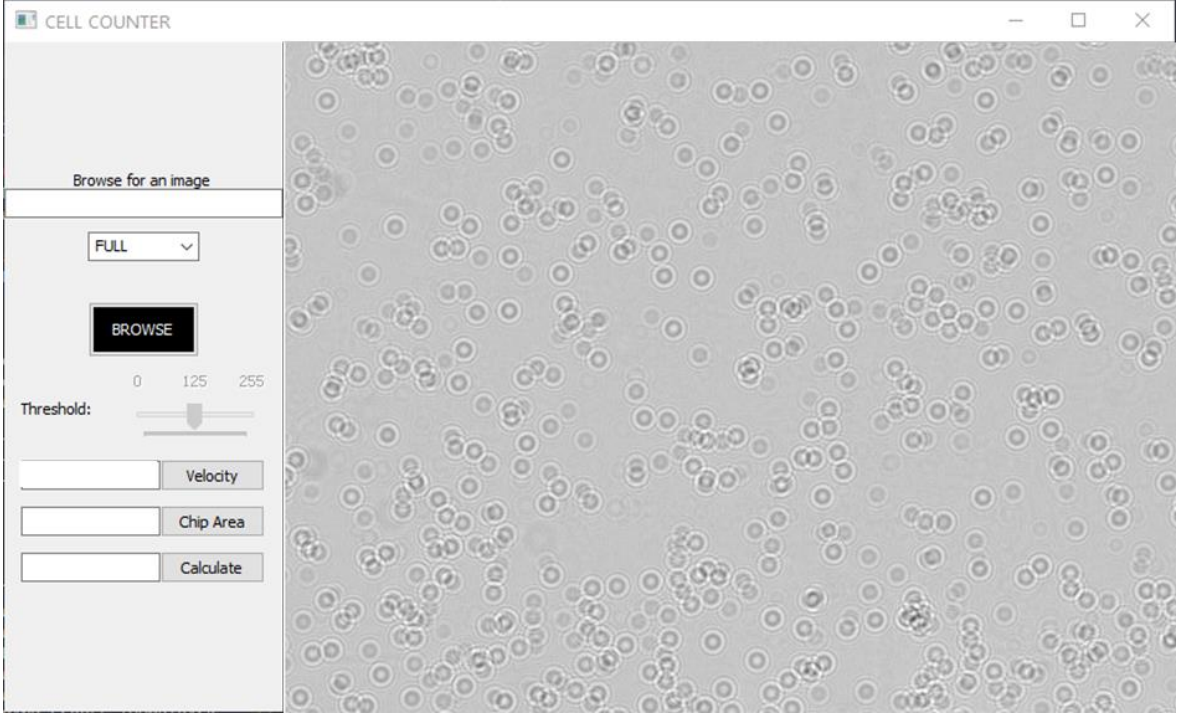
Malzeme	Fiyat
Thorlabs M455L3 LED	270 €
Thorlabs SM2L30	34 €
Thorlabs SM1A2	24 €
Thorlabs SM2T2	34 €
UI-1492LE-M	800 €
Siyah PMMA	5 €
Şeffaf PMMA	5 €
Cam Slayt	3 €
3M DSA	10 €
Beybi Enjektör İğnesi	5 €
Beybi Enjektör	5 €
Enjeksiyon Pompası	300 €
TOPLAM	1495 €

Tablo 4.2’de ise sistemin özgüllük ve hassaslık verileri verilmiştir.

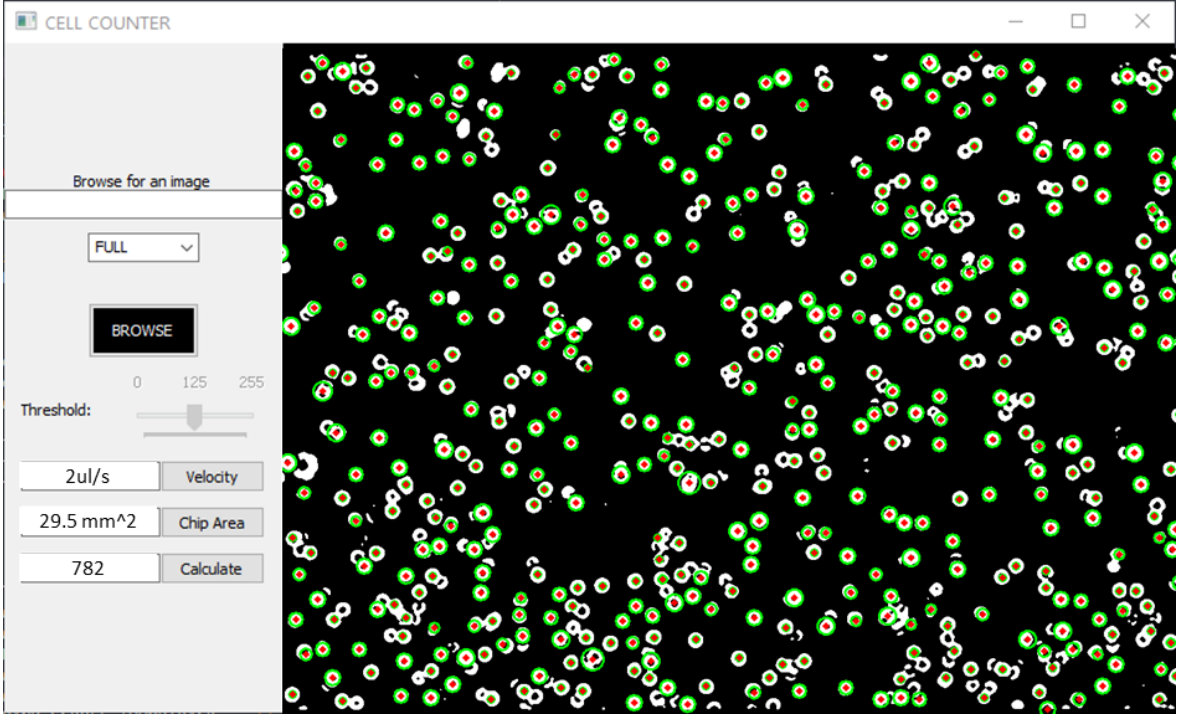
Tablo 4.2 Özgüllük ve Hassasiyet Tablosu

		Gerçek Durum	
		Pozitif	Negatif
Teşhis Edilen	Pozitif	86	4
	Negatif	12	14
Hassaslık		%87,75	
Özgüllük		%77,77	

Çalışma sonucunda, yüksek maliyetli akış sitometrilerine alternatif oluşturabilecek, sahrada kullanım için uygun, düşük maliyetli, maliyetine oranla yüksek doğruluk oranı sağlayan bir POC akış sitometrisi sistemi geliştirilmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2’de arayüzde hücre görüntüleri ve sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.1 Arayüzde Açılmış Hücre Görüntüsü



Şekil 4.2 Hücre Sayım İşleminin Sonucu

KAYNAKÇA

- [1] Shapiro, H. M. (2005). Practical flow cytometry. John Wiley & Sons.
- [2] Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
- [3] Macey, M. G., & Macey, M. G. (2007). Flow cytometry. Springer.
- [4] Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology.
- [5] Keren, D. F., Hanson, C. A., & Hurtubise, P. E. (1994). Flow cytometry and clinical diagnosis. American Society of Clinical Pathologists Press.
- [6] Orfao, A., Ruiz-Arguelles, A., Lacombe, F., Ault, K., Basso, G., & Danova, M. (1995). Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*, 80(1), 69-81.
- [7] Watson, J. V. (1999). The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 38(1), 2-14.
- [8] Kraly, J. R., Holcomb, R. E., Guan, Q., & Henry, C. S. (2009). Microfluidic applications in metabolomics and metabolic profiling. *Analytica chimica acta*, 653(1), 23-35.
- [9] Faure, K. (2010). Liquid chromatography on chip. *Electrophoresis*, 31(15), 2499-2511.
- [10] Schneider, G. (2018). Automating drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(2), 97.
- [11] Elvira, K. S., i Solvas, X. C., Wootton, R. C., & Demello, A. J. (2013). The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. *Nature chemistry*, 5(11), 905.
- [12] Hughes, A. J., Lin, R. K., Peehl, D. M., & Herr, A. E. (2012). Microfluidic integration for automated targeted proteomic assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 5972-5977.
- [13] Vladislavljević, G. T., Khalid, N., Neves, M. A., Kuroiwa, T., Nakajima, M., Uemura, K., ... & Kobayashi, I. (2013). Industrial lab-on-a-chip: Design, applications and scale-up for drug discovery and delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 65(11-12), 1626-1663.

- [14] Soper, S. A., Ford, S. M., Qi, S., McCarley, R. L., Kelly, K., & Murphy, M. C. (2000). Peer Reviewed: Polymeric Microelectromechanical Systems.
- [15] Effenhauser, C. S., Bruin, G. J., Paulus, A., & Ehrat, M. (1997). Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices: analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Analytical Chemistry*, 69(17), 3451-3457.
- [16] Henry, A. C., Tutt, T. J., Galloway, M., Davidson, Y. Y., McWhorter, C. S., Soper, S. A., & McCarley, R. L. (2000). Surface modification of poly (methyl methacrylate) used in the fabrication of microanalytical devices. *Analytical chemistry*, 72(21), 5331-5337.
- [17] Kramer, M. S., Tange, S. M., Mills, E. L., Ciampi, A., Bernstein, M. L., & Drummond, K. N. (1993). Role of the complete blood count in detecting occult focal bacterial infection in the young febrile child. *Journal of clinical epidemiology*, 46(4), 349-357.
- [18] Severs, Y., Brenner, I., Shek, P. N., & Shephard, R. J. (1996). Effects of heat and intermittent exercise on leukocyte and sub-population cell counts. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 74(3), 234-245.
- [19] Cheung, K., Gawad, S., & Renaud, P. (2005). Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation. *Cytometry Part A*, 65(2), 124-132.
- [20] Yang, S. Y., Hsiung, S. K., Hung, Y. C., Chang, C. M., Liao, T. L., & Lee, G. B. (2006). A cell counting/sorting system incorporated with a microfabricated flow cytometer chip. *Measurement Science and Technology*, 17(7), 2001.
- [21] Holmes, D., Pettigrew, D., Reccius, C. H., Gwyer, J. D., van Berkel, C., Holloway, J., ... & Morgan, H. (2009). Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. *Lab on a Chip*, 9(20), 2881-2889.
- [22] Mudanyali, O., Tseng, D., Oh, C., Isikman, S. O., Sencan, I., Bishara, W., ... & Ozcan, A. (2010). Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications. *Lab on a Chip*, 10(11), 1417-1428.
- [23] Roy, M., Jin, G., Seo, D., Nam, M. H., & Seo, S. (2014). A simple and low-cost device performing blood cell counting based on lens-free shadow imaging technique. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 201, 321-328.

- [24] Lee, J., Kwak, Y. H., Paek, S. H., Han, S., & Seo, S. (2014). CMOS image sensor-based ELISA detector using lens-free shadow imaging platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 196, 511-517.
- [25] W. E. Tolles, "The Cytoanalyzer—An example of physics in medical research," *Trans. NY Acad. Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 250–256, Jan. 1955.
- [26] J. M. S. Prewitt and M. L. Mendelsohn, "The analysis of cell images," *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 128, no. 3, pp. 1035–1053, Jan. 1966.
- [27] K. Preston, "Computer processing of biomedical images," *Computer*, vol. 9, no. 5, pp. 54–68, May 1976.
- [28] E. Meijering, "Neuron tracing in perspective," *Cytometry A*, vol. 77, no. 7, pp. 693–704, July 2010.
- [29] M. N. Gurcan, L. Boucheron, A. Can, A. Madabhushi, N. Rajpoot, and B. Yener, "Histopathological image analysis: A review," *IEEE Rev. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 147–171, Dec. 2009.
- [30] Q. Wu, F. A. Merchant, and K. R. Castleman, *Microscope Image Processing*. Burlington, MA: Academic Press, 2008.
- [31] E. Meijering, O. Dzyubachyk, I. Smal, and W. A. van Cappellen, "Tracking in cell and developmental biology," *Semin. Cell Develop. Biol.*, vol. 20, no. 8, pp. 894–902, Oct. 2009.
- [32] Meijering, E. (2012). Cell segmentation: 50 years down the road [life sciences]. *IEEE Signal Processing Magazine*, 29(5), 140-145.
- [33] Xiao Lijun, "Moving Object Segmentation Based on Background Subtraction and Fuzzy Inference," 2011 International Conference on Mechatronic Science, Electric Engineering and Computer August 19-22, 2 011, Jilin, China.
- [34] Rita Cucchiara, Costantino Grana, Massimo Piccardi , Andrea Prati, "Detecting Moving Objects, Ghosts and Shadows in Video Streams" Massimo Piccardi is with Department of Computer Systems, Faculty of IT, University of Technology, Sydney - Broadway NSW 2007 – Australia

- [35] Mahmoud A. Mofaddel and Walaa M. Abd-Elhafiez, “Fast and Accurate Approaches for Image and Moving Object Segmentation”, Department of Mathematics and Computer Science, Faculty of Science, Sohag University, Sohag, Egypt.
- [36] Michael Teutsch and Wolfgang Kruger, “Detection, Segmentation, and Tracking of Moving Objects in UAV Videos”, 2012 IEEE Ninth International Conference on Advanced Video and Signal-Based Surveillance.
- [37] Le Sun, Ming Dai and Xiaolu Chen, “A Simple and Fast moving object segmentation Based on H.264 Compressed Domain Information Compressed Domain Information,” 2012 Fourth International Conference on Computational and Information Sciences.
- [38] Manish Khare, Swati Nigam, Rajneesh Kumar Srivastava, Ashish Khare, “CONTOURLET TRANSFORM BASED MOVING OBJECT SEGMENTATION” Proceedings of 2013 IEEE Conference on Information and Communication Technologies (ICT 2013)
- [39] R. Hartley and A. Zisserman, “Multiple-View Geometry in Computer Vision”. Cambridge University Press, 2004.
- [40] Mohan, A. S., & Resmi, R. (2014, December). Video image processing for moving object detection and segmentation using background subtraction. In 2014 First International Conference on Computational Systems and Communications (ICCSC) (pp. 288-292). IEEE.
- [41] Michael R. Pinsky, Laurent Brochard and Jordi Mancebo. “Applied Physiology in Intensive Care Medicine”. Springer. 229-238, 2007.
- [42] Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, Silamut K, Ruangveerayuth R, Hardeman MR, Kager PA, Vreeken J, White NJ. “Red cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria”. *Am J Trop Med Hyg* 60: 733–744; 1999.
- [43] Medicine Health – <http://www.medicinehealth.com/leukemia/article.html>.
- [44] Yuzhang WEI. “The Research of Urinary Sediment Visual Component Analysis Based on Fuzzy Clustering”. Nanjing Information Engineering University, 2008:3-4, 15-32.
- [45] Ran Ding. “Algorithm Research on Recognition and Classification of Microscopic Urinary Sediment Images”. Jilin University, 2006: 9-16, 20-31.

- [46] C.D. Ruberto, A.G. Dempster, S. Khan and B. Jarra. "Segmentation of Blood Image using Morphological Operators". Proceeding 15th International Conference on Pattern Recognition. vol. 3, pp. 397-400, 2000.
- [47] Tahir Rabbani and Frank van den Heuvel, "Efficient hough transform for automatic detection of cylinders in point clouds" in Proceedings of the 11th Annual Conference of the Advanced School for Computing and Imaging (ASCI '05), The Netherlands, and June 2005.
- [48] Alaa Hamouda, Ahmed Y. Khedr, and Rabie A. Ramadan." Automated Red Blood Cell counting "International Journal of Computing science, VOL. 1, NO. 2, FEBRUARY, 2012
- [49] J. Poomcokrak and C. Neatpisarnvanit "Red blood cells extraction and counting" Department of Biomedical Engineering, Mahidol University, Thailand. The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering (ISBME 2008)
- [50] M.Habibzadeh*a, A. Krzyzaka, T.Fevensa, A.Sadrb." Counting of RBCs and WBCs in noisy normal blood smear microscopic images" SPIE 7963, Medical Imaging 2011: Computer-Aided Diagnosis, 79633I (March 08, 2011); Doi:10.1117/12.878748
- [51] Sanaullah, Khan Aamir Khan, Faisal Saleh Khattak, Arslan Naseem"An Accurate and Cost Effective Approach to Blood cell count" Department of Electrical Engineering, Comsats Institute of Information Technology Wah Campus, WahCantt. Pakistan. International Journal of Computer Applications (0975 – 8887) Volume 50 – No.1, July 2012.
- [52] Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- [53] Wattamwar, R. D., & Chidrawar, M. S. Automated Blood Cell Counting System Using Customized Hough Transform.
- [54] Duda, R.O. and P.E Hart, 1972. Use of the Hough transformation to detect lines and curves in picture Commun. ACM, pp: 11-15.
- [55] Sirisak Liangwongsan, Boonraung Marungsri, Ratchadaporn Oonsivilai, Anant Oonsivilai. "Extracted Circle Hough Transform and Circle Defect Detection Algorithm" World Academy of Science, Engineering and Technology 60 2011
- [56] Kenneth. R. Castleman, Z. G. Zhu. "Digital Image Processing". Publishing House of Electronics Industry, Beijing, 1999

- [57] Rafael C. Gonzalez and Richard E. Woods. 'Digital Image Processing using MATLAB', 2nd edition. Prentice Hall, 2002. ISBN 0-201-18075-8.
- [58] Venkatalakshmi, B., & Thilagavathi, K. (2013, April). Automatic red blood cell counting using hough transform. In 2013 IEEE Conference on Information & Communication Technologies (pp. 267-271). IEEE.
- [59] Pedersen, S. J. K. (2007). Circular hough transform. Aalborg University, Vision, Graphics, and Interactive Systems, 123(6).
- [60] Yuen, H. K., Princen, J., Illingworth, J., & Kittler, J. (1990). Comparative study of Hough transform methods for circle finding. *Image and vision computing*, 8(1), 71-77.
- [61] Shapiro, L. (Ed.). (1992). *Computer vision and image processing*. Academic Press.
- [62] Mark, S. (2008). Nixon and Alberto S. Aguado. *Feature Extraction and Image Processing*. In Academic Press (p. 88).
- [63] Haddad, R. A., & Akansu, A. N. (1991). A class of fast Gaussian binomial filters for speech and image processing. *IEEE Transactions on Signal Processing*, 39(3), 723-727.
- [64] Huang, T., Yang, G. J. T. G. Y., & Tang, G. (1979). A fast two-dimensional median filtering algorithm. *IEEE Transactions on Acoustics, Speech, and Signal Processing*, 27(1), 13-18.