

**MAKİNE ÖĞRENİMİ KULLANILARAK FLÜORİŞİMA MİKROSKOPİ
RESİMLERİNDE OTOMATİKLEŞTİRİLMİŞ MİYELİN ALGILAMASINA
YÖNELİK YÖNTEM VE SİSTEM**

10

Mevcut buluş, etiketleme, sayma ve miktar ölçme yükünü düşürmek amacıyla görüntü analizi tabanlı bir yöntem ve otomatik miyelin algılamaya yönelik bir sistemdir.

**MAKİNE ÖĞRENİMİ KULLANILARAK FLÜORİŞİMA MİKROSKOPİ
RESİMLERİNDE OTOMATİKLEŞTİRİLMİŞ MİYELİN ALGILAMASINA
YÖNELİK YÖNTEM VE SİSTEM**

10

Mevcut buluş, etiketleme, sayma ve miktar ölçme yükünü düşürmek amacıyla görüntü analizi tabanlı bir yöntem ve otomatik miyelin algılamaya yönelik bir sistemdir.

1. Bir flüorışma mikroskopi resimlerinde otomatikleştirilmiş miyelin algılamaya yönelik bilgisayar ile uygulanan makine öğrenimi tabanlı yöntem olup özelliği;
 - a. Miyelin yer gerçekliklerinin elde edilmesi için miyelin bölgelerin belirlenmesi,
 - 10 b. RGB kompozit z-kesiti resminden (A) geçerek, 9x9 px boyutunda iki boyutlu spektrum-uzamsal öznitelik resminin (F), spesifik olarak $F_{(x,y,z)}$ öznitelik resminin (A)'da lokasyonda (x,y,z) her bir vokselde oluşturulduğu Öznitelik resmi Ayıklama adımı,
 - c. Resim üstünde miyelin ve miyelin dışı voksellerin Özelleştirilmiş-CNN (Evrışimli Snir Ağları) veya Arttırılmış Ağaç (İng. Boosted Tree) yöntemi ile sınıflandırılması,
 - 15 d. Resim üstünde miyelin şeklinde sınıflandırılan voksellerin görselleştirilmesi adımlarını içermesi ve söz konusu sınıflandırma adımına yönelik olarak,
 - 9x9 spektrum-uzamsal öznitelik resimlerinin, $F_{(x,y,z)}$, girdi olarak kabul edilmesi,
 - 20 • birinci evrışimli katmanın 5x5 boyutunda 32 filtre içerdiği birinci evrışimli katmanın çıktısının, ilerlemenin 2 olarak tanımlandığı, 3x3 çekirdek boyutundaki maksimum havuz katmanına girilmesi,
 - birinci evrışimli katmanı, 3x3 boyutundaki 64 filtrelili iki evrışimli katmanın ve ilerlemesi 2 olan 3x3 maksimum havuz katmanının takip etmesi,
 - 25 • 128 özelliğe sahip 2x2 evrışimli katmanın uygulanması,
 - toplu normalleştirilmenin uygulanması,
 - toplu normalleştirmeden sonra, 256 düğümlü tamamen bağlı katmanın uygulanması,
 - 150 olarak seçilen dönem ve 15 eğitim dönemi başına tekrarlamaya geçilmesi,
 - 30 • parametre boşluğunun 10^5 olarak seçilmesi ile iki düğüme sahip çıktı katmanının miyelin ve miyelin dışı sınıflarla karşılık getirilmesi, adımları **ile karakterize edilmesidir**.
2. İstem 1'e göre yöntem olup, aşağıdaki adımları içermesi **ile karakterize edilmektedir**
 - 35 • girdi olarak, 9x9 spektrum-uzamsal öznitelik resimlerinin kabul edilmesinin ardından

- 5
- kapsamlı olmayan sınıflandırma yöntemlerinden denetimli makine öğrenimi tekniklerinin bir varyantının kullanılması

10

3. Görüntülerin incelenmesi ve girdi resimlerinden daha geniş aralıklı parlaklık değerlerine sahip resimlerin elde edilmesi için her bir kanala yönelik minimum ve maksimum yoğunluk değerlerinin ayarlanması **ile karakterize edilen**, ayrıca Öznetelik resim Ayıklamadan önce bir ön işleme adımını içeren İstem 1'e göre yöntem.

15

4. İstem 1'e göre yöntemin kullanılması **ile karakterize edilen** otomatik miyelin algılamaya yönelik bir sistem.

5. Miyelin ve miyelin dışı voksellerin, miktar ölçümü için sayıldığı, İstem 1'e göre yöntem.

20

**MAKİNE ÖĞRENİMİ KULLANILARAK FLÜORİŞİMA MİKROSKOPİ
RESİMLERİNDE OTOMATİKLEŞTİRİLMİŞ MİYELİN ALGILAMASINA
YÖNELİK YÖNTEM VE SİSTEM**

10

TEKNİK ALAN

15 Mevcut buluş, etiketleme, sayma ve miktar ölçme için gereken iş yükünü azaltmak için otomatikleştirilmiş miyelin algılamasına yönelik görüntü analizi tabanlı bir yöntem ve sistem ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

20 Miyelin, Şekil 1’de görüldüğü gibi, nöronların aksonlarını saran merkezi sinir sisteminin (MSS) uzman gliyal hücrelerinin, oligodentrositlerin hücre zarlarının kolesterol bakımından zengin uzantısıdır. Aksonu çevreleyen çoklu oligodendrosit zar katmanları tarafından sağlanan yalıtım, nöronal sinyal iletiminin hızını ve verimliliğini arttırmaktadır ve nöronların sağ kalımını desteklemektedir [1, 2]. Miyelin, sinir sisteminin fonksiyonunda rol alan temel
25 bir yapıdır ve dolayısıyla, miyeline gelecek herhangi bir hasar, sinir sistemini bozarak multipl skleroz (MS) gibi hastalıklara yol açmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 2,5 milyon insan, MS hastalığından muzdariptir ve bu hastalık, en yaygın nöroinflamatuvar hastalıktır [3, 4]. Genetik ve çevre faktörlerinin bir kombinasyonu, bağışıklık sistemini MSS miyeline saldırması ve yok etmesi için tetiklemektedir. Mevcut tedaviler, bağışıklık sistemini
30 baskılayarak demiyelinizasyonu azaltmakla birlikte, hastalığı tedavi etmemektedir [1, 3, 4]. Miyelin rejenerasyonunu (remiyelinizasyon) teşvik eden kimyasal bileşiklere yönelik gelişim aşamasında araştırmalar olmakla birlikte, hâlihazırda klinik olarak kullanılan hiçbir ilaç bulunmamaktadır [3, 5].

35 İlaç keşif süreci, sıklıkla, hastalıkla ilgili bir deneyde binlerce veya on binlerce bileşiğin taranması ile başlamaktadır [5] MS tedavisine yönelik bileşik taramalarında, oligodentrositlerin olgunlaşma durumunun ölçülmesi, sıklıkla miyelinizasyonu doğrudan

5 ölçmek yerine kullanılmaktadır [5, 6]. Olgun oligodentrositler, gen ekspresyonu ve/veya hücrel morfoloji aracılığıyla tanımlanmaktadır. Görüntü alma ve basit görüntü analizi, tarama başına 1000'i aşabilen pozitif isabetleri belirlemek için otomatikleştirilebilmektedir [5, 6, 7]. Ancak, daha yakından incelendiğinde, bu bileşiklerin yalnızca küçük bir kısmı esasen remiyelinizasyonu arttırmaktadır. Yüz binlerce kimyasal kapsayan yayımlanmış sekiz

10 taramadan yalnızca beş molekülün laboratuvar hayvanlarında remiyelinizasyonu arttırdığı keşfedilmiştir [5]. Bu yüksek yıpranma oranı, vekil olarak kullanılan oligodentrosit olgunlaşmasının yerine miyelinin doğrudan sayılması ve ölçülmesi durumunda MS ve remiyelinizasyon ilaç keşfinin daha verimli olabileceğini önermektedir. Bununla birlikte, mevcut durumda, miyelin sayımı ve ölçümü, çok sayıda bileşiğin taranmasını aksatan, zaman

15 alıcı ve yoğun emek gerektiren manüel iştir [5, 8, 9]. Dolayısıyla, miyelinin hızlı ve etkili bir şekilde sayılması ve ölçülmesi, yüksek içerikli görüntü tabanlı ilaç taramalarına olanak sağlayarak MS ve diğer demiyelinizan hastalıklara yönelik ilaç keşfini hızlandıracaktır [5].

Miyelin sayılması ve ölçümünün otomatikleştirilmesi, miyelinin oligodentrosit uzantıları ve nöron aksonunun örtüşen bölgeleri şeklinde gözlemlenmesinden dolayı zorlayıcı bir işlemdir

20 (Şekiller 1a, 1b, 1c). Uzman araştırmacılar, boyut, şekil, örtüşen bölge uzunluğu ve süreklilik gibi kriterler kullanarak gerçek miyelinden rastgele örtüşen bölgeleri (Şekil 1d) ayırt edebilirler. Şimdiye kadar olan otomatikleştirme çabaları, flüorışma resimlerinden eş lokalize, üst üste gelen, piksellerin belirlenmesine odaklanmıştır [9, 10]. Bu tür yöntemlerin büyük veri kümelerinden başarılı bir şekilde miyelin miktarını ölçmesi ve bir hastalık

25 modelinde ve ilaç tedavisinden sonra miyelinizasyon oranlarındaki değişiklikleri algılamasına rağmen [9, 11], örtüşen piksellerin miyelin şeklinde tanımlanması, hücrel uzantılar arasındaki rastgele eş lokalizasyondan dolayı yanlış pozitif sonuçları arttırmaktadır (Şekil 1d). Miyelinin z boyutunda uzanabilmesi ve tek görüntüleme düzlemlerinde yalnızca küçük bir çıkıntı şeklinde görülebilmesinden dolayı basit bir boyut filtresi etkili değildir. Dolayısıyla,

30 boyut tabanlı bir filtre, rastgele örtüşmelerin yanı sıra miyelini de ortadan kaldırabilmektedir ve toplam miyelinin eksik tahmin edilmesine yol açmaktadır. Miyelin tanımlamada örtüşen bölgelerin şeklini ve boyutunu kullanabilmek amacıyla, makine öğrenimi tabanlı görüntü sınıflandırmasına yönelinmiştir. Makine öğrenimi tabanlı yaklaşımlar, veri içindeki görünmeyen ilişkileri keşfetmektedir [12, 13]. Dolayısıyla, miyelin algılama sorunu için

35 mükemmel bir eşleşme teşkil etmektedir. Biyo-görüntü analizinde makine öğrenimine dayalı yöntemlerin gelişiminden esinlenerek, bir LeNet algoritması tabanlı miyelin algılama yöntemi olan DeepMQ geliştirilmiş ve 10768 tane görüntüden oluşan bir veri tabanında %93,38

5 oranında doğruluk elde edilmiştir [14]. Otomatik miyelin sayımı ve ölçümüne yönelik
ihtiyacın desteklenmesi [18] amacıyla ayrıca nano liflerde oluşan miyelin benzeri yapıları
algılamak için U-Net tabanlı algoritma geliştirilmiştir. Nano lifler, birbiriyle paralel olarak
hizalanabilmeleri ve daha kolay sınıflandırmaya olanak sağlamalarından dolayı yapay akson
ikameleri şeklinde kullanılmıştır. Ancak bu yöntemin genelleştirilebilirlik özelliğini
10 sınırlamaktadır çünkü aksonlar birbiriyle çapraz kesişen birçok yönde uzarlar.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Miyelin algılamaya yönelik makine öğrenimi tekniklerinin etkililiğini daha fazla araştırmak
15 için bir özelleştirilmiş-CNN (Evrişimli Sinir Ağları) yöntemi geliştirilmiş ve genişletilmiş
veri kümesinde diğer sınıflandırma yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Dahası, kullanıcının
birkaç makine öğrenimi yöntemi arasında seçim yapmasına olanak sağlamak için, ek olarak
açıklanan veri kümesinin çeşitli boyutlardaki eğitim/test bölünme oranlarıyla birlikte beş
farklı denetimli makine öğrenimi tekniğinin miyelin algılama performansları (23 farklı
20 varyant; Tablo 1) değerlendirilmiştir. Buna ek olarak, karşıtlık pekiştirmeden (İng. “contrast
enhancement”) oluşan bir ön işleme adımı getirilmiş ve bunun farklı yöntemlerin algılama
performansı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu test senaryoları arasında, 15452 önceden
işlenmiş görüntü üstünde %98,84 $\pm$ 0,09 oranındaki en yüksek doğruluk değeri, Arttırılmış
Ağaç (İng. Boosted Tree) yöntemi ile elde edilmiş ve özelleştirilmiş-CNN ise %98,46 oranla
25 buna yakın ikinci yüksek değer olmuştur. Bu doğruluk değeri, %50 eğitim ve %50 test
kümeleri şeklinde etiketlenmiş toplam bölümlendirme için elde edilmiştir. Son olarak,
sınıflandırılmış sonuçlar, uzman ve kullanıcıların değerlendirmesi için resimlerde
görselleştirilmiştir.

30 Miyelin algılama, birkaçı yukarıda bahsedilen, ve bununla sınırlı olmamak üzere, tercih edilen
bir yapılandırmada ve/veya benzerinde bulunan dizüstü bilgisayar, kişisel bilgisayar, sunucu
veya mikro denetleyiciler gibi uygun bilgisayar platformlarında çalışan güdümlü makine
öğrenimi teknikleri ile elde edilmiştir.

35 Yöntemin temel adımları, Şekil 2’de gösterilmektedir. Fare kök hücresinden elde edilen nöral
hücrelerin resimleri, Zeiss LSM konfokal mikroskop ile alınmaktadır ve bir opsiyonel adım
olan ön işleme, karşıtlık pekiştirme için bu resimlere uygulanabilmektedir. Bir uzman, bu

5 resimlerden manüel olarak yer gerçekliklerini ayıklamıştır. 9x9 özelliğindeki resimler oluşturulmuş ve yer gerçekliklerine bağlı olarak pozitif ve negatif şeklinde sınıflandırılmıştır.

ŞEKİLLER

10

Şekil 1: Ortak kültürlerde ve şematik şekilde miyelin ve miyelin dışı örtüşmelerin gösterimi.

a) Miyelinleştirici ortak kültürlerin bir örnek RGB kompozit, maksimum yoğunluklu projeksiyon resmi. Miyelin, oligodentrosit uzantısının hücre zarı ve nöronun aksonunun örtüşen bölgesi olarak gözlemlenmektedir ve ayrıca miyelin dışı örtüşmeler, kutular ile
15 vurgulanmaktadır. Resim, 5 optik z kesitinin projeksiyonudur. b) Miyelin bölgelerini (parantez) ve miyelin dışı örtüşmeleri (elips) vurgulayan ortak kültürün bir şemasını temsil eder. Kutu içine alınmış alanların daha yüksek ölçüde büyütülmüş resimleri, c) Miyelin (parantez), d) miyelin dışı örtüşmeleri gösterir. Üst elips: bir çekirdek mevcudiyeti, bu eş lokalizasyonu örtüşen hücre gövdesi şeklinde tanımlar. Alt elips: kısa ve kesintili örtüşmeler.

20 **Şekil 2:** Buluşun yönteminin akış şemasıdır.

Şekil 3: Her bir voksele karşılık gelen bir spektrum-uzamsal öznitelik resmi, $F_{(x,y,z)}$, oligodentrosit, akson ve çekirdek kanallarında daha küçük 9 blok, $D_{(z,w)}$, bir orta voksel ve bunun hemen yakınındaki 26 vokselde oluşmaktadır. Bu dokuz bloktan biri, yani $D_{(z,2)}$ gösterilmektedir

25 **Şekil 4:** Pozitif ve negatif spektrum-uzamsal öznitelik resmi örnekleri. a) Pozitif örnek: kanallar arasındaki örtüşmeyi gösteren bir pozitif resim. b) Negatif örnek: Negatif sınıflandırmaya yol açan örtüşme çok daha küçüktür. c) Negatif örnek: kanaldaki sinyal, bu resmi örtüşen hücre gövdesi şeklinde tanımlar.

Şekil 5: Özelleştirilmiş-CNN mimarisi (ayrıca Tablo 2'ye bakınız)

30 **Şekil 6:** Standart sapmalarıyla birlikte seçilen sınıflandırıcılara yönelik Test Doğruluklarının, karşılaştırma amacıyla grafiği çizilmiştir.

Şekil 7: Özelleştirilmiş CNN ile algılanan miyelinin bir örnek resimde son görselleştirilmesi.

a) Özgün resim. Parantez, miyelini gösterir. Daire işareti, yanlış pozitif piksel alanını işaretler. 5 yığın, maksimum yoğunlukta yansıtılmıştır. b) özgün resimde uzman
35 tarafından işaretlenen yer gerçeklikleri gösterilmiştir. c) Özelleştirilmiş-CNN aracılığıyla miyelin şeklinde sınıflandırılan tüm pikseller.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Görüntü Alma

- 10 Kısaca, oligodentrositler ve nöronlardan oluşan miyelinleştirici ortak kültürler, 15 dakika boyunca %4 paraformaldehit-PBS’de fikse edilmiş ve PBS içinde Triton X-100 (%0,1) ve at serumu (%10) ile bloke edilmiş ve geçirgen hale getirilmiştir. Hücreler, sırasıyla nöronları ve oligodentrositleri işaretlemek için 1:1000 fare veya tavşan anti-beta-tubulin III (anti-TUJ1) (Covance) ve 1:50 sıçan anti-miyelin temel protein (anti-MBP) (Serotec) primer antikorlarla
- 15 gece boyunca inkübe edilmiştir. Çekirdekleri görselleştirmek için 4’,6-Diamidin-2’-fenilindol dihidroklorür (DAPI) (Sigma) kullanılmıştır [9].

- Resimler, Zeiss LSM 710 veya 780 konfokal mikroskoplarda, beş bağımsız deneyin deneysel alanının tamamını (yaklaşık 2mmx7mm) kapsayan kutucuklar şeklinde alınmıştır. 30 ila 50
- 20 μm olan Z eksen, 1 μm aralıklı optik z-kesitleri ile kapsanmıştır. %10 örtüşmeye sahip kutucuklar, beş bağımsız deneyin deneysel alanının tamamını kapsayan yaklaşık 2Kx8K px resimleri elde etmek amacıyla Zen software isimli yazılımda (Zeiss) birbiriyle birleştirilmiştir. Resimler, sırasıyla , MBP antikor (oligodentrositler), TUJ1 antikor (nöronlar) ve DAPI’ye karşılık gelen 8 bit ile nicelenmiştir

25

- RGB kompozit z-kesit resmi, A , $A(x,y,z,w)$ şeklinde belirtilmektedir ve burada $x \in \{1, \dots, X\}$, $y \in \{1, \dots, Y\}$, $z \in \{1, \dots, Z\}$, ve $w \in \{1, 2, 3\}$. olmaktadır. A ‘nın boyutu, $X \times Y \times Z \times 3$ olmaktadır. 447x373px boyutundaki belirli z kesiti ve uzamsal lokasyona karşılık gelen bir örnek RGB-kompozit resim, Şekil 1a’da sunulmaktadır ve burada oligodentrosit,
- 30 nöron ve çekirdeklere karşılık gelen kanallar, sırasıyla R, G ve B kanalları ile temsil edilmektedir.

Ön İşleme

- 35 Algılama doğruluğunun arttırılmasına yönelik bir opsiyonel adım olan ön işleme aşamasında, karşıtlık pekiştirme işlemi, bir uzman tarafından ImageJ platformunda her bir kanal için gerçekleştirilmiştir [15]. Uzman, resimleri gözle incelemiş ve her bir kanal resmine yönelik

5 doğrusal genişletme parametrelerini (minimum ve maksimum yoğunluk değerleri) ayarlamıştır. Ön işleme aşaması, girdi resimlerinden daha geniş aralıklı parlaklık değerlerine sahip resimler vermiştir. Bu, miyelin algılamaya yönelik ek analizi kolaylaştırmıştır. Karşıtlık pekiştirme aşamasını öznitelik resmi ayıklama işlemi takip etmiştir.

10 Miyelin Yer Gerçekliklerinin Belirlenmesi

Miyelin yer gerçekliklerini belirlenmesi işlemi, zahmetli bir iştir ve bu çalışmanın tek motivasyonu, bu işlemin otomatikleştirilmesidir. Yine de, otomatikleştirilmiş miyelin algılama düzenlerinin performansını değerlendirmek için, miyelin bölgelerinin manüel olarak
15 belirlenmesi ve miyelin yer gerçekliklerinin elde edilmesi gerekmektedir.

Kolaylık olması açısından, miyelin sayımı ve ölçümüne yönelik daha önceki bir çalışmanın, “Bilgisayar destekli Miyelin Değerlendirme (CEM) yazılımı”, sonuçları kullanılmıştır [9]. CEM yazılımının ikili çıktı resimleri, her bir z kesitine yönelik aday miyelin piksellerini temsil etmiştir. Uzman, RGB-kompozit z kesiti resmini titizlikle incelemiş ve aday pikselleri
20 tutma veya çıkarma konusunda karar vermek için bu resmi, CEM yazılımı çıktısıyla eş zamanlı olarak karşılaştırmıştır. Bu şekilde yaparak uzman, miyelin piksellerinin z eksenini boyunca olan sürekliliğinin ve kanallar boyunca uygunluğunun karşılandığından emin olmuştur. Sonuç olarak, miyelin yer gerçeklikleri elde edilmiştir.

Mevcut buluş, flüorışıma resimlerinin edinilmesi yönteminden ve kaynağından bağımsız
25 işlemektedir. Bu şekilde mevcut buluş, diğer herhangi araç vasıtasıyla edinilen flüorışıma resimleri üstünde uygulanabilmektedir.

Öznitelik resmi Ayıklama

30 Miyelin sayımı ve ölçümü alanındaki uzmanlık kullanılarak, 9×9 px boyutundaki yeni bir iki boyutlu spektrum-uzamsal öznitelik resmi, F getirilmiştir. RGB kompozit z kesiti resminden, A , çaprazlama geçen bir spesifik $F_{(x,y,z)}$ öznitelik resmi, kesit resminde, A , lokasyonda (x, y, z) her bir vokselden oluşmuştur [14]. Spektrum-uzamsal öznitelik resmi, $F_{(x,y,z)}$, lokasyondaki (x, y, z) voksele ve hemen yakınındaki 26 komşu voksele karşılık gelen kanal yoğunluk
35 değerlerini içermektedir (Şekil 3).

Görünürde öznitelik resmi, $F_{(x,y,z)}$ belirli bir z kesiti ve kanal, w , çifte (z,w) karşılık gelen, 3×3 px boyutunda daha küçük 9 bloktan, $D_{(z,w)}$, oluşmuştur. Öznitelik resminin bu belirli bileşimi,

5 miyelin piksellerinin z eksenı boyunca sürekliliği ve kanallar boyunca uyumluluğunun ortaya çıkarılmasını mümkün kılmıştır. Spektrum-uzamsal öznitelik resmi $F_{(x,y,z)}$ ve z kesiti-kanal bloğu $D_{(z,w)}$ arasındaki uygunluk, řu şekilde verilmektedir:

$$F_{(x,y,z)}(c,d) = D_{(z+(\lceil \frac{c}{3} \rceil - 2), \lceil \frac{d}{3} \rceil)} ([(c-1) \bmod 3] + 1, [(d-1) \bmod 3] + 1) \quad (1)$$

Burada c ve d , $\{1,2,\dots,9\}$ kumesinden değerler alır.

10 Benzer şekilde, z kesiti-kanal bloğu D ile RGB kompozit z kesiti resmi A arasındaki uygunluk, řu şekilde verilmektedir:

$$D_{(z,w)}(a,b) = A(x + (a-2), y + (b-2), z, w) \quad (2)$$

burada a , b , ve w , $\{1,2,3\}$ kumesinden değerler alır.

Formöl (1) ve (2)'den aşağıdaki formöl elde edilmektedir:

$$F_{(x,y,z)}(a,b) = A(x + (((c-1) \bmod 3) + 1) - 2, y + (((d-1) \bmod 3) + 1) - 2, (z + (\lceil \frac{c}{3} \rceil - 2)), \lceil \frac{d}{3} \rceil). \quad (3)$$

15

bu formöl, $A_{(x,y,z,w)}$ ve $F_{(x,y,z)}$ arasındaki uygunluğu temsil eder.

Sınıflandırma

20 Tercih edilen bir yapılandırmada, elde edilen iki boyutlu spektrum-uzamsal öznitelik resimleri, $F_{(x,y,z)}$, sınıflandırma yapmak için Derin ğrenme, Ayırtaç ve Bağlanım (İng. “Regression”), K-En Yakın Komşu (KNN), Karar Ağacı ile Destek Vektör Makineleri (SVM) gibi beş temel denetimli makine öğrenimi tekniğinin 23 adet farklı alt türüne girdi olarak verilmiştir. Kullanıcı, en iyi performans sergileyen tekniği seçmektedir özgürdür. Sistem,

25 burada bahsedilenlerin dışında diğer denetimli makine öğrenimi tekniklerini barındırmak için genişletilebilmektedir.

Miyelin sınıflandırmaya yönelik en verimli sınıflandırıcıyı bulmak için, miyelin piksellerini sınıflandırmak ve en yaygın olarak kullanılan makine öğrenimi yöntemleriyle karşılaştırmak

30 için bir özelleştirilmiş-CNN geliştirilmiştir. Tablo 1, bu çalışmada kullanılan sınıflandırma yöntemlerinin tamamını göstermektedir. İşlenmemiş ve önceden işlenmiş resimlere yönelik bu sınıflandırıcılarda model optimizasyonu kullanılmıştır.

Derin Öğrenme Yöntemleri	Karar Ağacı
LeNet	Karmaşık Ağaç
Özelleştirilmiş Evrişimli Sinir Ağı	Orta Karmaşıklıkla Ağaç
Ayırtaç ve Bağlanım	Basit Ağaç
	Basit Ağaç
	Rasgele Alt Örneklemeli Arttırılmış Ağaç (İng. RUSBoosted Tree)
Doğrusal Ayırtaç	Arttırılmış Ağaç
İkinci Derece Ayırtaç	Torbalanmış Ağaç
Altuzay Ayırtaç	
Mantıksal Bağlanım (İng. “Logistic Regression”)	Destek Vektör Makineleri (İng.” Support Vector Machines – SVM”)
KNN	Doğrusal SVM
İnce KNN	İkinci derece SVM
Orta KNN	Üçüncü Derece SVM
Kaba KNN	İnce Gauss SVM
Kosinüs KNN	Orta Gauss SVM
Ağırlıklı KNN	Kaba Gauss SVM

Tablo 1: Tercih edilen yapılandırmada kullanılabilen sınıflandırma yöntemlerinin, diğer bir ifadeyle, denetimli makine öğrenimi tekniklerinin kapsamlı olmayan listesi.

- 10 CNN mimarisi, girdi olarak 9 x 9 spektrum-uzamsal öznitelik resmini $F_{(x,y,z)}$, kabul etmektedir. Özelleştirilmiş-CNN mimarisinin parametreleri ve mimari yapısı, Tablo 2 ve Şekil 5’te gösterilmektedir. Birinci evrişimli katman, 5 x 5 boyutunca 32 filtre içermektedir. Bu evrişimli katmanın çıktısı, 3 x 3 ilerlemeli çekirdek boyutuna sahip maksimum havuz katmanına girmektedir ve 2 şeklinde tanımlanmaktadır. Bu katmanı, ilerlemesi 2 olan 3 x 3 maksimum havuz katmanı ve 3 x 3’lük 64 filtre boyutuna sahip iki evrişimli katman takip etmektedir. Toplu Normalleştirme işleminden önce, 128 özelliğe sahip 2 x 2 evrişimli katman ve toplu normalleştirmeden sonra 256 düğümlü tamamen bağlı katman uygulanmaktadır. Toplu normalleştirme, daha hızlı yakınsama için kullanılmaktadır [17]. Dönem başına tekrarlama, 150 olarak seçilmiş ve 15 eğitim dönemi geçilmiştir. Özelleştirilmiş-CNN

- 5 mimarisinin çıktı katmanı, miyelin ve miyelin dışı sınıflara karşılık gelen iki düğüme sahiptir. CNN mimarisinde parametre sayısı 10^5 mertebesinde olmaktadır.

Sonuçlar

- 10 Kullanılan veri kümesi, hemen hemen eşit sayılarda pozitif ve negatif öznitelik resimleri içermiştir (Tablo 3). Mevcut buluş, Intel 7700HQ işlemci, 16 GB RAM, Asus GeForce GTX1080TI ekran kartına sahip bir kişisel bilgisayarda uygulanabilmektedir. Biyolojik örneklerle yönelik, özellikle miyeline yönelik yer gerçekliklerinin belirlenmesi genellikle zordur [10, 18]. Eğitim için gerekli minimum miyelin yer gerçeklikleri miktarını belirlemek için, Veri kümesinin %10, %25, %50, %75 ve %90'ı eğitim için kullanılmış ve veri kümesinin geri kalan kısmı, test için kullanılmıştır. Her bir sınıflandırıcının test doğruluğu, 10 çalışmanın ortalaması alınarak hesaplanırken, standart sapma, seçilen sınıflandırıcılara yönelik varyasyonu ölçmek için hesaplanmıştır (Tablolar 4 ve 5). Ön işleme etkisi, Tablo 4 ile Tablo 5'in karşılaştırılması ile gözlemlenebilmektedir.

20

Pozitif Örnek Sayısı	Negatif Örnek Sayısı
15489	15416

Tablo 3: Mevcut buluşun bir yapılandırmasında kullanılan bir veri kümesindeki örneklerin sayısı.

Test Resimleri (%)	Eğitim Resimleri (%)	Test Doğrulukları (%)					
		Altuzay Ayırtaç	Ağırlıklı KNN	Üçüncü Derece SVM	Arttırılmış Ağaç	LeNet	Özelleştirilmiş -CNN
10	90	75.07 ±0.87	91.94 ±0.6	94.51 ±0.51	95.91 ±0.31	94,00 ± 0,62	95.93 ±0.5
25	75	75.01 ±0.33	91.68 ± 0.33	94.64 ±0.64	95.94 ± 0.35	93.45 ± 1.65	95.77 ±0.29
50	50	74.98 ± 0.21	91.09 ±0.2	94.02 ± 0.3	95.87±0.13	93.74 ± 0.88	95.51 ±0.22
75	25	74.79 ±0.19	89.88 ± 0.35	93.21 ±0.41	95.76 ± 0.23	92.75 ± 1.41	95.01 ±0.19
90	10	74.53 ±0.23	88.20 ± 0.12	91.58 ±0.33	95.37 ±0.13	90,76 ± 2.19	94.39 ± 0.4

- 25 Tablo 4: İşlenmemiş Resimlere ilişkin seçilen sınıflandırıcılara yönelik Test Doğrulukları

		Test Doğrulukları (%)					
Test Resimleri (%)	Eğitim Resimleri (%)	Doğrusal Ayırtaç	Ağırlıklı KNN	Üçüncü Derece SVM	Arttırılmış Ağaç	LeNet	Özelleştirilmiş -CNN
10	90	87.76 ± 0,62	96.49 ± 0.4	98.26 ± 0.31	98.83 ± 0.25	97,06 ± 0.71	98.5 ± 0.29
25	75	87.72 ± 0.33	96.42 ± 0.10	97.99 ± 0.11	98.8 ± 0.09	97.04 ± 0.54	98.46 ± 0.16
50	50	87.5 ± 0.2	96.09 ± 0.15	97.88 ± 0.16	98.84 ± 0.09	96,82 ± 0,63	98.46 ± 0.11
75	25	87.44 ± 0.24	95.47 ± 0.94	97.55 ± 0.2	98.77 ± 0.1	96.25 ± 0.92	98.12 ± 0.25
90	10	87.43 ± 0.18	94.42 ± 0.19	96.63 ± 0.31	98.66 ± 0.05	95.74 ± 0.53	97.66 ± 0.26

5

Tablo 5: Ön işleme yapılmış Resimlere ilişkin seçilen sınıflandırıcılara yönelik Test Doğrulukları

Test/eğitim yüzdeleri (Tablo 5) ve standart sapmaları bakımından seçilen sınıflandırıcılara yönelik test doğruluklarının grafiği Şekil 6'da çizilmiştir. Eğitim verilerinin arttırılması, beklendiği gibi CNN'ler üstünde pozitif etkiye sahip olmuş ve performans oranlarını arttırmıştır. Ayrıca diğer sınıflandırıcıların doğrulukları da artan eğitim verileriyle artma eğiliminde olmuştur. Arttırılmış Ağaç, daha düşük standart sapma ve daha az eğitim verileriyle birlikte diğer sınıflandırıcılardan daha yüksek performans elde etmiş ve buna en yakın sonuçlar, özelleştirilmiş-CNN ile elde edilmiştir. Ön işlemenin tüm yöntemler üstünde etkili olduğu keşfedilmiştir (Tablolar 4 ve 5'i karşılaştırınız).

Arttırılmış Ağaç ve özelleştirilmiş-CNN sınıflandırma sonuçlarının karışıklık matrisi değerleri, Tablo 6'da sunulmaktadır. Karışıklık matrisine göre (%50 - %50 vakasında), performans ölçü birimleri (Hassasiyet, Geri Çağırma, F-skoru, Hata ve Doğruluk) hesaplanmış ve sonuçlar, Tablo 7'de sunulmuştur. Bu parametreler, aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$Hassasiyet = \frac{TP}{TP + FP} \times 100 \quad (4)$$

$$Geri \text{ Çağırma} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100 \quad (5)$$

$$F - Skoru = 2 \times \left(\frac{Hassasiyet \times Geri \text{ Çağırma}}{Hassasiyet + Geri \text{ Çağırma}} \right) \quad (6)$$

$$Hata = \frac{FP + FN}{TP + TN + FP + FN} \times 100 \quad (7)$$

$$Doğruluk = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \times 100 \quad (8)$$

5

burada, TP, TN, FP, FN sırasıyla Gerçek Pozitif, Gerçek Negatif, Yanlış Pozitif ve Yanlış Negatif karşılık gelmektedir.

10

Tahmin	Arttırılmış Ağaç		Özelleştirilmiş-CNN		Test Sayısı/Eğitim Resimleri
	Gerçek Değerler				
		+	-	+	
+	1544	5	1534	15	3095 / 27&40
-	31	1515	31	1515	
+	3860	12	3843	29	7737 / 23198
-	81	3784	90	3775	
+	7734	10	7672	72	15474 / 15461
-	169	7561	167	7563	
+	11590	17	11391	216	23262 / 7733
-	269	11326	219	11376	
+	13929	11	13839	101	27854 / 3081
-	363	13551	549	13365	

15

Tablo 6: En iyi iki sınıflandırıcının karışıklık matrisleri

		Arttırılmış Ağaç					Özelleştirilmiş-CNN				
Test Resimleri (%)	Eğitim Resimleri (%)	Hassasiyet (%)	Geri Çağırma (%)	F-Skoru (%)	Hata (%)	Doğruluk (%)	Hassasiyet (%)	Geri Çağırma (%)	F-Skoru (%)	Hata (%)	Doğruluk (%)
10	90	99.67	98.03	98.85	1.16	98.83	99.03	98.02	98.5	1.49	98.5
25	75	99.69	97.94	98.81	1.2	98.8	99.25	97.71	98.48	1.54	98.46
50	50	99.87	97.86	98.86	1.16	98.84	99.07	97.87	98.47	1.54	98.46
75	25	99.85	97.7	98.78	1.23	98.77	98.14	98.11	98.13	1.87	98.12
90	10	99.92	97.46	98.68	1.34	98.66	99.28	96.18	97.71	2.33	97.66

Tablo 7: Farklı bölünmüş vakalara yönelik en iyi performans sergileyen sınıflandırıcıların test doğrulukları

Son olarak, özelleştirilmiş-CNN ile algılanan miyelin, özgün kompozit resimlerde görselleştirilmiştir (Şekil 7). Algoritma, miyelini oligodentrositler ve aksonlar arasında kesintisiz örtüşme (parantez) şeklinde doğru bir biçimde algılamıştır. Ancak, ayrıca kesintili piksel, miyelin olarak sınıflandırılmıştır (daire). Bu son görselleştirme adımı, sonuçların kullanıcı tarafından değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Sinir sisteminin bölünmez bir parçası olan miyelin, MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda zarar görmektedir [1, 3, 4, 5]. Bununla birlikte, MS hastalığına karşı halihazırda mevcut tedaviler, miyelini yeniden oluşturmamaktadır. Yeniden miyelinleştirici ilaçların keşfedilmesindeki ana engel, kimyasal taramalarda miyelin miktarının ölçülmesi zorluğudur [5, 8, 9, 10]. Otomatik miyelin miktar ölçümü, sürecin hızını ve verimliliğini geliştirebilmekle birlikte halen, minimum kullanıcı girişi ile ve bir uzman gibi doğru biçimde performans sergileyebilen bir platformun oluşturulması zordur.

Mevcut çalışmada, yeni tasarlanmış özelleştirilmiş-CNN dahil olmak üzere 23 farklı makine öğrenimi yöntemi, işlenmemiş ve önceden işlenmiş resimlerde miyelin algılanmasına yönelik olarak değerlendirilmiştir. Genel olarak, Arttırılmış Ağaç ve özelleştirilmiş-CNN yöntemi, hem işlenmemiş hem de önceden işlenmiş resimlerde en yüksek doğruluk değerlerini elde

5 etmiştir (Tablolar 4 ve 5). Ayırtaç & Regresyon yöntemleri, önceden işlenmiş resimlerde bile %90'nın altında bir doğrulukta kalarak daha kötü bir performans sergilemiştir. Yöntemlerin tamamına yönelik olarak, karışıklık pekiştirme ile yapılan ön işlem, doğruluğu yaklaşık %13 kadar arttırmıştır. En iyi performans sergileyen yöntemler, ön işlemden sonra %98'in üzerinde doğruluğa ulaşmıştır. Mevcut çalışmada, resimlere yönelik optimum karışıklık seviyeleri, uzman tarafından belirlenmiştir. Gelecekteki miyelin miktarını ölçme iş akışları, bu ön işleme adımının otomatikleştirilmesinden faydalanacaktır.

Buna ek olarak, etiketlenmiş eğitim verilerinin miktarının, 5 farklı vakaya yönelik 23 makine öğrenimi yönteminin performansını nasıl etkilediği değerlendirilmiştir. Beklendiği gibi, eğitim resimlerinin sayısının artırılması, genel olarak doğruluğu arttırmıştır. Bununla beraber, daha küçük eğitim kümesi, Karar Ağacı tabanlı yöntemlere yönelik yeterince doğru miyelin sınıflandırması getirmiştir. Miyelin sayımı ve ölçümüne yönelik olarak, çabalar, derin öğrenme tabanlı yaklaşımlara odaklanmıştır [15, 18]. Ancak, bu çalışmada, CNN tabanlı yöntemler, söz konusu veri kümesine yönelik Arttırılmış Ağaç tabanlı miyelin miktar ölçme yöntemiyle birlikte iyi bir performans sergilememiştir (Tablo 5).

Karışıklık matrisi (Tablo 6), her bir bölünmüş vakaya yönelik olarak pozitif resimlerin negatif resimlerden daha doğru bir şekilde algılandığını göstermektedir. Buna ek olarak, yanlış negatiflerin sayısı, yanlış pozitiflerin sayısından daha fazla olmuştur. Bu, hem Arttırılmış Ağaç hem de özelleştirilmiş-CNN yönteminin miyelin bölgelerini gözden kaçırdığını göstermektedir. Arttırılmış Ağaç ve özelleştirilmiş-CNN yöntemi, aynı performansı sergilerken, Arttırılmış Ağaç yöntemi, %10 - %90 vakasında pozitiflerde çok iyi olmuştur. Özelleştirilmiş-CNN yöntemi, %50 - %50 ve %75 - %25 vakasında negatif resimlerde daha doğru olmuştur. Her iki algoritmaya yönelik kaçırılan miyelin bölgelerinin kıyaslanması ve karşılaştırılması, gelecekte daha iyi miyelin algılama takımlarının tasarlanmasına yardımcı olabilmektedir.

Biyologlar, miyelin niteliğini görsel olarak değerlendirmeyi tercih eder. Bu, biyologların yalnızca sonuçları doğrulamasına değil, aynı zamanda uygulanan tedavilerin etkisini değerlendirmelerine olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla, özgün resimler üzerinde makine öğrenim algoritmaları aracılığıyla algılanan miyelin burada görselleştirilmiştir. Dahası, görselleştirme adımı, miyelinin stereolojik olarak yeniden oluşturulmasında erken bir

5 adımdır. Gelecekte, makine öğrenimi ile algılanan miyelinin yeniden oluşturulmasından miyelin uzunluğu ve miyelin bölgelerinin sayısı gibi morfolojik parametrelerin ayıklanması ve miktarının belirlenmesi planlanmaktadır.

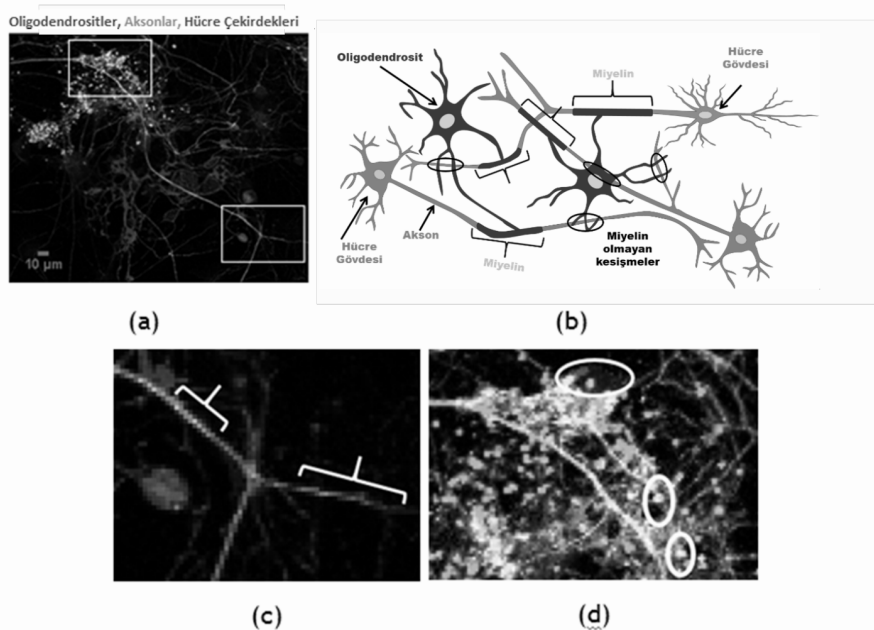
10 Sonuç olarak, otomatik miyelin algılamaya yönelik makine öğrenimi tabanlı bir yöntem ve bir sistem sunulmaktadır. Manüel miyelin miktar ölçümüne kıyasla, önerilen yöntem ve sistem, ciddi derecede daha hızlıdır. 1 saat içerisinde bir uzman, yaklaşık 25 miyelin segmentini ayıklayabilmektedir. Buna kıyasla, Arttırılmış Ağaç yöntemi, 8,27 saniyede 33 ila 47 segment işlemektedir ve özelleştirilmiş-CNN yöntemi ise 1,04 saniyede 33 ila 47 segment işlemektedir. Her iki denetimli makine öğrenim tekniği, tercih edilen yapılandırmada 15 uygulanabilmektedir. Böylelikle binlerce resim, çok makul bir zaman dilimi içerisinde sınıflandırılabilir ve miyelin onarım kapasitesine yönelik kimyasalların taranmasına olanak sağlamaktadır.

20 Miyeline benzer şekilde, çoğu biyolojik yapı, 3 boyutta genişlemektedir ve çoklu kanallarda bilgi taşımaktadır [18, 19]. Bu nedenle burada geliştirilmiş olan yöntem diğer biyolojik yapıların flüorışma mikroskopi resimlerinde algılamasının otomatikleştirilmesinde de uygulanabilir. Bu uygulamalar için farklı yer gerçekleri ile sistemin yeniden eğitilmesi gereklidir.

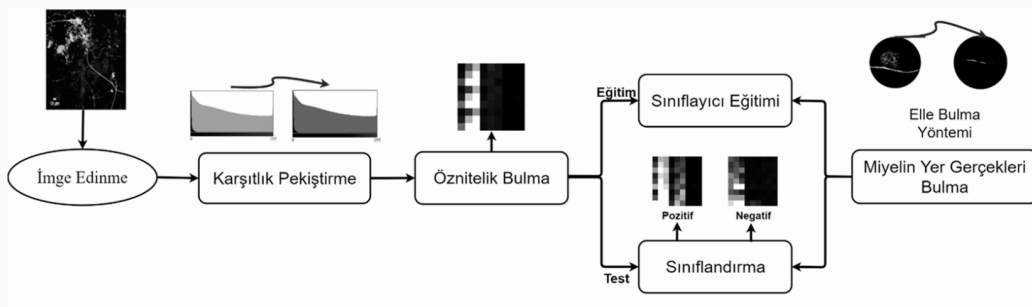
5 Referanslar

- [1] F. I. Aydınli, E. Celik, B. K. Vatandaslar, B. E. Kerman, Myelin disorders and stem cells: as therapies and models, *Turkish Journal of Biology* 40 (5) (2016) 1068–1080.
- [2] Simons, M., & Nave, K. A. (2016). Oligodendrocytes: myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(1), a020479.
- [3] L. C. Reich, D.S., P. Calabresi (2018). Multiple sclerosis, *N Engl J Med* 378, 169–180
- [4] A. J. Thompson, S. E. Baranzini, J. Geurts, B. Hemmer, O. Ciccarelli, Multiple sclerosis, *The Lancet* 391 (10130) (2018) 1622 – 1636. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)
- [5] K. L. Cole, J. J. Early, D. A. Lyons, Drug discovery for remyelination and treatment of ms, *Glia* 65 (10) (2017) 1565–1589.
- [6] F. Boucanova, A. F. Maia, A. Cruz, V. Millar, I. M. Pinto, J. B. Relvas, H. S. Domingues, Collar occupancy: A new quantitative imaging tool for morphometric analysis of oligodendrocytes, *Journal of neuroscience methods* 294 (2018) 122–135.
- [7] V. A. Deshmukh, V. Tardif, C. A. Lyssiotis, C. C. Green, B. Kerman, H. J. Kim, K. Padmanabhan, J. G. Swoboda, I. Ahmad, T. Kondo, ve ark., A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis, *Nature* 502 (7471) (2013) 327.
- [8] T. Naito, Y. Nagashima, K. Taira, N. Uchio, S. Tsuji, J. Shimizu, Identification and segmentation of myelinated nerve fibers in a cross-sectional optical microscopic image using a deep learning model, *Journal of neuroscience methods* 291 (2017) 141–149.
- [9] B. E. Kerman, H. J. Kim, K. Padmanabhan, A. Mei, S. Georges, M. S. Joens, J. A. J. Fitzpatrick, R. Jappelli, K. J. Chandross, P. August, F. H. Gage, In vitro myelin formation using embryonic stem cells, *Development* 142 (12) (2015) 2213–2225
- [10] H. Zhang, A. A. Jarjour, A. Boyd, A. Williams, Central nervous system remyelination in culture: a tool for multiple sclerosis research, *Experimental neurology* 230 (1) (2011) 138–148.
- [11] B. E. Kerman, E. Valera, C. Gillmann, J. C. Schlachetzki, S. Reiprich, C. Böttner, A. B. Ekici, A. Reis, M. Wegner, ve ark., α -synuclein-induced myelination deficit defines a novel interventional target for multiple system atrophy, *Acta neuropathologica* 132 (1) (2016) 59–75

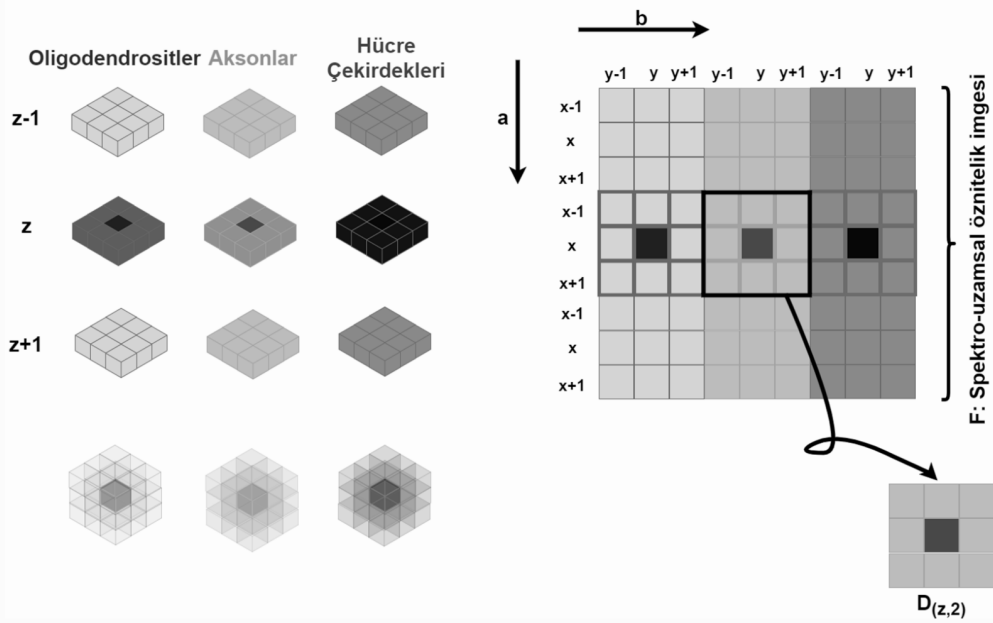
- 5 [12] A. Zaimi, T. Duval, A. Gasecka, D. Côté, N. Stikov, J. Cohen-Adad, Axonseg: open source software for axon and myelin segmentation and morphometric analysis, *Frontiers in neuro informatics* 10 (2016) 37.
- [13] A. Zaimi, M. Wabartha, V. Herman, P.-L. Antonsanti, C. S. Perone, J. Cohen-Adad, Axondeepseg: automatic axon and myelin segmentation from microscopy data using
10 convolutional neural networks, *Scientific Reports* 8 (1) (2018) 3816.
- [14] S. Cimen, A. Capar, D. A. Ekinici, U. E. Ayten, B. E. Kerman, B. U. Toreyin, Deepmq: A deep learning approach based myelin quantification in microscopic fluorescence images, in: *2018 26th European Signal Processing Conference (EUSIPCO)*, 2018, pp. 61–65. doi:10.23919/EUSIPCO.2018.8553438.
- 15 [15] E. K. Schneider CA, Rasband WS, Nihimagetools: 25 years of image analysis, *Nature Methods* 9 (7) (2012) 671675.
- [16] O. Çiçek, A. Abdulkadir, S. S. Lienkamp, T. Brox, O. Ronneberger, 3d u-net: Learning dense volumetric segmentation from sparse annotation, in: S. Ourselin, L. Joskowicz, M. R. Sabuncu, G. Unal, W. Wells (Eds.), *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2016*, Springer International Publishing, Cham, 2016, pp. 424–432.
- 20 [17] Y. K. T. Xu, D. Chitsaz, R. A. Brown, Q. L. Cui, M. A. Dabarno, J. P. Antel, T. E. Kennedy, Deep learning for high-throughput quantification of oligodendrocyte ensheathment at single-cell resolution, *Communications Biology* 2 (116). doi:10.1038/s42003-019-0356-z.
- 25 [18] M. S. Wigen, S. Fadnes, A. Rodriguez-Molares, T. Bjstad, M. Eriksen, K. H. Stensth, A. Stylen, L. Lovstakken, 4-d intracardiac ultrasound vector flow imaging feasibility and comparison to phase-contrast mri, *IEEE Transactions on Medical Imaging* 37 (12) (2018) 2619–2629. doi:10.1109/TMI.2018.2844552
- 30 [19] W. P. Segars, B. M. W. Tsui, J. Cai, F. Yin, G. S. K. Fung, E. Samei, Application of the 4-d xcat phantoms in biomedical imaging and beyond, *IEEE Transactions on Medical Imaging* 37 (3) (2018) 680–692. doi:10.1109/TMI.2017.2738448.



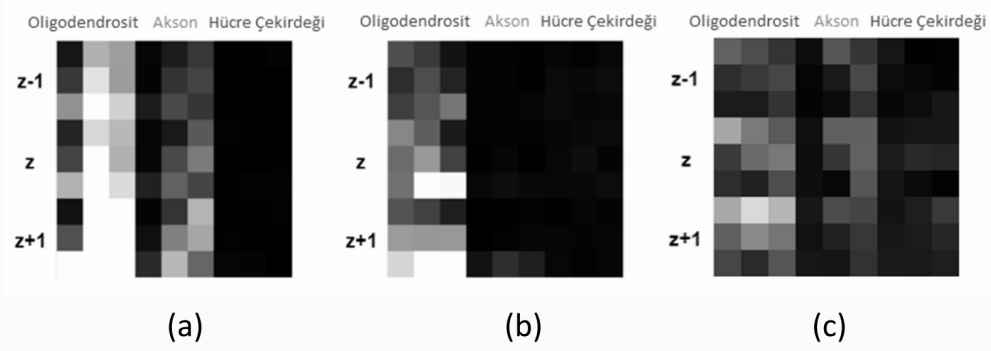
Şekil 1



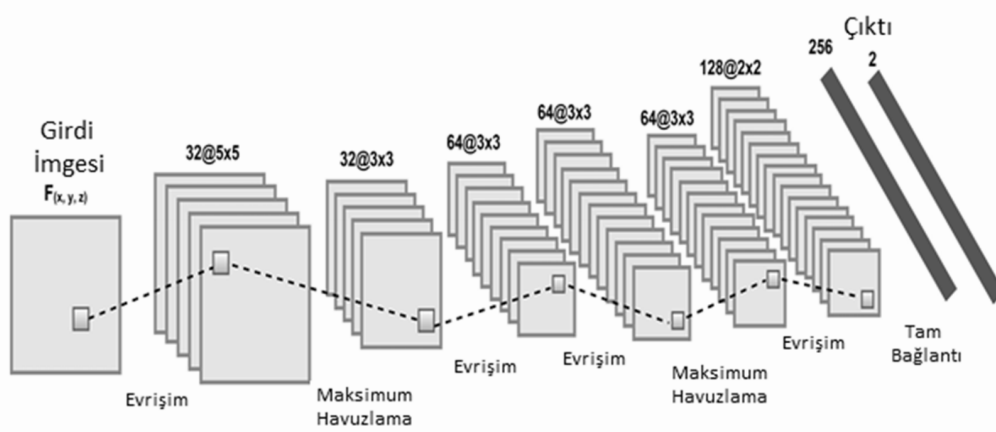
Şekil 2



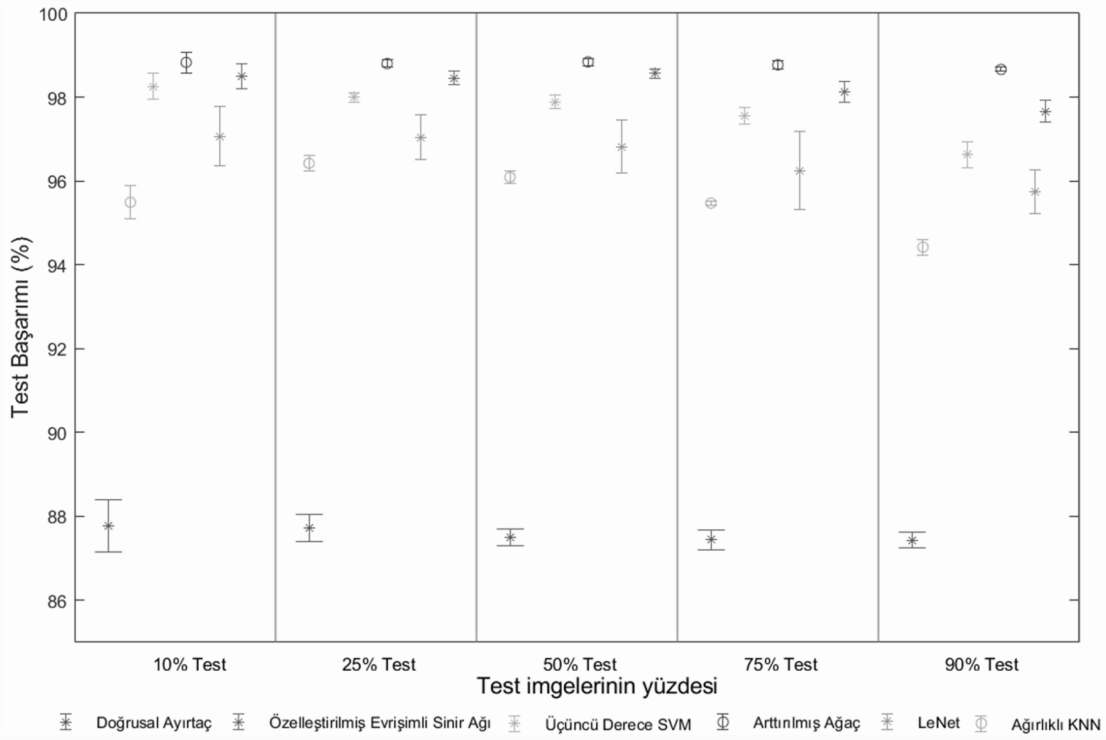
Şekil 3



Şekil 4

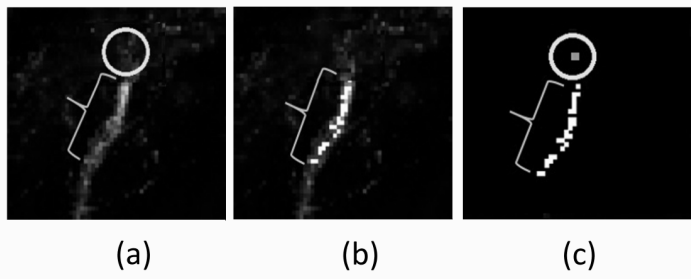


Şekil 5



6/7

Şekil 6

**Şekil 7**