

# Otomatik Dijital İmge Analizi Kullanılarak Manyetik Levitasyon Platformunda Mikroparçacıkların Özkütlerinin Belirlenmesi

## Determining Densities of Microparticles in a Magnetic Levitation Platform Using Automated Digital Image Analysis

H. Cumhur TEKİN

Biyomühendislik Bölümü  
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü  
İzmir, Türkiye  
cumhurtekin@iyte.edu.tr

**Özetçe**—Bu çalışmada mikroparçacıkların özkütlerini belirlemek amacıyla kullanılan manyetik levitasyon platformu için dijital imge analizi yaparak özkütle verilerinin otomatik belirlenmesini sağlayacak bir program sunulmaktadır. Bu program ile, manyetik levitasyon platformundaki imgelerin işlenmesi suretiyle mikroparçacıkların platformdaki pozisyonları belirlenebilmekte ve bu pozisyonlara karşılık gelen özkütle değerleri bulunabilmektedir. Böylelikle mikroparçacıkların özkütleri 0.27 mg/mL çözünürlüğünde otomatik olarak algılanabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler** — özkütle ölçümü; dijital imge işleme; manyetik levitasyon; mikroparçacıklar.

**Abstract**—In this study, a program, which will allow an automatic determination of density data by performing digital image analysis for a magnetic levitation platform used to determine the densities of microparticles, is presented. With this program, by processing the images of the magnetic levitation platform, the positions of the microparticles on the platform can be determined and the corresponding density values can be found. Thus, the densities of microparticles can be detected automatically at a resolution of 0.27 mg/mL.

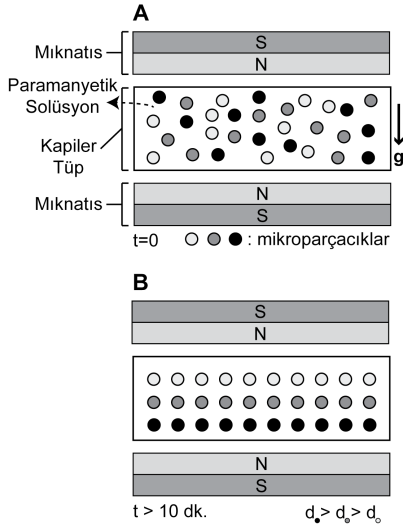
**Keywords** — density measurement; digital image processing; magnetic levitation; microparticles.

### I. GİRİŞ

Maddelerin ayırt edici özelliklerinden biri olan özkütleyi, sıvı içerisindeki mikrometre boyutundaki parçacıklar için ölçülebilen sistemler, hem mikro- ve nano-teknoloji hem de yaşam bilimleri alanlarında pek çok uygulamaya imkan tanımaktadır [1]. Manyetik levitasyon prensibi de özkütle ölçümlerini için kullanılabilir [2]. Bu yöntem ile mikroparçacık özkütleri hassas olarak tek parçacık boyutunda belirlenebilmektedir [3]. Bu işlem için kullanılan platformda

aynı manyetik kutupları birbirlerine bakan iki mıknatıs bulunmaktadır. İçinde paramanyetik solüsyonda deriştirilen mikroparçacıklar barındıran kapiler tüp, iki mıknatıs arasına koyularak ölçüm işlemi başlatılır. Mikroparçacıkların manyetize olma özellikleri, içinde buldukları paramanyetik solüsyondan daha düşük oldukları için üzerlerine etki eden manyetik kuvvetlerle itilir ve manyetik alanın en az olduğu nokta olan iki mıknatısın ortasına doğru hareket ederler. Parçacıklara aynı zamanda hidrostatik kaldırma kuvveti etki eder. Manyetik kuvvetin hidrostatik kaldırma kuvvetine eşit olduğu noktada mikroparçacıklar asılı halde kalırlar (Şekil 1). Asılı kaldıkları düzlem, mikroparçacıkların özkütlesine bağlıdır. Şöyle ki; kapiler tüpün en altında yüksek özkütleye sahip parçacıklar toplanırken, kapilerin üst kısmında düşük özkütleye sahip parçacıklar toplanmaktadır. Mikroparçacığın asılı kaldığı pozisyonuna bakılarak özkütle tayininde bulunulur. Bu platformlarda kapiler tüpün imgesi mikroskop altında elde edilerek, mikroparçacıkların mıknatısa göre pozisyonlarının manuel olarak belirlenmesi suretiyle mikroparçacıkların özkütleleri tespit edilir. Bu işlem hem kullanıcı hatalarına açıktır hem de zaman almaktadır. Dijital imgelerden parçacık/hücre sayım işlemleri için geliştirilen programlar yüksek verimli analiz için kullanılmaktadır [4, 5]. Ancak bu programlar, manyetik levitasyon düzeneğindeki parçacıkların mıknatıslara göre göreceli konumlarını belirlemek için yeterli değildir.

Bu çalışmada, manyetik levitasyon düzeneğinde mikroskop altında çekilen imgelerden mikroparçacıkların pozisyonlarını mıknatıslara uzaklıklarına göre bulup, bu pozisyonlardan özkütle hesaplaması yapan bir program sunulmaktadır. Bu program MATLAB tabanlı olup, dijital imge işleme algoritmaları ile mikroparçacıkların özkütlelerini 0.27 mg/L çözünürlükte otomatik olarak algılamaktadır.



Şekil 1. Manyetik levitasyon prensibi. (A) Paramanyetik solüsyonda deriştirilen mikroparçacıkların manyetik düzeneğe konuldukları andaki betimlemesi. g, yerçekimi ivmesini göstermektedir. (B) Mikroparçacıkların özkütlelerine göre farklı yükseklikte toplanması. Manyetik ve hidrostatik kaldırma kuvvetlerine maruz kalan parçacıklar zamanla (>10 dk.) belirli bir düzlemde hareketsiz hale gelirler. d, mikroparçacık özkütlelerini göstermektedir.

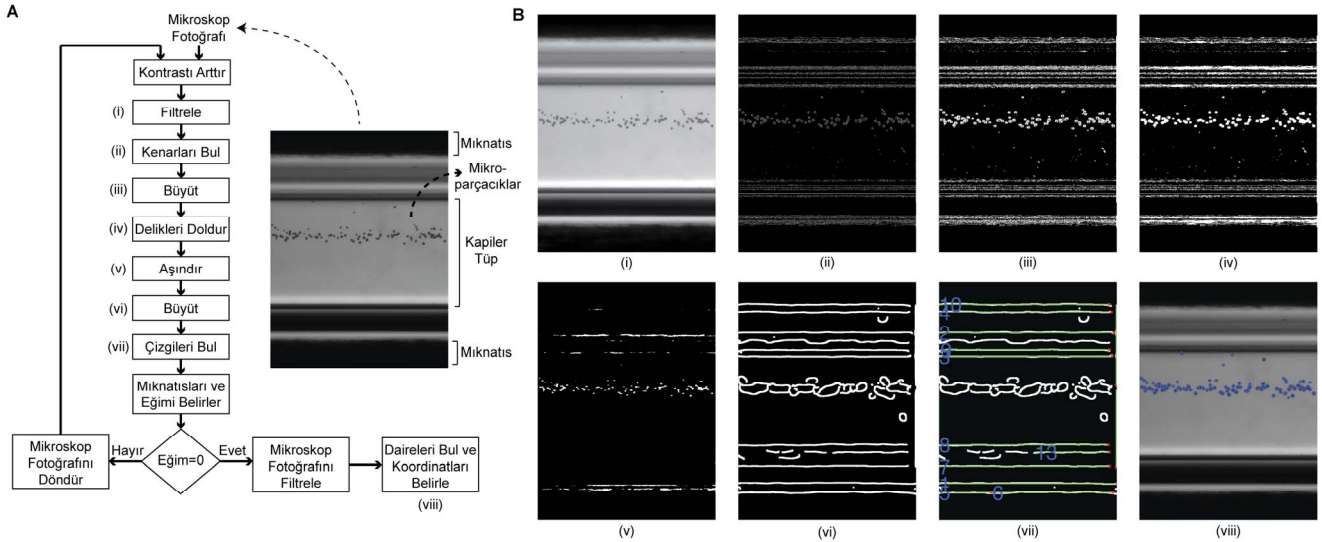
## II. DENEYSEL PROTOKOL

Manyetik levitasyon düzeneği (Şekil 1) birbirlerinden 1.5 mm uzaklığa yerleştirilen ve aynı manyetik kutupları birbirine bakan iki adet neodyum N52 mıknatıstan (boyutları: 50 mm uzunluk  $\times$  2 mm genişlik  $\times$  5 mm yükseklik) oluşmaktadır. Deneylerde 1.00 g/mL, 1.02 g/mL ve 1.07 g/mL özkütleli 10-20  $\mu$ m boyutlu ve 1.09 g/mL özkütleli 20-27  $\mu$ m boyutlu mikroparçacıklar kullanılmaktadır (Cospheric LLC., ABD). Parçacıklar, içinde %2 oranında Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi ve 30 mM paramanyetik medya

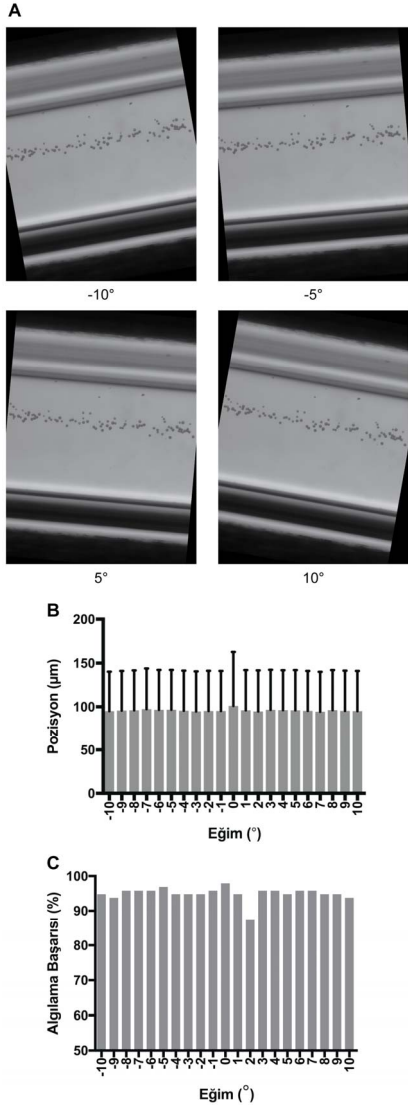
(Gadavist) bulunan solüsyon içerisinde hazırlanırlar. Hazırlanan solüsyon pipet yardımıyla kapiler tüpe (boyutları: 50 mm uzunluk  $\times$  1 mm genişlik  $\times$  1 mm yükseklik) verilip, iki mıknatıs arasına yerleştirilir. Bu düzenek çevrik ışık mikroskobuna koyulur ve kapiler tüp 5 $\times$  objektif kullanılarak kamera yardımı ile görüntülenir. Mikroparçacıklar 10 dakika içinde kararlı yüksekliğe ulaşır, dijital imge analizi için düzeneğin görüntüsü mikroskop altında 25 ms pozlandırma ile fotoğraflandırılır ve 1038 $\times$ 1388 boyutlarında imge elde edilir. İmgedeki 1 piksel 1.45  $\mu$ m'ye karşılık gelmektedir.

## III. DİJİTAL İMGE İŞLEME PROGRAMI

Otomatik dijital imge işleme için MATLAB programı geliştirilmiştir. Bu program manyetik levitasyon imgelerini inceleyerek: (i) imgedeki mıknatıslar eğik duruyorsa imgeyi mıknatısları düz konuma getirecek şekilde döndürür, (ii) mıknatısların yerini tayin ederek iki mıknatısın arasında kalan orta noktayı (0 koordinatını) bulur, (iii) mikroparçacıkların yarıçapı ile yerini belirler ve (iv) bulunan mikroparçacıkların mıknatısın orta noktasına göre uzaklıklarını çıkarır. Bu programa daha sonra, standart özkütleli parçacıklarla kalibre edilerek, uzaklıklara karşılık gelen özkütleleri otomatik olarak belirleme özelliği de eklenmiştir. Programda kullanılan imge işleme teknikleri ve orijinal imge üzerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 2'de gösterilmiştir. Programda ilk önce mıknatısların eğimi ve yeri belirlenir. Bunun için görüntüde kontrast artırılıp filtrelenerek kenarlar belirginleştirilip kenarların bulunması sağlanır. Oluşan ikili imge büyütülerek kenarların daha belirgin hale gelmesi sağlanır. Arkasından imge üzerindeki delikler bulunularak bunların doldurulması sağlanır. İmge aşındırılarak gürültüden temizlenir. Bu imge büyütülerek üzerindeki çizgilerin belirgin hale gelmesi sağlanır. Daha sonra, imge üzerinde oluşan çizgiler Hough dönüşümüyle bulunur. Bu çizgilerden imgenin alt ve üst sınırına en yakın olan yatay çizgiler levitasyon düzeneğindeki mıknatısların kenarlarını göstermektedir. Bu çizgilerin eğimleri görüntüde bulunan mıknatısların eğimlerini vermektedir. Eğer

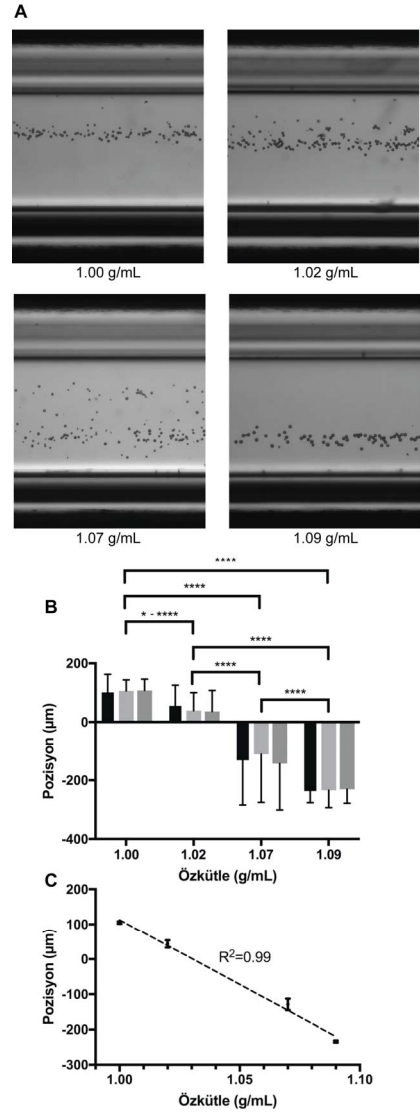


Şekil 2. Manyetik levitasyon düzeneği için dijital imge işleme basamakları (A) ve işlemler sonucu imgede meydana gelen değişiklikler (B). Basamaklar ve onlara karşılık gelen imgeler i-viii olarak gösterilmiştir. B-vii'deki yeşil çizgiler algılanan çizgileri, B-viii'deki mavi halkalar algılanan mikroparçacıkları göstermektedir.



Şekil 3. Döndürülmüş imgelerde dijital imge işleme programının performansı. (A) Farklı döndürme açılarındaki imgeler. (B) Dijital imge işleme programı ile belirlenen mikroparçacıkların pozisyonları. Sütunlar mikroparçacıkların ortalama yüksekliklerini, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. (C) Algılama başarısının döndürme açısına göre değişimi. Algılama başarısı program tarafından algılanan mikroparçacık sayısının imge üstündeki toplam parçacık sayısına oranı olarak tanımlanmıştır ve yüzde olarak gösterilmiştir.

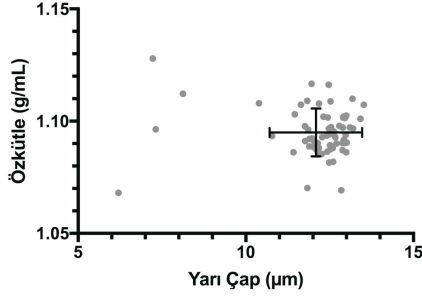
eğim sıfırdan büyükse orijinal levitasyon imgesi döndürülerek işlemlere tekrar başlanır. Eğer eğim sıfırsa, mıknatısların imge üzerindeki pozisyonlarından, levitasyon düzeneğindeki iki mıknatısın arasında kalan orta nokta (0 koordinatı) bulunur. Orijinal imge filtrelenerek, mikroparçacıkların kenarları belirgin hale getirilir ve Hough dönüştürmesiyle parçacıkların pozisyonları ve yarıçapları belirlenir. Bu parçacıkların “0 koordinatına” göre buldukları düzlemler  $\mu\text{m}$ 'ye çevrilerek, kaydedilir. Bu pozisyonlar sıfırdan büyük ise parçacığın “0 koordinatının” yukarısında olduğunu, küçük ise “0 koordinatının” altında olduğunu gösterir.



Şekil 4. Farklı özkütleli mikroparçacıkların analizi. (A) Mikroparçacıkların manyetik levitasyon düzeneğindeki görüntüleri. (B) Mikroparçacıkların mıknatısların orta noktasına (0  $\mu\text{m}$ ) göre pozisyonları. Her farklı özkütleli mikroparçacık için üç farklı imge incelenmiştir, sonuçlar farklı sütun renklerinde gösterilmiştir. Sütunlar mikroparçacıkların ortalama yüksekliklerini, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir. Tek yönlü varyans analizi sonucu grafik üstünde gösterilmiştir. Anlamlılık değeri p, \* için  $<0.05$  ve \*\*\*\* için  $<0.0001$ 'dir. (C) Mikroparçacıkların ortalama pozisyonlarının özkütellerine göre değişimi. Pozisyonlar B'de gösterilen farklı imgelerden gelen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları olarak gösterilmiştir. Kesikli çizgi doğrusal eğilimi göstermektedir.

#### IV. SONUÇLAR

Geliştirilen programın mıknatıs eğimlerini saptamadaki performansını belirlemek için 1.00 g/mL özkütleli parçacıklar kullanılmıştır. Elde edilen levitasyon görüntüsü dijital olarak  $\pm 10^\circ$  aralığında çevrilerek programda test edilmiştir. Sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. Program %100 başarıyla eğimleri saptayabilmiştir. Bunun dışında, mikroparçacık dağılımları farklı eğimlerdeki analizlerde istatistiksel olarak bir farklılık göstermemiştir (Şekil 3B). İmgeler farklı eğimlerde olsalar



Şekil 5. 1.09 g/mL özkütleli mikroparçacıkların tek parçacık bazında özkütle ve yarı çap dağılımları. Hata çubukları özkütle ve yarı çaplardaki standart sapmaları göstermektedir.

dahi program imgede bulunan parçacıkların ortalama  $95 \pm 2\%$ 'sini başarıyla algılayabilmiştir (Şekil 3C).

Programın farklı özkütlerdeki parçacıkları algılama başarısı test edilmiştir (Şekil 4). Bunun için 1.00 g/mL, 1.02 g/mL, 1.07 g/mL ve 1.09 g/mL özkütleli parçacıkların levitasyon imgeleri programda kullanılmıştır. Her farklı özkütleli parçacık farklı düzlemde toplanmış ve bu parçacıkların pozisyonları geliştirilen programla bulunmuştur. Beklendiği üzere farklı özkütleli parçacıkların dağılımları istatistiksel olarak farklılık göstermektedir (Şekil 4B). Bu parçacıkların ortalama pozisyonları ile özküteleri arasındaki doğrusal ilişki gözlemlenmektedir (Şekil 4C). Böylelikle mikroparçacıkların pozisyonlarına bakılarak özkütle tayininde bulunulabilmektedir. Mikroparçacığın levitasyon pozisyonundaki her 1 µm değişim, özkütlesinde 0.27 mg/mL değişime karşılık gelmektedir. Bu doğrusal ilişki programa entegre edilmiş ve mikroparçacıkların tek parçacık bazında özkütelerinin bulunması için kullanılmıştır. 1.09 g/mL mikroparçacıkların levitasyon imgesinden özkütle ve yarı çap analizi yapılmıştır (Şekil 5). Program vasıtasıyla belirlenen mikroparçacıkların özkütle ve yarıçapları sırasıyla  $1.095 \pm 0.0107$  g/mL ve  $12.09 \pm 1.38$  µm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar mikroparçacıkların veri sayfalarındaki değer aralıklarıyla örtüşmektedir.

Bu çalışmada, manyetik levitasyon düzeneğinden elde edilen imgelerin analizi ile mikroparçacıkların özkütelerini otomatik olarak bulabilen bir program sunulmuştur. Bu program ile levitasyon düzeneğinde mikroparçacıkların özküteleri tamamen otomatik olarak 0.27 mg/mL hassasiyet ile belirlenebilmiştir. Sunulan çalışmada, benzer manyetik levitasyon tekniği kullanan ve elle analiz işlemi gerektiren sistemle aynı hassasiyet elde edildiği gibi diğer özkütle belirleme sistemlerine göre de daha hassas ölçüm yapılabilmektedir [3]. Bunun yanında, geliştirilen program ortalama %95 parçacık algılama başarısı ile literatürdeki programlarla yarışabilecek düzeydedir [4, 5]. Böylelikle, bu programla kullanıcı hatalarından kaynaklanan özkütle ölçüm sonuçlarındaki farklılıklar giderilebileceği gibi, analiz zamanından da büyük bir tasarruf sağlanabilecek ve tamamıyla otomatik özkütle ölçüm sistemleri geliştirilebilecektir.

## BİLGİLENDİRME

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 116M298 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Yazar, manyetik levitasyon düzeneğinin üretimi için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyomühendislik Bölümü doktora öğrencisi Sena Yaman'a, ve yararlı önerileri için İYTE Biyomühendislik Bölümü'nden Doç. Dr. Engin Özçivici ile Saniber Ltd. Şti.'den Başak Tekin'e teşekkürlerini sunar.

## KAYNAKLAR

- [1] Burg, T.P., Godin, M., Knudsen, S.M., Shen, W.J., Carlson, G., Foster, J.S., Babcock, K., and Manalis, S.R. "Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid", *Nature*, 446(7139):1066–1069, 2007.
- [2] Mirica, K.A., Phillips, S.T., Mace, C.R., Whitesides, G.M. "Magnetic Levitation in the Analysis of Foods and Water", *J. Agric. Food Chem.*, 58(11):6565–6569, 2010.
- [3] Durmus, N.D., Tekin, H.C., Guven, S., Sridhar, K., Yildiz, A.A., Calibasi, G., Ghiran, I., Davis, R.W., Steinmetz, L.M., Demirci, U. "Magnetic levitation of single cells", *PNAS*, 112: E3667-E3668, 2015.
- [4] Geissmann, Q. "OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects", *PLOS ONE*, 8(2):e54072, 2013.
- [5] Choudhry, P. "High-Throughput Method for Automated Colony and Cell Counting by Digital Image Analysis Based on Edge Detection", *PLOS ONE*, 11(2): e0148469, 2016.