



Kauno technologijos universitetas
Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas

**Bakterijų kolonijų segmentavimas ir pasiskirstymo vertinimas
antimikrobinuose paviršiuose**
Baigiamasis magistro studijų projektas

Ieva Aliulytė
Projekto autorė

Doc. Dr. Paulius Palevičius
Vadovas

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas
Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas

Bakterijų kolonijų segmentavimas ir pasiskirstymo vertinimas antimikrobinuose paviršiuose

Baigiamasis magistro studijų projektas
Taikomoji matematika (6211AX006)

Ieva Aliulytė

Projekto autorė

Doc. Dr. Paulius Palevičius

Vadovas

Doc. Dr. Tomas Iešmantas

Recenzentas

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas
Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas
Ieva Aliulytė

Bakterijų kolonijų segmentavimas ir pasiskirstymo vertinimas antimikrobiniuose paviršiuose

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Ieva Aliulytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Aliulytė Ieva. Bakterijų kolonijų segmentavimas ir pasiskirstymo vertinimas antimikrobiniuose paviršiuose. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovas Doc. Dr. Paulius Palevičius; Kauno technologijos universitetas, Matematikos ir gamtos mokslų fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Taikomoji matematika (Matematikos mokslai).

Reikšminiai žodžiai: mikrobiologiniai vaizdai, egzempliorių segmentavimas, sąsūkų neuroniniai tinklai, bakterijų pasiskirstymo vertinimas.

Kaunas, 2022. 55 p.

Santrauka

Šiame magistro baigiamajame darbe atliekamas bakterinių vaizdų egzempliorių segmentavimas pritaikant regionais paremtą sąsūkų neuroninį tinklą Mask R-CNN ir vertinamas bakterijų pasiskirstymas vaizduose. Analizuojami duomenys gauti sidabro ir aukso nanodalelėmis padengtų titano dioksido plonų plėvelių antibakterinio aktyvumo prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* rūšis, susijusias su burnos ligomis, tyrimo metu. Geriausio modelio apibendrintos metrikos: vidutinis preciziškumas, kai IoU lygus 0,5, – 0,873, vidutinio preciziškumo su skirtingomis IoU reikšmėmis vidurkis – 0,551 ir F_1 koeficientas dalelių tikslumu – 0,898. Apskaičiuotos bakterijų vaizduose charakteristikos ir pastebėta, kad tarp modelių metrikų ir apskritumo, pilnumo, apvalumo, kraštinių santykio, bei apimties egzistuoja vidutinio stiprumo / stiprūs tiesiniai ryšiai. Taip pat naudojant centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkį arba medianą įvertintas bakterijų pasiskirstymas vaizduose – ar bakterijos pasiskirsčiusios atsitiktinai, ar yra atsiskyrusios, ar sudarančios klasterius. Nustatyta, jog didžiojoje dalyje vaizdų bakterijos yra pasiskirsčiusios atsitiktinai, mažesnėje dalyje – atsiskyrusios ir mažiausioje dalyje sudaro klasterius. Palyginus metrikų vidurkių reikšmes skirtingo bakterijų pasiskirstymo vaizduose nustatyta, jog atsitiktinai pasiskirsčiusių dalelių metrikų vidurkis yra statistiškai reikšmingai didesnis už atsiskyrusių dalelių ir už klasterius sudarančių dalelių metrikų vidurkį. Taip pat atsiskyrusių dalelių metrikų vidurkiai beveik visais atvejais yra statistiškai reikšmingai didesni už klasterius sudarančių dalelių tų pačių metrikų vidurkius. Tyrimo metu parengta metodinė bakterijų pasiskirstymo vertinimo antimikrobiniuose paviršiuose eiga, kuri galėtų reikšmingai prisidėti prie tolesnių antibakterinio aktyvumo prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* bakterijas tyrimų, kadangi sudarytų galimybes atskirai vertinti kiekvieną koloniją sudarančią bakteriją. Apibendrinant galima teigti, kad naudotos metodikos silpnoji vieta – klasterius sudarančių bakterijų aptikimas ir atskyrimas. Tačiau tai yra sudėtinga užduotis ir bakterijas žymint rankiniu būdu, kadangi ne visuomet galima tiksliai nustatyti besiliečiančių bakterijų ribas ar netgi kiekį. Norint sudarytą metodiką visapusiškai taikyti praktikoje (ypač atpažįstant klasterius sudarančias bakterijas) pirmiausiai reikėtų patobulinti egzempliorių segmentavimo užduočiai skirtą modelį.

Aliulytė Ieva. Segmentation and Distribution Evaluation of Bacterial Colonies on Antimicrobial Surfaces. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. Dr. Paulius Palevičius; Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Applied Mathematics (Mathematical Sciences).

Keywords: microbiological images, instance segmentation, convolutional neural networks, evaluation of bacterial distribution.

Kaunas, 2022. 55.

Summary

In this master's thesis, instance segmentation of bacterial image using the region-based convolutional neural network Mask R-CNN is performed and the distribution of bacteria in the images is evaluated. Data was obtained from a study of the antibacterial activity of silver and gold nanoparticle-coated titanium dioxide thin films against *Veillonella parvula* and *Neisseria sicca* species associated with oral disease. Summarized metrics for the best model: average precision at $IoU = 0.5$ is 0.873, mean average precision at different IoU values is 0.551, and F_1 coefficient with particle accuracy is 0,898. The characteristics of bacteria in the images were calculated and it was observed that there are moderate / strong linear relationships between the model metrics and the circularity, solidity, roundness, aspect ratio and extent. The mean or median distance between the centroids to the nearest neighbor was used to estimate the distribution of bacteria in the images, whether the bacteria particles were random distributed, clustered, or self-avoiding. It has been found out that in most of the images the bacteria are randomly distributed, in a smaller part they are self-avoiding and form clusters in the smallest part. When comparing the mean values of the metrics in the images of different bacterial distributions, it was found that the mean of the metrics of the randomly distributed particles is statistically significantly higher than the mean of the metrics of the self-avoiding particles and the particles forming the clusters. Furthermore, the means of the self-avoiding particle metrics are in almost all cases statistically significantly higher than the means of the same metrics of the clustered particles. The study developed a methodological process for the evaluation of bacterial distribution in antimicrobial surfaces, which could significantly contribute to further studies of antibacterial activity against *Veillonella parvula* and *Neisseria sicca*, as it would allow the evaluation of each colony-forming bacterium separately. In summary, the weak point of the methodology used is the detection and instance segmentation of the bacteria that make up the cluster. However, it is also a difficult task to mark bacteria manually, as it is not always possible to pinpoint the limits or even the number of bacteria involved. To fully apply the developed methodology in practice (especially in the identification of cluster-forming bacteria), the model for the instance segmentation task should first be improved.

Turinys

Lentelių sąrašas	7
Paveikslų sąrašas	8
Santrumpų ir terminų sąrašas	9
Įvadas	10
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. Kompiuterinė rega ir biologinių vaizdų analizė	12
1.2. Tradiciniai segmentavimo metodai	14
1.3. Mašininio mokymosi metodai egzemplioriams segmentuoti	15
1.4. Dalelių pasiskirstymo analizė	19
1.5. Darbo aktualumas	20
2. Duomenys ir tyrimo metodai	21
2.1. Duomenys ir jų apdorojimas	21
2.1.1. Gauso filtras.....	22
2.2. Sąsūkų neuroniniai tinklai	23
2.2.1. Sąsūka.....	23
2.2.2. R-CNN.....	23
2.2.3. Fast R-CNN	25
2.2.4. Faster R-CNN	27
2.2.5. Mask R-CNN.....	28
2.3. Segmentavimo vertinimas	29
2.3.1. Preciziškumas ir atkūrimas.....	29
2.3.2. Jaccard'o indeksas	30
2.3.3. Vidutinis preciziškumas	30
2.3.4. F_1 koeficientas	31
2.4. Dalelių vertinimas vaizde	31
2.4.1. Dalelių charakteristikos	31
2.4.2. Dalelių pasiskirstymo palyginimas.....	33
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	36
3.1. Duomenų paruošimas	36
3.2. Bakterijų segmentavimas.....	37
3.3. Bakterijų pasiskirstymo vertinimas	43
Išvados	51
Literatūros sąrašas	52

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Modelių konfigūracijų skirtumai	38
2 lentelė. Kiekvieno modelio geriausios epochos parinkimas.....	39
3 lentelė. Apibendrintos pikselių klasifikavimo ir dalelių atpažinimo statistikos.....	39
4 lentelė. Apibendrintos kiekvieno modelio vertinimo metrikos	40
5 lentelė. Geriausio modelio segmentavimo tikslumo metrikos kiekvienam vaizdui	40
6 lentelė. Kiekvieno vaizdo dalelių charakteristikos.....	43
7 lentelė. Pearson'o koreliacijos koeficientai tarp dalelių charakteristikų ir modelių metrikų	44
8 lentelė. Kiekvieno vaizdo artimiausio kaimyno atstumo teorinės bei įvertintos reikšmės ir dalelių pasiskirstymo nustatymas pagal jas.....	45
9 lentelė. Visų modelių apibendrintos charakteristikos, kai dalelių pasiskirstymas nustatomas pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą.....	47
10 lentelė. Visų modelių apibendrintos charakteristikos, kai dalelių pasiskirstymas nustatomas pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkį.....	48
11 lentelė. Kiekvienos grupės normalumo patikrinimas, p reikšmės.....	48
12 lentelė. Vienpusio Wilcoxon-Mann-Whitney U testo p reikšmės lyginant modelių metrikų vidurkius tarp grupių, kai jos sudaromos remiantis centroidų artimiausio kaimyno atstumo mediana	49
13 lentelė. Vienpusio Wilcoxon-Mann-Whitney U testo p reikšmės lyginant modelių metrikų vidurkius tarp grupių, kai jos sudaromos remiantis centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkiu	49

Paveikslų sąrašas

1 pav. Keturios pagrindinės kompiuterinės regos užduotys pagal [7]: (a) – vaizdų klasifikavimas, (b) – objektų atpažinimas, (c) – semantinis segmentavimas, (d) – egzempliorių segmentavimas....	13
2 pav. Mask R-CNN struktūra egzempliorių segmentavimo užduočiai pagal [21].....	16
3 pav. Pasiskirstymo struktūros pagal artimiausio kaimyno vidurkį. Parengta pagal [49]	19
4 pav. Tyrimo metodologinė eiga.....	21
5 pav. Tyrime naudojamo vaizdo pavyzdys	22
6 pav. Nemaksimalaus slopinimo pavyzdys pagal [52]. Kairėje – ribojantys langeliai prieš nemaksimalų slopinimą, dešinėje – po	25
7 pav. Dalelės pilnumo pavyzdys pagal [56].....	32
8 pav. Dalelės apimties pavyzdys pagal [56]	32
9 pav. Elipsės ilgoji ir trumpoji ašys pagal [56].....	32
10 pav. Pradinių vaizdų sukarpymas į mažesnius vaizdus	36
11 pav. Išskirtų kaukių kiekvienai dalelei pavyzdžiai.....	36
12 pav. Kiekvieno vaizdo kaukės sukūrimas (rodyklių kryptimi): vaizdo kopija paverčiama nespaltvota; pritaikomas Gauso filtras; pritaikoma slenksčio funkcija dvejetainiam vaizdui gauti; rankomis užpildomos tuštos viduryje bakterijų, pataisomas dalelių žymėjimas, kad kaukė kuo labiau atitiktų pradinį vaizdą; atskiriamos bakterijos jų sankaupose, kad būtų galima vaizdą segmentuoti egzempliorius	37
13 pav. Geriausio modelio panaudojimas bakterijoms segmentuoti: kairėje – geriausias segmentavimas (10 vaizdas), dešinėje – prasčiausias (9 vaizdas). Žalia spalva žymimos tikrosios, rankomis pažymėtos bakterijų kaukės, raudona spalva – modelio aptiktų bakterijų kaukės	41
14 pav. 9 vaizdo segmentavimas: kairėje – naudojant 1 modelį, dešinėje – naudojant 2 modelį	41
15 pav. Geriausio modelio pritaikymas bakterijoms segmentuoti	42
16 pav. Modelių metrikų ir vidutinių charakteristikų koreliacinės matricos grafinis vaizdas	44
17 pav. Dalelių pasiskirstymo pavyzdžiai antimikrobiniuose paviršiuose: kairėje atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės (vaizdo nr. – 6), viduryje – klasterius sudarančios dalelės (vaizdo nr. – 9), dešinėje – atsiskyrusios dalelės (vaizdo nr. – 16).....	46
18 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) mAP reikšmės. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės.....	46
19 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) F_1 reikšmės. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės.....	47
20 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) AP reikšmės, kai $IoU = 0,5$. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės	47

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

AKA – artimiausio kaimyno atstumas;

AP – (angl. *Average Precision*) vidutinis preciziškumas;

IoU – (angl. *Intersection over Union*) sankirtos ir sąjungos santykis;

mAP – (angl. *mean Average Precision*) vidutinio preciziškumo vidurkis;

NMS – (angl. *non-maximum suppression*) nemaksimalus slopinimas;

R-CNN – (angl. *Region-based Convolutional Neural Network*) regionais paremtas sąsūkų neuroninis tinklas.

Terminai:

Egzempliorių segmentavimas (angl. *instance segmentation*) – objektų atpažinimas vaizduose, kai išskiriamos ir tai pačiai klasei priklausančių objektų ribos.

Slenkstis (angl. *threshold*) – nustatyta argumento reikšmė, riba, skirianti funkcijos įgyjamas reikšmes.

Slenksčio funkcija (angl. *threshold function*) – funkcija, kuri įgyja reikšmę 1, jei argumentų funkcijos reikšmė didesnė už nustatytą slenksčio reikšmę, ir 0 kitu atveju.

Įvadas

Bakterijų kolonijų, bioplėvelių ir mikrobiomų tyrimų daugėja dėl jų poveikio sveikatai ir ekologijai [1]. Pavyzdžiui, kuriant vakciną pagrindinis žingsnis yra tinkamai suskaičiuoti ir atskirti skirtingų tipų bakterijų kolonijas [2] arba norint įvertinti ir palyginti skirtingų paviršių antibakterinį aktyvumą reikia aptikti bakterijas, jų kolonijas, įvertinti jų dydžius bei tankį [3]. Mikrobu bendruomenėms vaizduoti reikia įrankių, leidžiančių patikimai identifikuoti bakterines ląsteles tankiose ir dažnai skirtingų rūšių populiacijose.

Optinė mikroskopija jau seniai yra labai naudingas būdas mikrobiologiniams organizmams charakterizuoti bei analizuoti. Pagrindinis mikroskopijos pranašumas, palyginus su kitais mikrobu charakterizavimo metodais, yra tas, kad ji gali išgauti didelės erdvinės skiriamosios gebos duomenis apie gyvas ląsteles. Gavus fluorescencinius vaizdus, labai svarbu išgauti tokių vaizdų kiekybines savybes, deja, tai yra sunkus eksperimentinės analizės etapas [4]. Egzempliorių segmentavimas (objektų atskyrimas) biologiniuose vaizduose dažnai yra jų analizės pagrindas. Daugumai biologinių vaizdų rūšių (pavyzdžiui, ląstelių mikroskopiniams vaizdams) būdingas didelis objektų kiekis. Kitoms rūšims (pavyzdžiui, kirminų tyrimams) būdingi glaudūs ir sudėtingi persidengimai bei okliuzijos [5]. Anksčiau biologinių vaizdų analizė buvo pagrįsta mikroorganizmų skaičiavimu rankomis. Tačiau tokios rankinės analizės trūkumas yra ribotas tikslumas, be to, tokia analizė užima daug laiko ir tampa neįmanoma, kai reikia išanalizuoti šimtus, tūkstančius ar net daugiau vaizdų. Gerėjantis kompiuterinės vaizdų analizės tikslumas ir atsirandanti naujos galimybės šiuo metu turi teigiamos įtakos įvairių biologinių procesų vaizdų kiekybinei analizei [2, 4].

Reikalingi galingi bei tikslūs kompiuteriniai įrankiai, jeigu yra norima dideliu našumu apdoroti mikrobiologinius vaizdus ir iš jų gauti aukštos raiškos kiekybinę informaciją. Šie įrankiai turėtų sugebėti aptikti bakterijų ląsteles ar kitus dominančius mikroorganizmus bei tiksliai priskirti jiems savybes [1]. Nors plika akimi žiūrint dažnai ši užduotis gali atrodyti savaime suprantama, tačiau labai tiksliai dvimačiame vaizde aptikti bakterijų ląsteles tankiose mikrokolonijose, kur ląstelės glaudžiai besiliečiančios, yra didelis kompiuterinės regos iššūkis. Šiame magistro baigiamajame darbe siekiama atlikti eksperimentinių vaizdų egzempliorių segmentavimą naudojant mašininio mokymo algoritmą ir įvertinti segmentuotų bakterijų savybes bei bakterijų pasiskirstymą.

Tyrimo objektas – eksperimentiniai bakterijų vaizdai.

Šio darbo tikslas – sukurti metodiką, kuri leistų atlikti automatinį bakterijų kolonijų pasiskirstymo vertinimą antimikrobiniuose paviršiuose.

Tikslo įgyvendinimui iškelti tokie uždaviniai:

- apžvelgti vaizdų segmentavimo metodų literatūrą;
- sukurti arba pritaikyti dirbtiniu intelektu paremtą modelį vaizdams su bakterijų kolonijomis segmentuoti;
- parengti metodiką, kuri leistų įvertinti kolonijų pasiskirstymą segmentuotuose vaizduose.

Darbe naudojama metodika – sąsukų neuroninis tinklas Mask R-CNN, *AP*, *mAP* metrikos, F_1 koeficientas, artimiausių kaimynų metodas.

1 skyriuje apžvelgiama aktuali literatūra. Šiame baigiamajame magistro darbe naudojamas Mask R-CNN modelis bakterijoms segmentuoti. 2 skyriuje aprašoma darbe pritaikoma metodika. 3 skyriuje

įgyvendinami išskelti uždaviniai – atliekamas bakterijų vaizdų segmentavimas naudojant skirtingas modelio variacijas, gauti rezultatai yra palyginami, taip pat įvertinamas bakterijų pasiskirstymas antimikrobiniuose paviršiuose pagal artimiausio kaimyno atstumą. Darbui apibendrinti pateikiamos išvados ir rekomendacijos tolimesniems tyrimams.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Kompiuterinė rega ir biologinių vaizdų analizė

Pasak vienos didžiausių informacinių technologijų įmonių pasaulyje IBM, kompiuterinė rega – tai dirbtinio intelekto sritis, padedanti kompiuteriams ir sistemoms iš skaitmeninių vaizdų, vaizdo įrašų bei kitų vaizdinių priemonių išgauti reikšmingą informaciją ir remiantis šia informacija imtis atitinkamų veiksmų arba teikti rekomendacijas [6].

Kompiuterinės regos technologijos sityje išskiriamos keturios pagrindinės užduotys [7]:

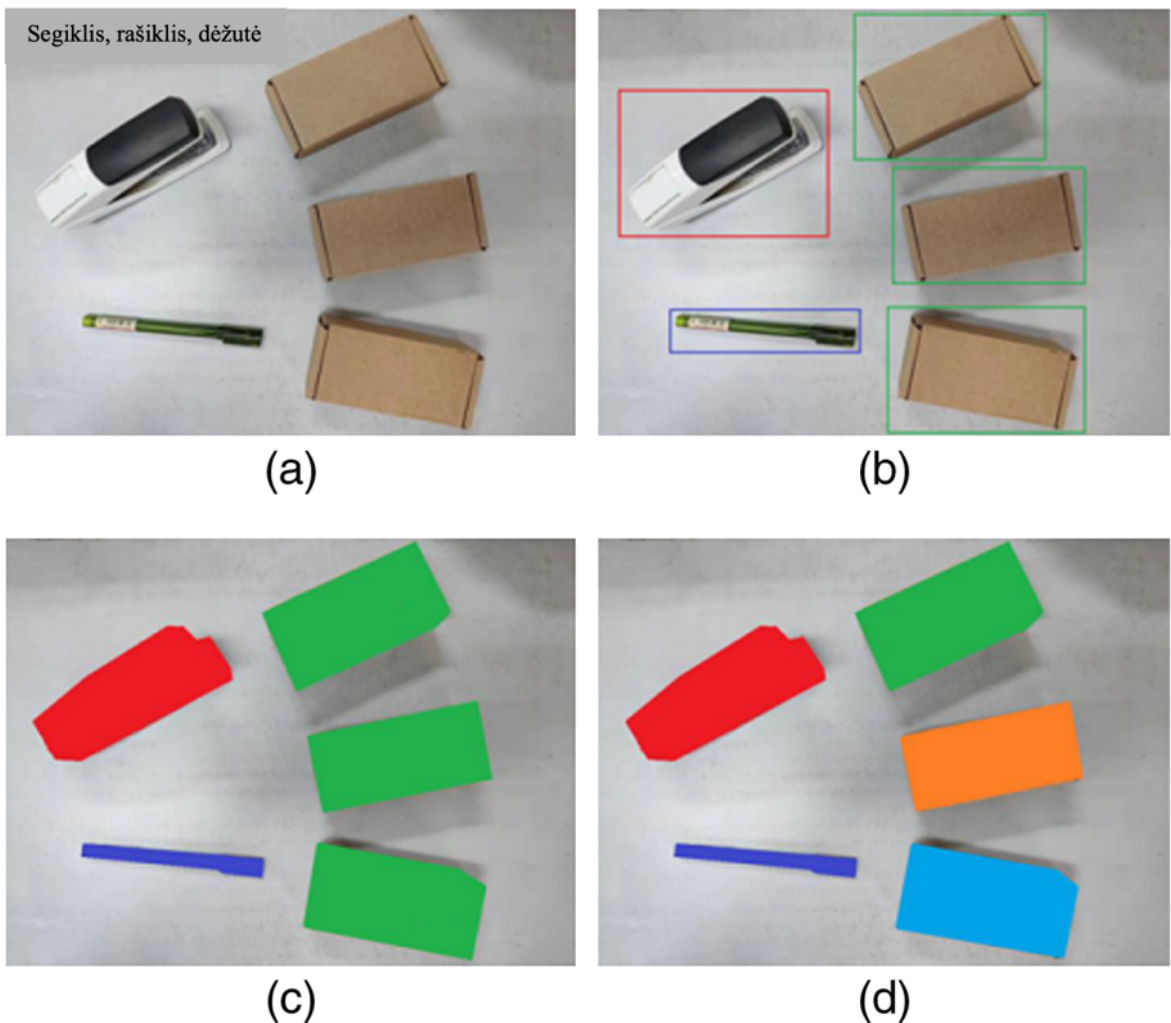
- vaizdų klasifikavimas (angl. *Image Classification*);
- objektų atpažinimas (angl. *Object Detection*);
- semantinis segmentavimas (angl. *Semantic Segmentation*);
- egzempliorių segmentavimas (angl. *Instance Segmentation*).

Vaizdų klasifikavimo pagrindinis tikslas – priskirti vaizdui kategoriją. Objektų atpažinimo užduotis – ne tik priskirti vaizdui kategorijas, bet taip pat ir pažymėti kiekvieną objektą ribojantį laukelį. Semantinio segmentavimo užduotis yra priskirti kategoriją kiekvienam vaizdo pikseliui, taip pat segmentuoti bei aptikti tam tikras kategorijas ir aiškiai atskirti ribas tarp skirtingų kategorijų. Atskiriant kiekvieną kategoriją egzempliorių segmentavimo metu taip pat išskiriamas ir kiekvienas atitinkamos kategorijos egzempliorius (objektas). Egzempliorių segmentavimas gali būti laikomas kaip atliekantis objektų atpažinimo ir semantinio segmentavimo užduotis tuo pačiu metu. Tai pati sudėtingiausia užduotis iš keturių pagrindinių kompiuterinės regos užduočių, taip pat yra labai reikšminga tokiose srityse kaip išmanus vairavimas ar medicina [7]. Keturios pagrindinės kompiuterinės regos užduotys pateiktos 1 paveiksle.

Egzempliorių segmentavimas gali suteikti daugiau informacijos negu kitos kompiuterinės regos užduotys, tačiau tai taip pat yra ir daug sudėtingesnė užduotis.

Pirminis kiekybinės bakterijų ar jų bendruomenių analizės vaizduose žingsnis – šių dominančių objektų aptikimas. Pirmiausia reikia nustatyti vaizdų sritis, kuriose yra norimi analizuoti objektai, ir atskirti juos nuo fono ir nuo kitų objektų, kurie neturėtų būti analizuojami. Tai semantinio segmentavimo užduotis. Kiti semantinio segmentavimo pavyzdžiai galėtų būti visų bakterijų ląstelių aptikimas vaizde, vieno tipo bakterijų ląstelių atskyrimas nuo kito tipo ląstelių ir fono, bakterijų mikrokolonijų aptikimas vaizde ir t. t. Nors ši užduotis gali būti akivaizdi žmogui, tai yra sudėtinga automatizuotos vaizdų analizės problema, nes reikia rasti taisykles, pagal kurias kiekvienas vaizdo pikselis būtų priskirtas tam tikroms kategorijoms arba fonui. Semantinis segmentavimas gali būti ypač sudėtingas, kai vaizdo fonas yra nevienodas arba sunku atskirti triukšmą nuo dominančių objektų [4].

Norint vaizde identifikuoti kiekvieną vienetą reikia atlikti egzempliorių segmentavimą. Kai vaizde ląstelės yra toli viena nuo kitos, egzempliorių segmentavimas yra gana paprastas. Tačiau vaizdams, kuriuose ląstelės yra arti viena kitos, tobulas egzempliorių segmentavimas yra iššūkis [8], o ši užduotis tampa dar sudėtingesnė tankioms bakterijų bendruomenėms arba ląstelių dalijimosi metu.



1 pav. Keturios pagrindinės kompiuterinės regos užduotys pagal [7]: (a) – vaizdų klasifikavimas, (b) – objektų atpažinimas, (c) – semantinis segmentavimas, (d) – egzempliorių segmentavimas

Norint suprasti metodiką, kuria remiantis sukurti objektų aptikimo vaizduose algoritmai, svarbu įvertinti kai kurias pagrindines vaizdų savybes. Labai jautrūs moksliniai fotoaparatai (arba taškinio skenavimo konfokaliniai mikroskopai) paprastai gauna dvimačius pilkos spalvos vaizdus – kiekvienam kanalui ir (arba) vaizdo plokštumai gaunamas vienas toks dvimatis vaizdas. Dvimatis vaizdas yra dvimatis masyvas, sudarytas iš skaičių, kurie reiškia kiekvieno pikselio intensyvumą. Objektams aptikti šiame masyve įprastai yra naudojamos matematinės operacijos [9]. Pagrindinė matematinė operacija, naudojama vaizdų analizėje, yra filtravimas – vaizdo matricos sąsūka su branduoliu. Pritaikant sąsūkos operaciją kiekvienas vaizdo taškas pakeičiamas atsižvelgiant į jo gretimus pikselius, tokiu būdu yra sukuriamas naujas vaizdas. Pavyzdžiui, vaizdų triukšmą galima sumažinti apskaičiuojant gretimų pikselių vidurkį, tada gautas vaizdas bus šiek tiek neryškus. Pasirenkant kitus branduolius ir įvairius jų derinius galima gauti filtrus, kurie paryškina vaizdą arba pabrėžia objektų kraštus [4, 9].

Kaip teigia H. Jeckel ir K. Drescher'is [4], semantinio ir egzempliorių segmentavimo metodus galima klasifikuoti kaip tradicinius vaizdų analizės metodus ir mašininio mokymosi metodus.

1.2. Tradiciniai segmentavimo metodai

Egzempliorių segmentavimas gali būti siejamas su tradicine vaizdų segmentavimo technologija, kuri padalija vaizdus į atskirus, turinčius prasmę regionus. Tradicinis egzempliorių segmentavimas yra daugelio dabartinių mikrobiologijos vaizdų analizės įrankių pagrindas [4]. To paties regiono pikseliai koreliuoja tarpusavyje, o tarp skirtingų regionų pikselių egzistuoja tam tikrų skirtumų [7]. Atliekant tradicinę vaizdų analizę, vaizdai paprastai apdorojami paeiliui taikant kelis skirtingus filtrus, kad būtų pašalintas fonas, padidintas signalo ir triukšmo santykis bei paryškintos dominančios struktūros. Nors branduolio dydžiai ir kitos ypatybės gali būti pritaikomos pagal ląstelių (ar kolonijų), kurias reikia analizuoti, dydį, analizę atliekančio žmogaus patirtis dažniausiai lemia, kokie filtrai bus pasirenkami ir kokia eilės tvarka. Jei keičiama įvesties vaizdų kokybė ar struktūra, dažnai reikia pritaikyti parametrus ir filtrus. Kad būtų pasiektas semantinis segmentavimas, atskiriantis dominančius objektus nuo fono, vaizdams, kurie anksčiau buvo filtruojami, paprastai taikomas slenkstis, todėl gaunamas dvejetainis vaizdas, vadinamas kauke. Tada dvejetainiam vaizdui galima pritaikyti keletą morfologinių operacijų, kad kaukės vaizdas sudarytų tikslų galutinį semantinį segmentavimą. Tokių operacijų pavyzdžiai galėtų būti mažų objektų pašalinimas, užpildymas bei išplėtimas arba susiaurinimas [10].

Po semantinio segmentavimo reikia taikyti tolesnį apdorojimą, kad būtų pasiektas tikslus egzempliorių segmentavimo rezultatas. Tradicinis egzempliorių segmentavimas paprastai remiasi skirtingų tipų briaunų aptikimo algoritmais, slenksčiais (angl. *thresholds*), grupavimu (angl. *clustering*), takoskyros algoritmu (angl. *watershed*), skeleto algoritmu arba bet kokia kita veikiančia operacija tam tikro tipo vaizdui [4, 7].

Riba, slenksčiu pagrįsto vaizdų segmentavimo metodo esmė – vaizdo pikselių klasifikavimas pagal skirtingas pilkos spalvos ribas (slenksčius). To paties pilkos spalvos atspalvio intervalo pikseliai suklasifikuojami į tą pačią kategoriją ir laikoma, kad pasižymi panašiomis savybėmis. Šis metodas tinkamas vaizdams su tolygiu pilkų tonų pasiskirstymu ir aiškiais pilkų atspalvių skirtumais tarp objektų ir jų fonų, tačiau šis metodas jautrus triukšmui [7].

Briauna grįstas vaizdų segmentavimas dažniausiai naudojamas objektų ribose esančių pikselių aptikimui. Tuomet pikseliai sujungiami, kad susidarytų vaizdų kraštų kontūrai [7].

Grupavimu paremto vaizdų segmentavimo principas – sujungti gretimus, su panašiomis charakteristikomis pikselius į vieną kategoriją, tokiu būdu sujungiant visus pikselius į keletą skirtingų kategorijų ir išskiriant sritis vaizde. Vienas dažniausiai naudojamų grupavimo metodų – k -vidurkių metodas (angl. *K-means*) [7].

Tais atvejais, kuomet atskiras ląsteles vaizduose vizualiai atskirti nėra sudėtinga, galima kokybiškai įvertinti semantinio segmentavimo tikslumą, palyginus gautąjį segmentavimą su tikruoju vaizdu. Tačiau, jei ląsteles atskirti sudėtinga dėl jų susitelkimo į klasterius ar skiriamosios gebos trūkumo, toks vertinimas tampa labai ribotas. Pavyzdžiui, matuojant mikrobu bendruomenės biotūrį, bioplėvelės krašto pikselių vieta nėra vienareikšmiškai apibrėžta. Todėl skirtingi segmentavimo algoritmai nustatys, kad bioplėvelės kraštas yra šiek tiek skirtingose vietose. Kadangi atliekant bioplėvelių tyrimus dažniausiai analizuojami mikrobu bendruomenių, neturinčių vienos ląstelės skiriamosios gebos, vaizdai, dėl tikslaus semantinio segmentavimo poreikio buvo sukurta daugybė skirtingų algoritminių sprendimų bioplėvelės biotūrio aptikimui [11 – 16]. Įvairių sprendimų gausa parodo, jog tradicinis semantinis segmentavimas suteikia vartotojams daug laisvės pasirenkant filtrus,

slenksčius ir morfologines operacijas bei jų parametrus. Todėl atliekant bet kokią vaizdų analizę būtina palyginti segmentavimo rezultatų tikslumą, tinkamumą, pasirenkant atitinkamą vertinimo metodiką [4].

Naudojant tradicinius vaizdų apdorojimo metodus galima pasiekti tikslų semantinį ir egzempliorių segmentavimą, tačiau šie metodai turi ir didelių trūkumų. Vienas iš jų – taikomų filtrų parinkimas ir eiliškumas, filtrų parametrai, slenkstinės ir morfologinės operacijos turi būti atitinkamai pritaikytos, kai ląstelės yra arti arba liečiasi viena su kita. Panašaus pritaikymo reikia ir įvesties vaizdams, kuriuose skiriasi ląstelių dydžiai, vaizdo fonas ar ląstelių dydžiai. Tokie atvejai apriboja tradicinių vaizdų apdorojimo metodų naudojimo sritį be rankinio parametrų koregavimo [4].

1.3. Mašininio mokymosi metodai egzemplioriams segmentuoti

Apeidami tradicinių vaizdų analizės apribojimus giliojo mokymosi metodai, tokie kaip sąsūkų neuroniniai tinklai, pastaraisiais metais žymiai pagerino ne tik mikroskopinių vaizdų, bet ir bet kokio tipo vaizdų turinio segmentavimo tikslumą [17]. Turėdami pakankamai mokymo duomenų ir skaičiavimo išteklių, jie gali pasiekti labai tikslų semantinį arba egzempliorių segmentavimą įvairiems ląstelių tipams [18 – 22]. Naudojant atitinkamą tinklo architektūrą, sąsūkų neuroninių tinklų pritaikymas biologinių vaizdų analizei yra labai įvairus – nuo klasifikavimo užduočių (pavyzdžiui, ląstelių būsenų identifikavimo), iki vaizdo atkūrimo ir segmentavimo [23, 24].

Pasak D. Tian'o ir kitų [7], egzempliorių segmentavimas gali būti sprendžiamas trijų tipų metodais. Kadangi egzempliorių segmentavimą galima apibrėžti kaip objektų atpažinimo bei semantinio segmentavimo užduočių kombinaciją, metodus galima sudaryti dviem skirtingais būdais. Pirmasis – atpažinimu grįstas metodas, kuris panašus į objektų atpažinimo užduotį. Šis metodas pirmiausiai aptinka kiekvieno objekto sritį ir tuomet išskiria kaukę kiekvienoje srityje. Antrasis – pikselių grupavimu paremtas metodas. Šis metodas pirmiausiai prognozuoja kiekvieno pikselio kategoriją ir tuomet grupuoja naudodamas klasterizavimo metodą, taip suformuodamas egzempliorių segmentavimo rezultatus. Šie abu sprendimo būdai yra dviejų etapų segmentavimo metodai, sulaukę daugelio tyrėjų dėmesio. Be šių metodų tipų taip pat buvo sukurtas vieno etapo egzempliorių segmentavimo metodas, padidinęs apdorojimo greitį lyginant su kitų tipų metodais [7].

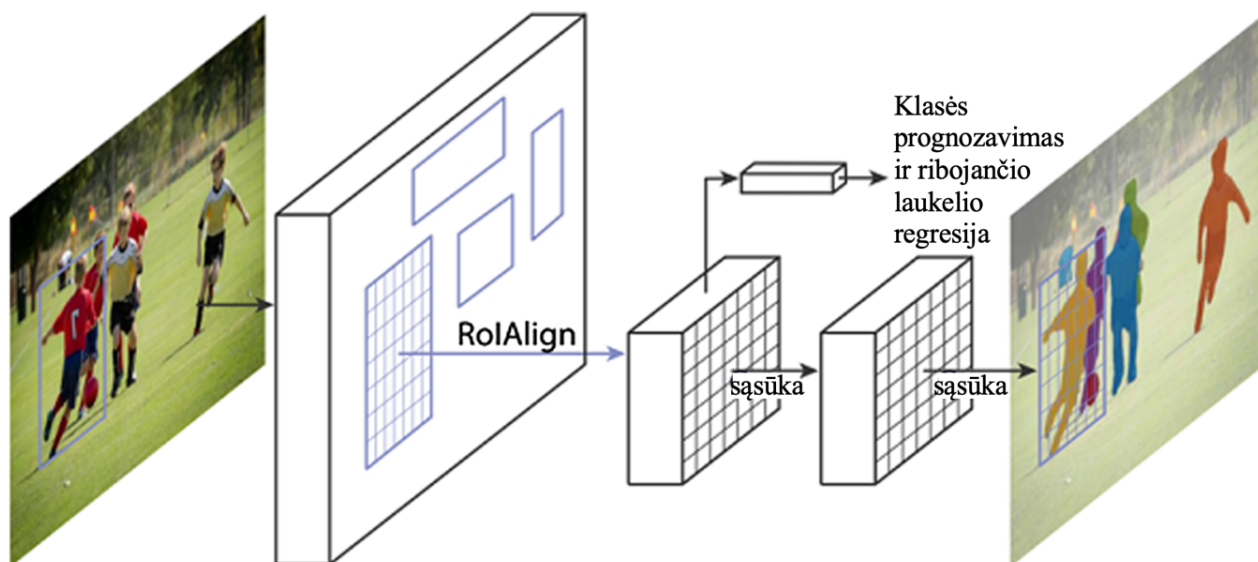
Sąsūkų neuroninių tinklų taikymas objektų atpažinimo srityje stipriai paspartino objektų atpažinimo tobulėjimą. 2014 m. R. Girshick'as, J. Donahue, T. Darrell'as ir J. Malik'as [24] pasiūlė R-CNN struktūrą, kuri naudoja atrankinę paiešką [26] tam, kad sugeneruotų sričių pasiūlymo langelius vaizde, ir tuomet naudoja sąsūkų neuroninį tinklą požymiams išgauti. Galiausiai apmokomas atraminių vektorių mašinos klasifikatorius rezultatui prognozuoti. Šio algoritmo atsiradimas labai paskatino objektų atpažinimo technologijos tolimesnį vystymąsi. Vėliau autorius patobulino R-CNN ir pasiūlė Fast R-CNN [27] bei Faster R-CNN [28] tinklus.

2016 m. J. Dai, K. He ir J. Sun'as [29] pasiūlė kelių užduočių algoritmą, skirtą problemai, jog semantinio segmentavimo algoritmai negali būti taikomi egzemplioriams segmentuoti. Autorių pasiūlytas modelis yra sudarytas iš trijų dalių: egzempliorių išskyrimas, kaukių įvertinimas bei

objektų klasifikavimas. Šios dalys suprojektuotos kaip kaskadinė konstrukcija. Algoritmas pasiekė geriausią egzempliorių segmentavimo tikslumą tuo metu naudojant VOC¹ duomenų rinkinį [7].

Mask R-CNN – tai K. He, G. Gkioxari, P. Dollár'o ir R. Girshick'o [21] 2017 m. pristatytas sąsūkų neuroninis tinklas egzemplioriams segmentuoti. Šis algoritmas paremtas Faster R-CNN tinklu, papildomai jame pridedant atšaką objekto kaukei prognozuoti. Faster R-CNN sudarytas iš dviejų etapų. Pirmasis etapas, vadinamas regionus siūlančiu tinklu (angl. *Region Proposal Network*, RPN), pasiūlo objektus ribojančius langelius-kandidatus. Antrasis etapas, kuris iš esmės yra Fast R-CNN, išskiria požymius, naudodamas dominančių regionų sujungimą (angl. *Region of Interest Pooling*, *RoIPool*) kiekvienam langeliui-kandidatui, ir atlieka klasifikavimą bei ribojančio laukelio regresiją [21].

Mask R-CNN pritaiko tokią pačią dviejų etapų metodiką su analogišku pirmuoju etapu – regionus siūlančiu tinklu RPN. Antrajame etape atlikdamas klasės prognozavimą ir ribojančio laukelio regresiją tuo pačiu metu Mask R-CNN išveda ir dvejetainę kaukę kiekvienam dominančiam regionui *RoI*. Vietoje *RoIPool* sluoksnio Mask R-CNN pasiūlytas *RoIAlign* sluoksnis [21]. Mask R-CNN struktūra pateikta 2 paveiksle.



2 pav. Mask R-CNN struktūra egzempliorių segmentavimo užduočiai pagal [21]

2018 m. S. Liu ir kiti [30] pasiūlė PANet. Taikant kelio tobulinimo metodą „iš apačios į viršų“, tikslūs padėties nustatymo signalai naudojami žemesniame lygmenyje siekiant pagerinti visą požymių hierarchiją. Informacijos kelias tarp žemesnio ir aukščiausio lygio yra sutrumpinamas. Taip pat pasiūlytas prisitaikantis požymių telkimas (angl. *Adaptive Feature Pool*) tam, kad kiekvieno sluoksnio naudinga informacija būtų tiesiogiai perduodama į kitus pasiūlymų potinklius bei sukurta papildoma atšaka, fiksuojanti skirtingus kiekvieno pasiūlymo vaizdus ir patobulinanti kaukės prognozavimą [30].

¹ PASCAL VOC duomenų rinkinys naudotas PASCAL VOC iššūkyje nuo 2005 iki 2012 m. Rinkinys sudarytas iš 11 540 paveikslėlių ir 20 kategorijų. Gali būti naudojamas tokioms užduotims kaip objektų atpažinimas, semantinis segmentavimas bei egzempliorių segmentavimas [59].

Kita egzempliorių segmentavimo metodų grupė yra pagrįsta grįžtamojo ryšio (rekurentiniais) neuroniniais tinklais (RNN), kurie egzempliorius generuoja nuosekliai. 2016 m. B. Romera-Paredes'as ir P. H. S. Torr'as [31] panaudojo LSTM tinklus [32] egzemplioriams segmentuoti ir skaičiuoti. 2017 m. M. Ren'as ir R. S. Zemel'is [33] pasiūlė grįžtamojo ryšio tinklo ir ribojančių langelių pasiūlymų derinį.

Skaitmeninė patologija yra nauja patologinių audinių mėginių analizės tema. Ji apima įrankius, skirtus labiau automatizuotam kliniškai svarbios informacijos gavimo procesui. Pastaruoju metu kompiuterinis mikroorganizmų segmentavimas susilaukė daug dėmesio, todėl buvo sukurta nemažai šiai užduočiai skirtų algoritmų. Didžioji dalis jų yra pagrįsti visų ląstelių branduolių semantiniu segmentavimu ir persidengiančių atvejų atskyrimu tolesniame apdorojimo etape [34]. Branduolių segmentavimas yra pagrindinė įvairių patologijos programų, įskaitant branduolių morfologijos analizę, ląstelių tipų klasifikavimą ir vėžio klasifikavimą, užduotis. Gilusis mokymasis yra labai tinkamas branduoliams segmentuoti, tačiau sąsukų neuroninių tinklų tikslumas taip pat priklauso ir nuo mokymui naudojamų duomenų kiekio ir kokybės [4, 35]. Objektų aptikimo užduočiai apmokyti reikalingas neapdorotas vaizdas ir jo kaukė. Jei eksperimentiniu būdu gauti vaizdai naudojami neapdoroti, tai tikrosios kaukės dažnai gaunamos žymint rankiniu būdu. Šis rankomis atliekamas žymėjimas yra daug laiko reikalaujanti užduotis, kuri greitai gali tapti vaizdų analizės kliūtimi, o taip pat rankomis žymėtuose segmentuose gali atsirasti klaidų ar netikslumų. Tokius mokymo duomenų netikslumus sąsukų neuroniniai tinklai gali išmokti ir dėl to rezultatuose gali atsirasti klaidų. Norint įveikti šį iššūkį galima naudoti duomenų papildymo (angl. *Data Augmentation*) arba mokymosi perkėlimo (angl. *Transfer Learning*) [36] metodus. Duomenų papildymo metodas padidina mokymo duomenų kiekį pritaikydamas pagrindines vaizdų transformacijas. Mokymosi perkėlimo būdu anksčiau mokyti su panašiais, bet skirtingais, dideliais duomenų kiekiais sąsukų neuroninių tinklų modeliai yra iš naujo mokomi naudojant konkrečius mokymo duomenis. Kitas būdas generuoti didelius mokymo duomenų rinkinius, nereikalaujant didelės rankinės anotacijos, yra pateikti ne eksperimentiniu būdu gautus vaizdus, o imituotus mokymo duomenis. Naudojant modeliuojamus mokymo duomenis automatiškai pasiekiamas tobulas tikrosios kaukės segmentavimas, nes modeliuojami duomenys neturi rankinio žymėjimo neapibrėžtumo [4].

2017 m. A. Ferrari, S. Lombardi ir A. Signoroni [37] buvo vieni iš pirmųjų, panaudoję klasikinių sąsukų neuroninių tinklų egzempliorių segmentavimą bakterijų kolonijų vienetais skaičiuoti. 2020 m. E. Budginaitė, M. Morkūnas, A. Laurinavičius ir P. Treigys [38] pristatė patobulintą Micro-Net modeliu pagrįstą metodiką, skirtą ląstelių branduoliams segmentuoti ir imuninėms ląstelėms diagnostiniuose vaizduose identifikuoti. Metodika pritaikyta hematoksilinu ir eozinu nudažytų krūties vėžio ir gaubtinės bei tiesiosios žarnos vėžio audinių vaizdų rinkinyje, siekiant aptikti navikuose infiltruojančius limfocitus.

2020 m. V. Kulikov'as ir V. Lempitsky [5] pristatė naują egzempliorių segmentavimo metodą, pritaikytą biologiniams vaizdams, kai egzemplioriai (objektai) gali reikšti atskiras ląsteles, organizmus ar augalų dalis. Skirtingai nuo egzempliorių segmentavimo nuotraukoms ar kelių vaizdams, biologinių duomenų objektų egzemplioriai gali būti ypač tankiai išsidėstę, išvaizdos skirtumai gali būti ypač maži, apdorojimo galia gali būti apribota, tačiau kita vertus, atskirų egzempliorių dydžių kintamumas gali būti mažas. Autoriai darbe pasiūlė naują metodą, sukurta biologinio vaizdo egzemplioriams segmentuoti, kuris gali palengvinti iššūkius (egzempliorių skaičius, persidengimai) išnaudodamas palengvinančias savybes (ribotas masto kitimas). Metodas apibūdina kiekvieną objekto egzempliorių, tikėdamasis riboto skaičiaus sinuso bangų, kurių dažniai

ir fazės pritaikyti prie konkretaus objekto dydžio ir tankio. Apmokymo metu pilnasis sąsūkų tinklas išmoksta numatyti objekto įterpimą (angl. *Object Embedding*) kiekviename pikselielyje naudojant paprastą taškinę regresijos klaidą (angl. *Pixelwise Regression Loss*), o testavimo metu egzemplioriai atkuriami naudojant grupavimą įterpimo erdvėje. Metodas patenka į egzempliorių segmentavimo metodų be pasiūlymų kategoriją, pagrįstą egzempliorių įterpimu. Neuroniniai tinklai naudojami vaizdo pikseliams įterpti į paslėptą daugiamatę erdvę, kurioje tam pačiam egzemplioriui priklausančių pikselių įterpiniai turėtų būti panašūs. Eksperimentuose parodoma, kad metodas pranoksta ankstesnius įterpimu paremtus egzempliorių segmentavimo metodus daugelyje biologinių duomenų rinkinių [5].

Mask R-CNN modelis dažnai taikomas mikrobiologijos srityje. 2019 m. A. Vuola, A. U. Akram'as ir J. Kannala [39] palygino U-Net ir Mask R-CNN modelius ir pritaikė šių modelių kombinaciją branduoliams segmentuoti. 2021 m. S. Fudickar'as, E. J. Nustede, E. Dreyer ir J. Bornhorst [40] pasiekė aukštus egzempliorių segmentavimo rezultatus naudodami Mask R-CNN Petri lėkštelių su *C. Elegans* vaizdus. 2021 m. B. Bancher ir kiti [34] pasiūlė modifikuotą Mask R-CNN metodą hematoksilinu ir eozinu nudažytų histologinių vaizdų ląstelių egzemplioriams segmentuoti, įtraukdami objektų atstumo žemėlapius ir hematoksilino dėmių intensyvumą kaip papildomus modelio įvesties kanalus. Jų rezultatai rodo, kad naudojant siūlomus metodus, galima gauti vidutinius egzempliorių segmentavimo pagerinimus iki 3,5 % ir 4,1 % pagal sujungtą Jaccard'o indeksą (angl. *Aggregate Jaccard Index*) ir panoptinį kokybės balą (angl. *Panoptic Quality score*), lyginant su standartiniu Mask R-CNN modeliu [34]. Taip pat 2021 m. T. Naets ir kiti [2] pritaikė Mask R-CNN modelį BVG- ir BVG+ tipų bakterijų, užaugintų Petri lėkštelėse, kolonijas sudarantiems vienetams skaičiuoti.

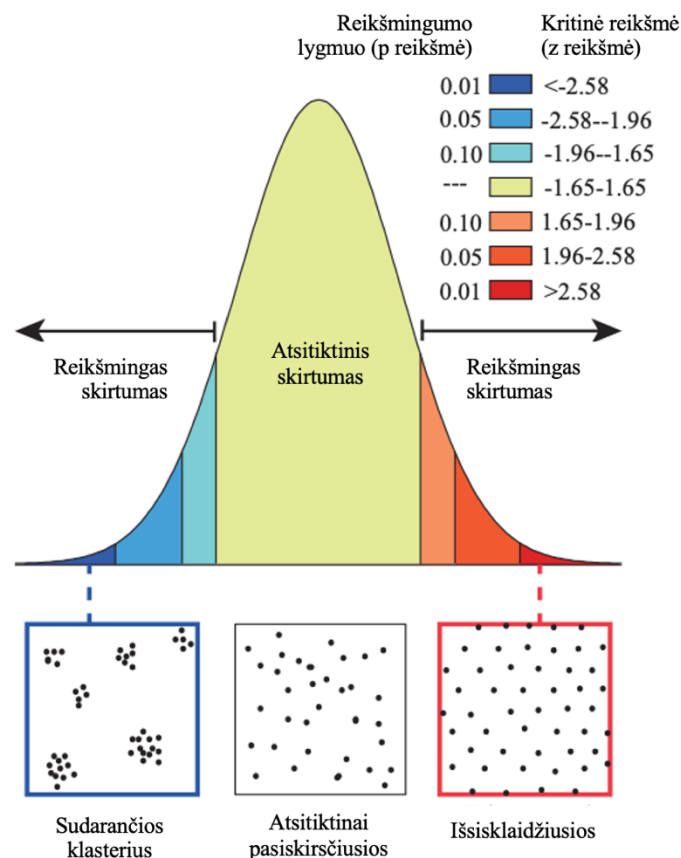
2021 m. Swapnesh Panigrahi ir kiti [1] sukūrė MiSiC – giliuoju mokymusi paremtą dvimatį segmentavimo metodą, automatiškai segmentuojantį atskiras bakterijas sudėtinguose bakterijų bendruomenių vaizduose. Šiam metodui reikalingas labai mažas parametrų koregavimas. Siekdami sumažinti vaizdo intensyvumo svyravimų poveikį, jie transformavimo įvesties vaizdus į tarpinius vaizdo pavaizdavimus, gautus iš vaizduojamų objektų formos ir išlinkimų – Hessian'o matricos arba antros eilės diferencijavimo. Vaizdo intensyvumo lauko kreivės pokyčiai pavaizduoti vadinamajame formos indekso žemėlapyje (angl. *Shape Index map*), gautame iš vaizdo Hessian'o matricos tikrinių reikšmių. Todėl visi mikroskopiniai vaizdai paversti formos indekso vaizdais, kurių pikselių intensyvumo reikšmės kinta priklausomai nuo objekto kreivumo ir svyruoja nuo -1 iki +1, kur -1 reikšmė reiškia neigiamą kupolo formą (angl. *dome-shape*), o +1 – teigiamą kupolo formą. Įvairiomis eksperimentinėmis sąlygomis gauti bakterijų ląstelių formos indekso vaizdai buvo naudojami U-Net mokymui. Pritaikydami bakterijų plėšrūno ir aukos sąveikos modelį (angl. *predator-prey*), autoriai parodė, kad MiSiC leidžia analizuoti skirtingų rūšių sąveiką ir atskirti rūšis milimetro dydžio duomenų rinkiniuose [1].

Kompiuterinės regos srityje nemažai autorių [41 – 44] sukūrė įvairius algoritmus, kurie bando paversti Petri lėkštelių vaizdus į dvejetaines kaukes ir kolonijas formuojančius vienetus (angl. *Colony-Forming-Units*), vėliau pritaikant papildomo apdorojimo technologijas bandant segmentuoti kiekvieną koloniją formuojantį vienetą [2]. Atviro kodo programinė įranga, tokia kaip *OpenCFU* [45], *CellProfiler* [46] ir *AutoCellSeg* [44] atsirado dėl šios srities tyrimų, taip pat egzistuoja ir komerciniai programinės bei techninės įrangos sprendimai. Gilusis spalvinimas (*DeepColoring*) [47] siūlo egzempliorių segmentavimą sumažinti iki semantinio segmentavimo, kur klasių etiketės pakartotinai naudojamos negretimiems objektams.

F. Mahmood ir kiti [35] teigė, kad įprastiems sąsūkų neuroninių tinklų metodams trūksta struktūrizuotų prognozavimo galimybių, kurių reikia norint atskirti persidengiančius branduolius. Todėl jie 2020 m. šiai užduočiai pristatė branduolių segmentavimo metodą, naudojančią sąlyginę generacinę priešpriešinę tinklą (angl. *conditional Generative Adversarial Network*, cGAN), kuris apmokomas naudojant tiek sugeneruotus, tiek tikrus duomenis. Autoriai sugeneravo didelį, idealiai segmentuotą mokymo duomenų rinkinį, naudodami nesuporuotą generacinio priešpriešinio tinklo sistemą. Šie sugeneruoti duomenys kartu su tikrais šešių skirtingų organų histopatologijos duomenimis panaudoti sąlyginiam generaciniam priešpriešiniam tinklui apmokyti. Autoriai parodė, kad šis branduolių segmentavimo metodas yra apibendrintas skirtingiems organams, vietoms, pacientams ir ligos būsenoms bei pranoksta įprastinius metodus, ypač išskiriant pavienius ir persidengiančius branduolius [35]. Panašų darbą anksčiau, 2017 m., atliko ir L. Hou ir kiti [48], kurie pristatė metodiką branduoliams segmentuoti keturių vėžinių tipų vaizduose. Jų metodas generuoja sintetinių histopatologinių vaizdų aibę su informacija apie segmentavimo kaukes, kitu etapu patobulina pradinį sintetinius vaizdus (prideda tipus) naudodamas generacinę priešpriešinę tinklą ir trečiame žingsnyje apmoko sąsūkų neuroninį tinklą naudodamas ir sugeneruotus sintetinius vaizdus. Autoriai teigia, jog sugeneruoti sintetiniai vaizdai yra ne tik realistiški, bet ir sukeltys iššūkių mokant sąsūkų neuroninius tinklus.

1.4. Dalelių pasiskirstymo analizė

Atlikus bakterijų ar kitų dalelių segmentavimą vaizduose dažnai atliekama papildoma dalelių analizė.



3 pav. Pasiskirstymo struktūros pagal artimiausio kaimyno vidurkį. Parengta pagal [49]

Pačių dalelių (o ne jų dydžio ar formos) pasiskirstymo vertinimo vaizde srityje dažnai viena ar kita forma naudojamas artimiausio kaimyno atstumo algoritmas. J. Tu ir kiti [49] 2020 m. pritaikė artimiausio kaimyno santykį imties taškų pasiskirstymo struktūrai nustatyti. Autoriai išskyrė dvi pasiskirstymo grupes – reguliariai ir nereguliariai pasiskirsčiusių. Nereguliarus pasiskirstymas apibrėžtas kaip dalelių susitelkimas į klasterius, o reguliarus – atsitiktinis pasiskirstymas išsisklaidžiusios / atsiskyrusios (angl. *self-avoiding, dispersed*) dalelės (3 pav.). M. Sriubas ir kiti [3] 2022 m. taip pat analizavo dalelių vidutinius nanodalelių skersmenis bei vidutinius atstumus tarp visų dalelių kraštų.

1.5. Darbo aktualumas

Kompiuterinės regos panaudojimui plečiantis į sudėtingas sferas tradicinė vaizdų segmentavimo metodika nebeatitiko objektų segmentavimo reikalavimų [7]. Panaudojus giliojo mokymosi algoritmus, vaizdų segmentavimas padarė didelę pažangą. Tokie vaizdų segmentavimo algoritmai kaip Mask R-CNN suteikė galimybę naudoti egzempliorių segmentavimo technologiją esant sudėtingesnėms situacijoms.

Keli Kauno technologijos universiteto Matematikos ir gamtos mokslų fakulteto dėstytojai kartu su Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ir KTH karališkojo technologijos instituto kolegomis (M. Sriubas ir kiti [3]) 2022 m. atliko tyrimą apie sidabro ir aukso nanodalelėmis padengtų plonų titano dioksido plėvelių antibakterinį aktyvumą prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* bakterijų rūšis, susijusias su burnos ligomis. Tyrimo metu optiniu mikroskopu gauti eksperimentiniai vaizdai ir jiems pritaikytas U-Net sąsūkų neuroninis tinklas siekiant aptikti bakterijas ir jų sankaupas vaizduose – atliktas semantinis segmentavimas.

Šiame magistro baigiamuoju darbe norima pritaikyti egzempliorių segmentavimo algoritmą bakterijų aptikimo uždaviniui minėtojo tyrimo metu gautiems eksperimentiniams vaizdams ir įvertinti bakterijų pasiskirstymą. Sėkmingai sudaryta metodika leistų analizuoti ne tik bakterijų klasterius kaip vieną objektą, bet ir kiekvieną klasterį sudarančią ar su kitomis bakterijomis besiliečiančią bakteriją.

2. Duomenys ir tyrimo metodai

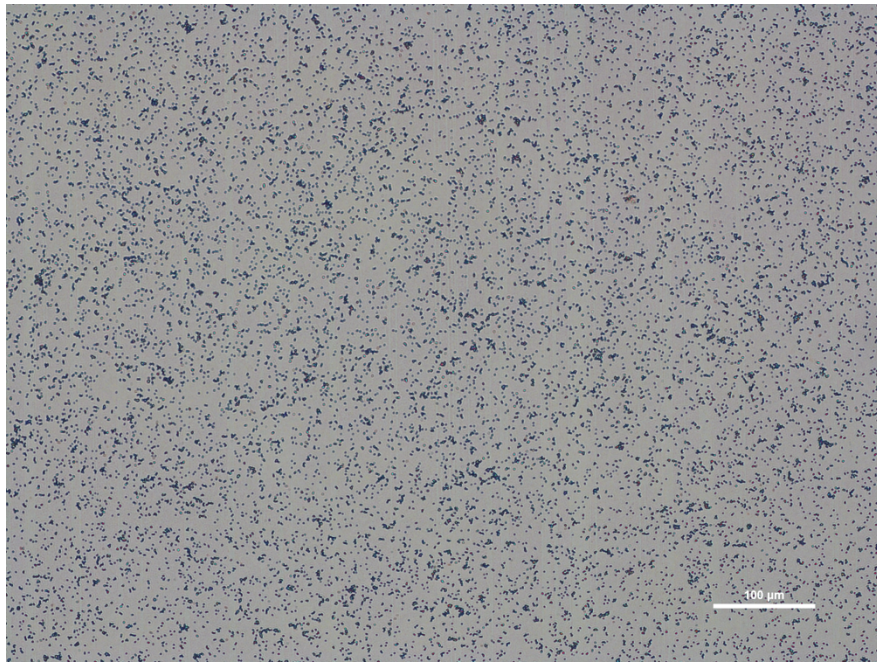
Tyrimo metodologinė eiga pateikta 4 paveiksle. Mėlynos spalvos etapai reiškia siūlomą metodiką norint įvertinti bakterijų pasiskirstymą vaizduose: atliekamas bakterijų segmentavimas, apskaičiuojami artimiausio kaimyno atstumai bei pagal juos atliekamas pasiskirstymo įvertinimas (naudojant atitinkamas statistikas hipotezėms patikrinti). Balti langeliai yra papildomi žingsniai, kurie atliekami tyrimo metu. Dalelių charakteristikų apskaičiavimo žingsnis gali būti atliekamas, jei yra norima gauti daugiau informacijos apie bakterijas – jų kiekį, plotą, formos įvertinimą ir t. t. Kiti balti langeliai (pradinių duomenų paruošimas, modelio apmokymas bei modelių metrikų palyginimas pagal įvertintus pasiskirstymo tipus) reikalingi egzempliorių segmentavimo modeliui paruošti ir tobulinti. Atsižvelgiant į bakterijų pasiskirstymo ir modelių metrikų ryšį bei įvertintus skirtumus grupėse, galima įvertinti problemines modelio sritis ir atlikti reikšmingus pakeitimus.



4 pav. Tyrimo metodologinė eiga

2.1. Duomenys ir jų apdorojimas

Kaip minėta 1.5 poskyryje, duomenys yra eksperimentiniai optinio mikroskopo vaizdai, gauti tiriant sidabro ir aukso nanodalelėmis padengtų titano dioksido (TiO_2) plonų plėvelių antibakterinį aktyvumą prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* bakterijų rūšis, susijusias su burnos ligomis [3]. Vaizdo pavyzdys pateiktas 5 pav.



5 pav. Tyrime naudojamo vaizdo pavyzdys

2.1.1. Gauso filtras

Gauso filtras – tai žemo dažnio filtras, naudojamas triukšmui (aukšto dažnio komponentams) sumažinti ir vaizdo sritims sulieti. Gauso pasiskirstymas apibrėžia svorius Gauso branduolyje ((1) formulė):

$$G_{\sigma} = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(x^2+y^2)}{2\sigma^2}}; \quad (1)$$

čia G_{σ} – svoriai Gauso branduolyje;

σ – standartinis nuokrypis;

x – horizontalios ašies atstumas nuo taško;

y – vertikalios ašies atstumas nuo taško.

Šie svoriai yra naudojami svertiniam gretimų pikselių vaizde vidurkiui apskaičiuoti. Kiekviena Gauso filtro reikšmė yra iš Gauso pasiskirstymo su vidurkiu, lygiu 0. Branduolio dydis priklauso nuo Gauso pasiskirstymo standartinio nuokrypio σ [50] ((2) formulė):

$$dydis_{branduolio} = 2[3\sigma] + 1; \quad (2)$$

čia $dydis_{branduolio}$ – branduolio dydis;

σ – standartinis nuokrypis.

Prenkant standartinį nuokrypį σ galima kontroliuoti suliejimo lygį vaizde – kuo didesnis standartinis nuokrypis, tuo stipresnis suliejimo poveikis [50].

2.2. Sąsūkų neuroniniai tinklai

Tyrime pritaikytas Mask R-CNN modelis, tačiau norint aprašyti jo metodiką, tolimesniuose skyreliuose pateikiama R-CNN, Fast R-CNN ir Faster R-CNN specifika.

2.2.1. Sąsūka

Sąsūka yra integralas, išreiškiantis vienos funkcijos g persidengimą, kai ji perkeliama virš kitos funkcijos f [51]. Dviejų funkcijų f ir g sąsūka baigtiniame intervale $[0, t]$ apibrėžiama (3) formule:

$$[f * g](t) = \int_0^t f(\tau)g(t - \tau)d\tau; \quad (3)$$

čia $[f * g](t)$ – f ir g funkcijų sąsūka;

f – branduolys;

g – įvestis.

Sąsūka dažniau skaičiuojama begaliniuose režiuose ((4) formulė):

$$f * g = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau)g(t - \tau)d\tau = \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau)f(t - \tau)d\tau; \quad (4)$$

čia $f * g$ – f ir g funkcijų sąsūka.

2.2.2. R-CNN

R-CNN yra regionais paremti sąsūkų neuroniniai tinklai (angl. *Region-based Convolutional Neural Networks*). Pagrindinė idėja susideda iš dviejų etapų. Pirmiausiai, naudojant atrankinę paiešką, yra nustatomi objektus ribojančių langelių regionai-kandidatai. Tuomet atskirai išskiriamos sąsūkų neuroninių tinklų ypatybės iš kiekvieno regiono, kad būtų galima klasifikuoti [25].

R-CNN veikimo principas [25, 52]:

1. Sąsūkų neuroninis tinklas apmokomas atlikti vaizdų klasifikavimo užduotis, pavyzdžiui, VGG ar *ResNet* apmokyti naudojant *ImageNet* duomenų rinkinį;
2. Naudojant atrankinę paiešką pasiūlomi nuo kategorijos nepriklausomi dominantys regionai. Šiuose regionuose gali būti skirtingo dydžio ieškomų objektų;
3. Regionai-kandidatai yra transformuojami, kad jų dydis būtų fiksuotas;
4. Transformuoti pasiūlymo regionai yra toliau koreguojami $K + 1$ klasei. Papildoma viena klasė reiškia foną, kur nėra jokio dominančio objekto;
5. Kiekvienai vaizdo sričiai perdavimas per sąsūkų neuroninį tinklą (angl. *Forward Propagation*) sukuria savybių vektorių. Ši savybių vektorių tuomet naudoja dvejetainis atraminių vektorių klasifikatorius, atskirai paruoštas kiekvienai klasei. Kaip objektai yra siūlomi regionai, kur $IoU \geq 0,3$;
6. Siekiant sumažinti ribojančio langelio nustatymo klaidas, regresijos modelis yra apmokomas koreguoti pasiūlytą ribojantį langelį.

Ribojančio langelio regresija. Pateiktos numatomo ribojančio langelio koordinatės (5) formulėje:

$$\mathbf{p} = (p_x, p_y, p_w, p_h); \quad (5)$$

čia \mathbf{p} – ribojančio langelio koordinatės;

p_x, p_y – centro koordinatės;

p_w – plotis;

p_h – aukštis.

Ir jį atitinkančio tikrojo langelio koordinatės $\mathbf{g} = (g_x, g_y, g_w, g_h)$. Regresorius apibrėžiamas taip, kad išmokyto mastelio nekeičiančią transformaciją tarp dviejų centrų ir logaritminę mastelio transformaciją tarp pločių ir aukščių [25, 52] ((6) – (9) formulės):

$$\hat{g}_x = p_w d_x(\mathbf{p}) + p_x; \quad (6)$$

$$\hat{g}_y = p_h d_y(\mathbf{p}) + p_y; \quad (7)$$

$$\hat{g}_w = p_w e^{d_w(\mathbf{p})}; \quad (8)$$

$$\hat{g}_h = p_h e^{d_h(\mathbf{p})}; \quad (9)$$

čia $\hat{g}_x, \hat{g}_y, \hat{g}_w, \hat{g}_h$ – transformuotos koordinatės;

$d_i(\mathbf{p})$ – ribojančius langelius koreguojančios funkcijos, kur $i \in \{x, y, w, h\}$;

p_x, p_y, p_w, p_h – numatomo ribojančio langelio koordinatės.

Akivaizdus tokios transformacijos privalumas yra tas, kad visos ribojančius langelius koreguojančios funkcijos $d_i(\mathbf{p})$, kur $i \in \{x, y, w, h\}$, gali įgyti bet kokią reikšmę iš intervalo $[-\infty, +\infty]$. Šioms funkcijoms reikia išmokyti [25, 52] (10) – (13) formulėse pateiktus ryšius:

$$t_x = \frac{(g_x - p_x)}{p_w}; \quad (10)$$

$$t_y = \frac{(g_y - p_y)}{p_h}; \quad (11)$$

$$t_w = \log\left(\frac{g_w}{p_w}\right); \quad (12)$$

$$t_h = \log\left(\frac{g_h}{p_h}\right); \quad (13)$$

čia t_x, t_y, t_w, t_h – ryšiai tarp numatomo ir tikrojo ribojančių langelių koordinatė;

g_x, g_y, g_w, g_h – tikrojo ribojančio langelio koordinatės;

p_x, p_y, p_w, p_h – numatomo ribojančio langelio koordinatės.

Standartinis regresijos modelis gali išspręsti šią problemą minimizuodamas kvadratų sumos paklaidą (angl. *Sum Squared Error*, SSE) su reguliavimu [25, 52].

Nemaksimalus slopinimas. Tikėtina, kad modelis gali rasti kelis ribojančius langelius tam pačiam objektui. NMS padeda išvengti pakartotinio to paties objekto aptikimo. Kai yra gaunamas suderintas ribojančio langelių rinkinys, visi ribojantys langeliai surikiuojami pagal patikimumo balą, pašalinami

langeliai, kurių patikimumo balai žemi ir kiekvienam objektui pasirenkamas langelis su aukščiausiu patikimumo balu [25, 52].



6 pav. Nemaksimalaus slopinimo pavyzdys pagal [52]. Kairėje – ribojantys langeliai prieš nemaksimalų slopinimą, dešinėje – po

NMS yra metodas, naudojamas atliekant daugybę kompiuterinės regos užduočių. Tai algoritmų klasė, skirta pasirinkti vieną objektą (pavyzdžiui, ribojančius langelius) iš daugelio persidengiančių objektų (6 pav.). Galima pasirinkti atrankos kriterijus, kad būtų pasiekti norimi rezultatai. Kriterijai dažniausiai yra tam tikras tikimybinis skaičius ir tam tikras sutapimo matas (pavyzdžiui, IoU). Dauguma objektų aptikimo algoritmų naudoja NMS tam, kad sumažintų aptiktų ribojančių langelių skaičių iki keleto. Pradžioje dauguma objektų detektorių sugeneruoja tūkstančius įvairaus dydžio ir formų langelių (inkarų (angl. *anchors*)). Tikriausiai šiuose langeliuose yra tik vienas objektas. Kai detektorius išveda daug ribojančių langelių, reikia išfiltruoti geriausius. NMS yra dažniausiai naudojamas šios užduoties algoritmas [53].

R-CNN modelio mokymas yra lėtas, nes šie žingsniai reikalauja daug darbo [52]:

- vykdoma atrankinė paieška siekiant pasiūlyti 2000 regionų-kandidatų kiekvienam vaizdai;
- sąsūkų neuroninio tinklo savybių vektorių generavimas kiekvienam vaizdo regionui;
- visas procesas apima tris modelius, neturinčius daug bendro skaičiavimo: sąsūkų neuroninis tinklas, skirtas vaizdams klasifikuoti ir savybėms išgauti; geriausias atraminių vektorių mašinos klasifikatorius objektams identifikuoti; regresijos modelis, skirtas suspausti regionų ribojančius laukelius.

2.2.3. Fast R-CNN

Norėdamas pagerinti R-CNN greitį, R. Girshick'as 2015 m. patobulino mokymo procedūrą sujungdamas tris nepriklausomus modelius į vieną bendrai apmokytą sistemą ir padidindamas bendrą skaičiavimo rezultatų kiekį, ir pavadino naują architektūrą Fast R-CNN. Užuoat atskirai išskyręs sąsūkų neuroninių tinklų savybių vektorius kiekvienam regiono pasiūlymui, šis modelis sujungia juos į vieną sąsūkų neuroninių tinklų perėjimą per visą vaizdą ir regiono pasiūlymai dalijasi šia savybių matrica. Ta pati savybių matrica taip pat yra panaudojama apmokyti objektų klasifikatorių ir ribojančio langelio regresorių [27, 52].

RoI sujungimas. Tai maksimalaus telkimo tipas, skirtas bet kokio dydžio, $h \times w$, vaizdo srities ypatybes konvertuoti į mažą fiksuotą langą, $H \times W$. Įvesties sritis padalinama į $H \times W$ dydžio tinklelį, maždaug kiekviename $h / H \times w / W$ dydžio polangyje. Tuomet kiekviename tinklelyje taikomas maksimalus sujungimas [27, 52].

Fast R-CNN modelio veikimo principas [27, 52]:

1. Vaizdams klasifikuoti apmokomas sąsūkų neuroninis tinklas;
2. Naudojant atrankinę paiešką pasiūlomi regionai;
3. Pakeičiamas apmokytas sąsūkų neuroninis tinklas:
 - 3.1. Paskutinis maksimalaus telkimo sluoksnis pakeičiamas *RoI* telkimo sluoksniu. *RoI* telkimo sluoksnis išveda fiksuoto ilgio regionų pasiūlymų vektorius;
 - 3.2. Pakeičiamas paskutinis pilnai sujungtas sluoksnis ir paskutinis K klasių *softmax* sluoksnis pilnai sujungtu sluoksniu ir $K + 1$ klasių *softmax*.
4. Galiausiai modelis išsišakoja į du išvesties sluoksnius:
 - 4.1. $K + 1$ klasių *softmax* įvertis (kaip ir R-CNN modelyje, papildoma klasė yra fono klasė);
 - 4.2. Ribojančio laukelio regresijos modelis, numatantis kiekvienos K klasės poslinkius, lyginant su originaliu *RoI*.

Klaidos funkcija. Modelis optimizuojamas dviem užduotims – klasifikavimui ir ribojančių langelių numatymui.

Klaidos funkcija apibendrina klasifikavimo ir ribojančių langelių numatymo klaidas [27, 52] ((14) formulė):

$$\mathcal{L} = \mathcal{L}_{klasės} + \mathcal{L}_{langelio}; \quad (14)$$

čia \mathcal{L} – bendra modelio klaida;

$\mathcal{L}_{klasės}$ – klasifikavimo klaida;

$\mathcal{L}_{langelio}$ – ribojančių langelių numatymo klaida.

Fono sritims *RoI* $\mathcal{L}_{langelio}$ ignoruojama naudojant indikatorinę funkciją $\mathbb{1}[u \geq 1]$, kuri apibrėžiama (15) formulėje [27, 52]:

$$\mathbb{1}[u \geq 1] = \begin{cases} 1, & \text{kai } u \geq 1, \\ 0, & \text{kai } u < 1, \end{cases} \quad (15)$$

čia $\mathbb{1}[u \geq 1]$ – indikatorinė funkcija;

u – tikrosios klasės etiketė, $u \in 0, 1, \dots, K$, kur fono klasė $u = 0$.

Bendra klaidos funkcija [27, 52] pateikta (16) formulėje:

$$\mathcal{L}(p, u, t^u, v) = \mathcal{L}_{klasės}(p, u) + \mathbb{1}[u \geq 1]\mathcal{L}_{langelio}(t^u, v); \quad (16)$$

čia $\mathcal{L}(p, u, t^u, v)$ – bendra klaidos funkcija;

p – diskretusis tikimybių pasiskirstymas regione *RoI* tarp $K + 1$ klasių, $p = (p_0, \dots, p_K)$, apskaičiuotas *softmax* naudojant pilnai sujungto sluoksnio $K + 1$ išvestis;

u – tikrosios klasės etiketė, $u \in 0, 1, \dots, K$, kur fono klasė $u = 0$;

t^u – prognozuoto ribojančio langelio korekcija, $t^u = (t_x^u, t_y^u, t_w^u, t_h^u)$;

v – tikrasis objektą ribojantis langelis $v = (v_x, v_y, v_w, v_h)$;

$\mathcal{L}_{klas\acute{e}s}(p, u) = -\log p_u$ – klasifikavimo klaida;

$\mathbb{1}[u \geq 1]$ – indikatorinė funkcija;

$\mathcal{L}_{langelio}(t^u, v) = \sum_{i \in \{x, y, w, h\}} L_1^{suglodinta}(t_i^u - v_i)$ – ribojančių langelių numatymo klaida.

Ribojančio laukelio klaida $\mathcal{L}_{langelio}$ matuoja skirtumą tarp t_i^u ir v_i , naudodama suglodintą L_1 klaidos funkciją ((17) formulė), kuri laikoma, jog yra mažiau jautri išskirtims [52]:

$$L_1^{suglodinta}(x) = \begin{cases} 0,5x^2, & \text{kai } |x| < 1 \\ |x| - 0,5, & \text{kai } |x| \geq 1 \end{cases}; \quad (17)$$

čia $L_1^{suglodinta}$ – suglodinta L_1 klaidos funkcija.

Fast R-CNN yra daug greitesnis tiek mokyme, tiek testavime, tačiau regionų pasiūlymai generuojami atskirai pagal kitą modelį, ir tai turi neigiamą įtaką algoritmo greičiui [52].

2.2.4. Faster R-CNN

Intuityvus Fast R-CNN modelio pagreitinimo sprendimas yra integruoti regionų pasiūlymo algoritmą į sąsūkų neuroninių tinklų modelį. Faster R-CNN [28] daro būtent tai: sukuria vieną, sujungtą modelį, sudarytą iš regionus siūlančio tinklo ir Fast R-CNN su bendrais sąsūkų savybių sluoksniais [52].

Faster R-CNN modelio veikimo principas [28, 52]:

1. Apmokomas sąsūkų neuroninis tinklas vaizdams klasifikuoti;
2. Regionus siūlantis tinklas suderinamas regionų siūlymų uždaviniui, kurį inicijuoja apmokytas vaizdo klasifikatorius, nuo pradžios iki pabaigos. Teigiamų objektų IoU didesnis už 0,7, o neigiamų – mažesnis už 0,3:
 - 2.1. Nedidelis $n \times n$ erdvinis langas slenkamas per viso vaizdo sąsūkų savybių žemėlapi;
 - 2.2. Kiekvieno slankiojančio lango centre vienu metu prognozuojamos kelios įvairaus masto ir santykio sritys. Inkaras yra slenkančio lango centro, mastelio ir santykio kombinacija.
3. Fast R-CNN objektų aptikimo modelis apmokomas naudojantis dabartinio regionus siūlančio tinklo sugeneruotais pasiūlymais;
4. Tuomet naudojamas Fast R-CNN tinklas, kad būtų pradėtas regionus siūlančio tinklo mokymas. Išsaugant bendrinamus sąsūkų sluoksnius, tiksliai suderinami tik specifiniai regionus siūlančio tinklo sluoksniai. Šiame etape regionus siūlantis tinklas ir aptikimo tinklas turi bendrus sąsūkų sluoksnius;
5. Galiausiai suderinami unikalūs Fast R-CNN sluoksniai;
6. 4 ir 5 žingsniai gali būti kartojami.

Faster R-CNN optimizuojamas kelių užduočių klaidos funkcijai, panašiai kaip Fast R-CNN [28, 52].

Kelių užduočių klaidos funkcija sujungia klasifikavimo ir ribojančio langelio regresijos klaidas ((18) ir (19) formulės) [28, 52]:

$$\mathcal{L} = \mathcal{L}_{klas\acute{e}s} + \mathcal{L}_{langelio}; \quad (18)$$

$$\mathcal{L}(\{p_i\}, \{t_i\}) = \frac{1}{N_{klas\acute{e}s}} \sum_i \mathcal{L}_{klas\acute{e}s}(p_i, p_i^*) + \frac{\lambda}{N_{langelio}} \sum_i p_i^* L_1^{suglodinta}(t_i - t_i^*); \quad (19)$$

čia bendra modelio klaida;

$\mathcal{L}_{klas\acute{e}s}$ yra logaritminė dviejų klasių klaidos funkcija $\mathcal{L}_{klas\acute{e}s}(p_i, p_i^*) = -p_i^* \log p_i - (1 - p_i^*) \log(1 - p_i)$;

$\mathcal{L}_{langelio}$ – ribojančių langelių numatymo klaida;

p_i – prognozuojama tikimybė, kad inkaras i yra objektas;

t_i – prognozuojamos keturios parametrinės koordinatės;

$N_{klas\acute{e}s}$ – normalizavimo narys, [28] nustatytas ~ 256 ;

p_i^* – tikrasis dvejetainis žymėjimas, ar inkaras i yra objektas;

λ – balansavimo parametras, [28] nustatytas ~ 10 , kad $\mathcal{L}_{klas\acute{e}s}$ ir $\mathcal{L}_{langelio}$ nariai būtų apytiksliai vienodo svorio;

$N_{langelio}$ – normalizavimo narys, [28] nustatytas kaip inkarų vietų skaičius (~ 2400);

$L_1^{suglodinta}$ – suglodinta L_1 klaidos funkcija;

t_i^* – tikrosios koordinatės.

2.2.5. Mask R-CNN

Mask R-CNN [21] išplėtė Faster R-CNN į vaizdo segmentavimą pikselių lygiu [52]. Šio metodo esmė – atskirti klasifikavimo ir kaukės nustatymo pikselių lygiu užduotis. Remiantis Faster R-CNN struktūra, buvo pridėta papildoma atšaka, skirta objekto kaukei numatyti lygiagrečiai su esamomis klasifikavimo ir ribojančio langelio numatymo šakomis. Kaukės atšaka yra nedidelis, pilnai sujungtas tinklas, taikomas kiekvienam *RoI* ir numatantis segmentavimo kaukę pikselių lygiu [21, 52].

Kadangi pikselių lygio segmentavimui reikalingas daug smulkesnis lygiavimas nei ribojantys langeliai, Mask R-CNN pagerino *RoI* telkimo sluoksnį (*RoIAlign* sluoksnis) kad *RoI* būtų geriau ir tiksliau susietas su pradinio vaizdo sritimis [21, 52].

RoIAlign sluoksnis yra skirtas patikslinti neatitinkančias vietas. Šie neatitinkimai atsiranda dėl kvantavimo² *RoI* telkime. *RoIAlign* pašalina maišos kvantavimą, pavyzdžiui, naudojant $x/16$ vietoje $[x/16]$, kad išgautos ypatybės būtų tinkamai suderintos su įvesties pikseliais. Bitiesinė interpoliacija pritaikoma slankiojo kabelio vietos reikšmėms įvestyje apskaičiuoti [21, 52].

Kelių užduočių Mask R-CNN klaidos funkcija apima klasifikavimo, lokalizacijos ir segmentavimo kaukės klaidas [21, 52] ((20) formulė):

² Tolydaus signalo aproksimavimo diskrečiųjų simbolių arba sveikųjų skaičių reikšmių rinkiniu procesas [60].

$$\mathcal{L} = \mathcal{L}_{klas\acute{e}s} + \mathcal{L}_{langelio} + \mathcal{L}_{kauk\acute{e}s}; \quad (20)$$

čia \mathcal{L} – bendroji modelio klaida;

$\mathcal{L}_{klas\acute{e}s}$ – klasifikavimo klaida, tokia pati kaip Faster R-CNN modelyje;

$\mathcal{L}_{langelio}$ – lokalizacijos klaida, tokia pati kaip Faster R-CNN modelyje;

$\mathcal{L}_{kauk\acute{e}s}$ – segmentavimo kauk\acute{e}s klaida.

Kauk\acute{e}s \acute{s}aka sukuria $m \times m$ matmen\acute{u} kauk\acute{e} kiekvienai *RoI* ir kiekvienai klasei. I\acute{s} viso yra K klasi\acute{u}, taigi bendras i\acute{s}vesties dydis yra $K \cdot m^2$. $\mathcal{L}_{kauk\acute{e}s}$ apibr\acute{e}žiama kaip vidutinis dvejetainis kry\acute{z}min\acute{e}s entropijos nuostolis tik k -tai kaukei, jei sritis susieta tikr\acute{a}ja klase k [21, 52] ((21) formul\acute{e}):

$$\mathcal{L}_{kauk\acute{e}s} = -\frac{1}{m^2} \sum_{1 \leq i, j \leq m} [y_{ij} \log \hat{y}_{ij}^k + (1 - y_{ij}) \log(1 - \hat{y}_{ij}^k)]; \quad (21)$$

čia $\mathcal{L}_{kauk\acute{e}s}$ – segmentavimo kauk\acute{e}s klaida;

m – kauk\acute{e}s matmuo;

y_{ij} – (i, j) elemento etiket\acute{e} tikrojoje kauk\acute{e}je $m \times m$ dyd\acute{z}io srityje;

\hat{y}_{ij}^k – prognozuota (i, j) elemento reik\acute{s}m\acute{e} k -osios klas\acute{e}s i\acute{s}moktoje kauk\acute{e}je;

k – klas\acute{e}.

2.3. Segmentavimo vertinimas

Vertinimo metodai naudojami algoritm\acute{u} privalumams bei tr\acute{u}kumams tikrinti. Naudojant t\acute{a} pat\acute{i} vertinimo metod\acute{a} galima palyginti skirting\acute{u} algoritm\acute{u} veikim\acute{a} su tuo pa\acute{c}iu duomen\acute{u} rinkiniu. Egzempliori\acute{u} segmentavimo algoritm\acute{u} veikimas gali b\acute{u}ti vertinamas daugeliu aspekt\acute{u}, tarp kuri\acute{u} svarbiausi vertinimo rodikliai yra segmentavimo tikslumas ir veikimo greitis [7].

Keletas svarbi\acute{u} s\acute{a}vok\acute{u} modeliui \acute{i}vertinti pateikiamos toliau:

- TP (angl. *True Positive*) – teisingai aptikti objektai;
- TN (angl. *True Negative*) – teisingai neaptikti objektai ten, kur j\acute{u} n\acute{e}ra;
- FP (angl. *False Positive*) – klaidingai priskiriami objektai ten, kur j\acute{u} n\acute{e}ra;
- FN (angl. *False Negative*) – neaptikti objektai.

2.3.1. Precizi\acute{s}kumas ir atk\acute{u}rimas

Precizi\acute{s}kumas (angl. *precision*) matuoja prognozi\acute{u} tikslum\acute{a} – kiek i\acute{s} vis\acute{u} prognozuot\acute{u} objekt\acute{u} i\acute{s} ties\acute{u} yra objektai [54]. Precizi\acute{s}kumas apskai\acute{c}iuojamas pagal (22) formul\acute{e}:

$$p = \frac{TP}{TP+FP}; \quad (22)$$

čia p – precizi\acute{s}kumas;

TP – teisingai atpa\acute{z}inti objektai;

FP – klaidingai priskiriami objektai ten, kur j\acute{u} n\acute{e}ra.

Atkūrimas (angl. *recall*) vertina, kaip gerai yra atpažįstami objektai [54]. Atkūrimas apskaičiuojamas pagal (23) formulę:

$$r = \frac{TP}{TP+FN}; \quad (23)$$

čia r – atkūrimas;

TP – teisingai atpažinti objektai;

FN – neaptikti objektai.

2.3.2. Jaccard'o indeksas

IoU (angl. *Intersection over Union*) metrika išreiškia sankirtos tarp algoritmo segmentavimo rezultato ir tikrosios vaizdo kaukės (angl. *Ground Truth*) santykį su algoritmo segmentavimo rezultato ir tikrosios vaizdo kaukės sąjunga [7]. Tai viena dažniausiai naudojamų metrikų semantinio ir egzempliorių segmentavimo srityse, dar žinoma kaip Jaccard'o indeksas arba Jaccard'o panašumo koeficientas. *IoU* išreiškta (24) formulėje [55]:

$$IoU = J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}; \quad (24)$$

čia $J(A, B)$ – A ir B sričių Jaccard'o indeksas;

A, B – lyginamos sritys;

$|A \cap B|$ – A ir B sričių sankirtos dydis;

$|A \cup B|$ – A ir B sričių sąjungos dydis.

Dviejų sričių *IoU* gali turėti bet kokias reikšmes nuo 0 iki 1. Jei dvi sritys tarpusavyje nesisieja, jų sankirta yra lygi 0, taip pat ir *IoU*. Jei dvi sritys visiškai tarpusavyje persidengia, tuomet jų sąjungos sritis yra lygi sankirtos sričiai ir *IoU* reikšmė lygi 1 [55].

Yra įprasta laikyti segmentavimą sėkmingu (priskirti objekto prognozę kaip TP), kai *IoU* reikšmė didesnė už 0,5. 2014 m. paplitus COCO³ (angl. *Common Objects in Context*) duomenų rinkinio naudojimui, tyrėjai pradėjo labiau kreipti dėmesį į tikslumą. Su COCO duomenų rinkiniu nenaudojama fiksuota reikšmė *IoU* apskaičiuoti, vietoje to, yra keičiamos *IoU* slenksčio reikšmės tarp 0,5 (grubus padėties nustatymas) ir 0,95 (tobulas padėties nustatymas) [7].

2.3.3. Vidutinis preciziškumas

Vidutinis preciziškumas yra apibrėžiamas kaip sritis po preciziškumo-atkūrimo kreive (angl. *Precision-Recall Curve*) ((25) formulė) [54]:

³ Microsoft COCO duomenų rinkinys sudarytas iš daugybės skirtingų kasdienių situacijų. Šiame rinkinyje yra daugiau nei 330 tūkst. paveikslėlių su 80 kategorijų ir 1,5 mln. objektų. COCO duomenų rinkinys gali būti naudojamas daugumai kompiuterinės regos užduočių, tokių kaip objektų atpažinimas, semantinis segmentavimas, egzempliorių segmentavimas ir panoptinis segmentavimas [61].

$$AP = \int_0^1 p(r)dr; \quad (25)$$

čia AP – vidutinis preciziškumas;

p – preciziškumas;

r – atkūrimas.

Norint apskaičiuoti vidutinį preciziškumą reikia išrikiuoti visas objektų aptikimo prognozes pagal prognozės pasiklovimo lygį ir vertinti, ar prognozė teisinga, ar ne (pagal IoU reikšmę ir nusistatytą jos slenkstį – ribinę reikšmę). Tuomet kiekvienai prognozei apskaičiuojamos preciziškumo bei atkūrimo reikšmės. Atkūrimo reikšmės didėja, kai prognozės rangas mažėja, tačiau preciziškumo reikšmės kinta pagal zigzago struktūrą – mažėja, kai objektai prognozuojami ten, kur jų nėra, ir vėl pakyla, kai objektai teisingai aptinkami [54].

Preciziškumo ir atkūrimo reikšmės visada yra tarp 0 ir 1. Taigi vidutinio preciziškumo reikšmės taip pat patenka tarp 0 ir 1. Prieš skaičiuojant objektų atpažinimo vidutinį preciziškumą, zigzago struktūra dažniausiai yra išlyginama – kiekviename atkūrimo reikšmių lygyje preciziškumo reikšmė pakeičiama maksimalia preciziškumo reikšme, esančia atitinkamos atkūrimo reikšmės dešinėje. Po tokios transformacijos kreivė mažėja monotoniškai, o ne pagal zigzago struktūrą. Apskaičiuota vidutinio preciziškumo reikšmė yra mažiau jautri mažiems rango svyravimams. Anksčiau aprašyta transformacija matematiškai pateikiama (26) formulėje [54]:

$$p_{interpoliuotas}(r) = \max_{\hat{r} \geq r} p(\hat{r}); \quad (26)$$

čia $p_{interpoliuotas}$ – transformuotas (interpoliuotas) preciziškumas;

r – atkūrimo reikšmė, kuriai skaičiuojamas preciziškumas;

\hat{r} – atkūrimo reikšmė, ne mažesnė už atkūrimo reikšmę r .

2.3.4. F_1 koeficientas

F_1 koeficientas apibrėžiamas kaip harmoninis preciziškumo ir atkūrimo vidurkis. Šis koeficientas apskaičiuojamas pagal (27) formulę [35]:

$$F_1 = \frac{r \cdot p}{r + p}; \quad (27)$$

čia F_1 – F_1 koeficientas;

r – atkūrimas;

p – preciziškumas.

Didesnė F_1 koeficiento reikšmė reiškia didesnę tikrųjų ir prognozuojamų kaukių sankirtą [35].

2.4. Dalelių vertinimas vaizde

2.4.1. Dalelių charakteristikos

Dalelėms vaizde apibūdinti galima naudoti toliau aprašomas statistikas.

Kiekis – dalelių skaičius vaizde.

Vidutinis dydis – vidutinis dalelės dydis pikseliais.

Dalelių ploto dalis – kokią procentinę viso vaizdo dalį užima dalelės.

Perimetras – vidutinis dalelių perimetras pikseliais.

Apskritumas (angl. *circularity*) yra iš ploto ir perimetro apskaičiuotų spindulių santykis ir jis apskaičiuojamas pagal (28) formulę [56]:

$$cr = \frac{4\pi S}{P^2}; \quad (28)$$

čia cr – apskritumas;

S – plotas;

P – perimetras.

Kai apskritumas lygus 1, tuomet dalelė yra tobulo apskritimo formos.

Pilnumas (angl. *solidity*) – ploto ir išgaubtos ploto srities santykis (7 pav.) [56].



7 pav. Dalelės pilnumo pavyzdys pagal [56]

Apimtis (angl. *extent*) apskaičiuojama kaip dalelės ploto ir dalelę ribojančio stačiakampio santykis (8 pav.) [56].



8 pav. Dalelės apimties pavyzdys pagal [56]

Kraštinių santykis (angl. *Aspect Ratio, AR*) – pritaikytos elipsės kraštinių santykis. Apskaičiuojamas kaip elipsės ilgosios ir trumposios ašies (9 pav.) santykis [56].



9 pav. Elipsės ilgoji ir trumpoji ašys pagal [56]

Apvalumas (angl. *roundness*) – priešingas dydis kraštinių santykiui. Galima apskaičiuoti ir pagal (29) formulę [56]:

$$rn = \frac{4S}{\pi \cdot R_{max}^2}; \quad (29)$$

čia rn – apvalumas;

S – plotas;

R_{max} – didžiausias dalelės skersmuo.

Kompaktiškumas (angl. *compactness*) apskaičiuojamas pagal (30) formulę:

$$cm = \frac{\sqrt{\frac{4S}{\pi}}}{R_{max}} = \sqrt{rn}; \quad (30)$$

čia cm – kompaktiškumas;

S – plotas;

R_{max} – didžiausias dalelės skersmuo;

rn – apvalumas.

2.4.2. Dalelių pasiskirstymo palyginimas

Galima statistiškai nustatyti, ar dalelės pagal jų galutinį erozijos tašką (angl. *Ultimate Eroded Point*, UEP) dvimačiame vaizde yra atsitiktinai pasiskirsčiusios, atsiskyrusios (angl. *self-avoiding particles*) ar sudarančios klasterius [56].

Generuojami dalelių galutiniai erozijos taškai ir kiekvienai dalelei nustatomas artimiausio kaimyno atstumas. Pagal dalelių skaičių ir analizuojamą plotą teorinis artimiausio kaimyno atstumas apskaičiuojamas pagal (31) formulę [56]:

$$AKA = 0,5 \sqrt{\frac{S}{n}}; \quad (31)$$

čia AKA – teorinis artimiausio kaimyno atstumas;

S – analizuojamas plotas;

n – dalelių skaičius.

Ši skaičiavimas nepaiso dalelių dydžio skirtumų. Laikoma, kad normaliai pasiskirsčiusių dalelių atveju vidutinis atstumas yra lygus atstumų medianai. Taigi metodas yra įgyvendintas siekiant palyginti ir vidurkį, ir medianą su įvertintomis reikšmėmis. Mediana labiau tinkama, kai yra norima sumažinti išskirčių įtaką. Įvertinti artimiausio kaimyno atstumo vidurkis ar mediana statistiškai palyginami su teorine reikšme. Pirmiausia patikrinama hipotezė apie dispersijų homogeniškumą [56, 57]:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_a: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Hipotezei patikrinti F testo statistika apskaičiuojama pagal (32) formulę [57]:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad (32)$$

čia s_1^2 ir s_2^2 – imčių dispersijos.

Kuo labiau šis santykis nukrypęs nuo 1, tuo stipresnis įrodymas, kad populiacijų dispersijos nelygios. Hipotezė apie dviejų dispersijų lygybę atmetama, jei viena iš (33) – (34) nelygybių galioja [57]:

$$F > F_{1-\frac{\alpha}{2}, N_1-1, N_2-1}; \quad (33)$$

$$F < F_{\frac{\alpha}{2}, N_1-1, N_2-1}; \quad (34)$$

čia $F_{\frac{\alpha}{2}, N_1-1, N_2-1}$ – F pasiskirstymo kritinė reikšmė su $N_1 - 1$ ir $N_2 - 1$ laisvės laipsniais bei pasikliautinoju lygmeniu α .

Hipotezė apie vidurkių (medianų) lygybę tikrinama t testu:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

Jei hipotezė apie dispersijų homogeniškumą priimtina, skaičiuojama Student'o t statistika, jei hipotezė atmetama – Welch'o t statistika. Student'o t statistika apskaičiuojama pagal (35) formulę:

$$t_{St} = \frac{m_1 - m_2}{\frac{(N_1-1)s_1^2 + (N_2-1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}; \quad (35)$$

čia m_1, m_2 – kiekvienos imties vidutinės reikšmės;

s_1^2 ir s_2^2 – imčių dispersijos;

N_1 ir N_2 – imčių dydžiai.

Student'o t statistikos laisvės laipsniai lygūs $N_1 + N_2 - 2$.

Welch'o t statistika apskaičiuojama pagal (36) formulę:

$$t_W = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}; \quad (36)$$

čia m_1, m_2 – kiekvienos imties vidutinės reikšmės;

s_1^2 ir s_2^2 – imčių dispersijos;

N_1 ir N_2 – imčių dydžiai.

Kai norima patikrinti hipotezę apie dviejų imčių, kurių pasiskirstymas nėra normalusis, vidurkių lygybę, naudojamas Wilcoxon-Mann-Whitney U testas. U statistikos apskaičiuojamos pagal (37) – (38) formules:

$$U_1 = N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1+1)}{2} - R_1; \quad (37)$$

$$U_2 = N_1 N_2 + \frac{N_2(N_2+1)}{2} - R_2; \quad (38)$$

čia N_1 ir N_2 – imčių dydžiai;

R_i – i -osios imties rangų suma.

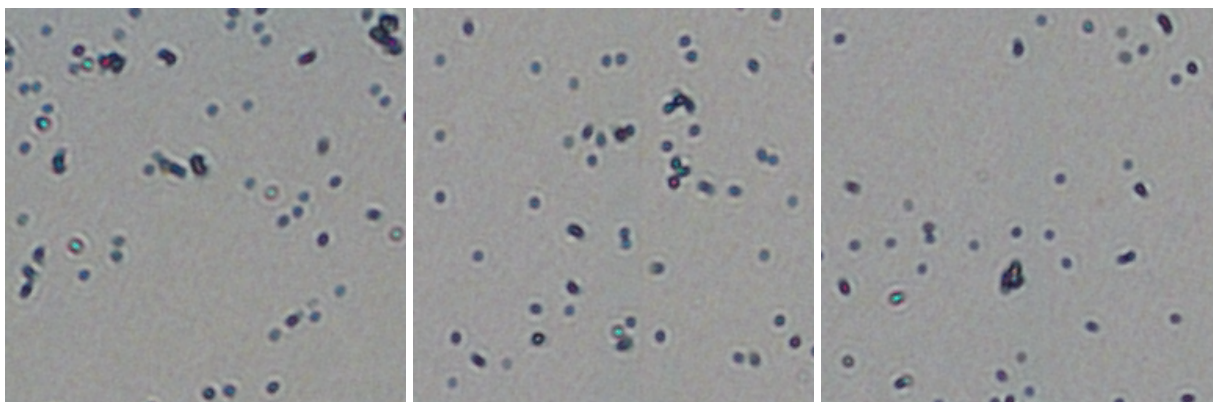
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Šiame skyriuje aprašomas duomenų paruošimas modeliams mokyti, palyginami apmokyti modeliai bakterijoms segmentuoti bei atliekamas bakterijų pasiskirstymo vertinimas.

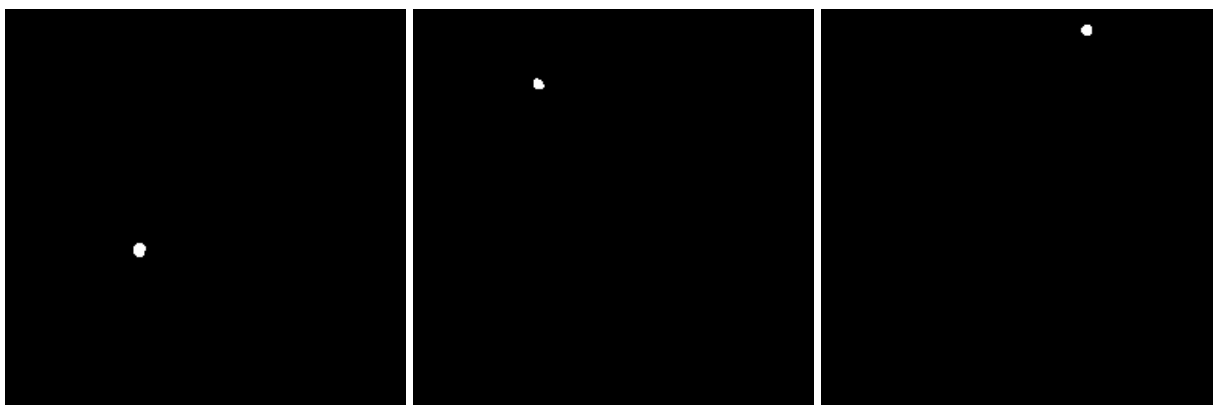
3.1. Duomenų paruošimas

Tyrime naudojama 2560 x 1920 dydžio vaizdai, 5 paveiksle pateiktas vienas iš pradinių vaizdų. Duomenys apdorojami tokiu būdu:

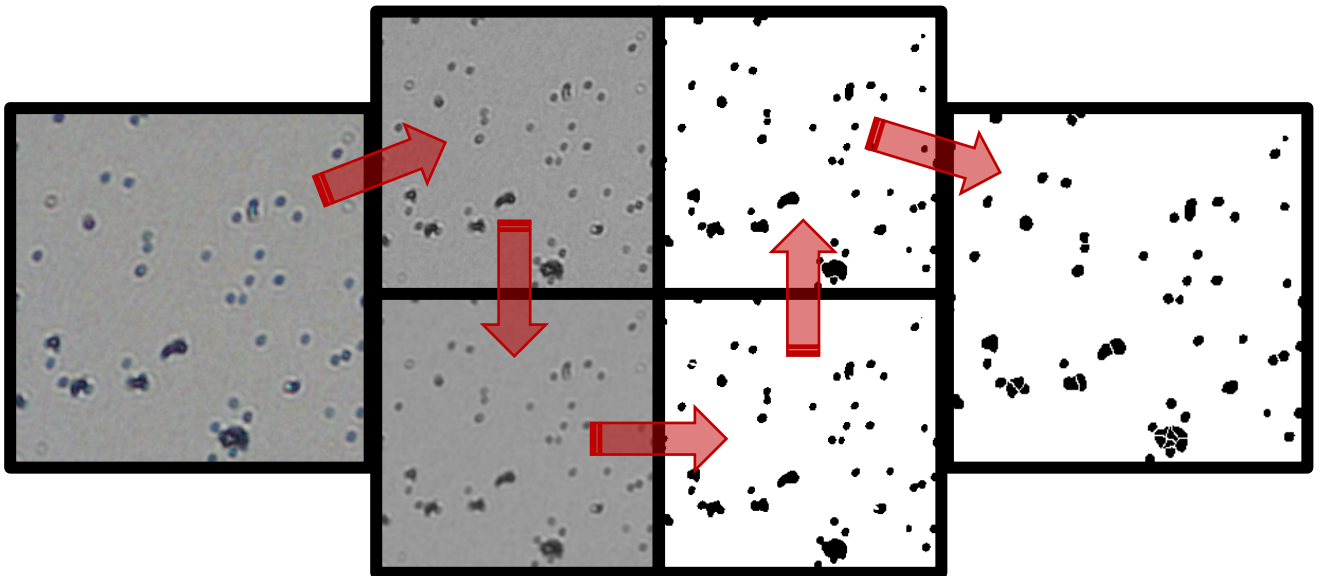
1. Kiekvienas vaizdas padalijamas į mažesnius, 256 x 256 dydžio vaizdus (10 pav.) – tai atliekama su Python;
2. Naudojantis GIMP programa sukuriama kaukė kiekvienam vaizdui (12 pav.):
 - 2.1. Vaizdo kopija paverčiama nespaltvota;
 - 2.2. Pritaikomas Gauso filtras vaizdo triukšmui sumažinti;
 - 2.3. Vaizdas paverčiamas dvejetainiu pritaikant slenksčio funkciją;
 - 2.4. Dalelių žymėjimas pritaikomas rankiniu būdu, kad kaukė kuo labiau atitiktų tikrąjį vaizdą.
3. Iš vieno kaukės vaizdo su daug dalelių sukuriamas tokio tipo kaukės vaizdas kiekvienai dalelei – fonas juodos spalvos, o pati dalelė – balta (11 pav.). Tai atliekama su Python.



10 pav. Pradinių vaizdų sukarpymas į mažesnius vaizdus



11 pav. Išskirtų kaukių kiekvienai dalelei pavyzdžiai



12 pav. Kiekvieno vaizdo kaukės sukūrimas (rodyklių kryptimi): vaizdo kopija paverčiama nespalvota; pritaikomas Gauso filtras; pritaikoma slenksčio funkcija dvejetainiam vaizdui gauti; rankomis užpildomos tuštumos viduryje bakterijų, pataisomas dalelių žymėjimas, kad kaukė kuo labiau atitiktų pradinį vaizdą; atskiriamos bakterijos jų sancaupose, kad būtų galima vaizdą segmentuoti egzempliorius

3.2. Bakterijų segmentavimas

Bakterijoms segmentuoti buvo pritaikytos įvairios Mask R-CNN modelio pagal Matterport realizaciją [58] variacijos. Modelių mokymas vykdytas naudojantis Google Colab resursais. Mokymo imtyje 139 rankomis segmentuoti vaizdai, iš jų 16 naudojama tikrinimui (angl. *validation*). Testavimo imtyje taip pat 16 vaizdų. Modeliuose naudojami šie vaizdų papildymo būdai:

- vertikalus vaizdų apvertimas;
- horizontalus vaizdų apvertimas;
- pavertimas 90, 180 ar 270 laipsnių kampu;
- visų pikselių padauginimas iš atsitiktinai parinkto skaičiaus iš intervalo [0,8; 1,5];
- Gauso filtro pritaikymas σ reikšmę atsitiktinai pasirenkant iš intervalo [0; 5].

Nagrinėjamų modelių architektūra:

- pagrindinio tinklo architektūra: *ResNet50*;
- nemaksimalaus slopinimo slenkstis: 0,3;
- mokymosi pagreitis: 0,9;
- mokymosi greitis: 0,001;
- sumažintos kaukės dydis: 56 x 56 pikseliai;
- klasifikavimo klasių skaičius: 2 (fonas ir dominantys objektai);
- regionus siūlančiam tinklui mokyti naudojamų inkarų skaičius kiekviename vaizde: 256.

Keičiami architektūros elementai:

- mokymosi perkėlimo naudojimas;
- epochų skaičius;
- maksimalus atpažįstamų egzempliorių skaičius;
- pradiniai klaidų svoriai:
 - *rpn_class_loss* parodo, kaip gerai regionus siūlantis tinklas atskiria objektus nuo fono;
 - *rpn_bbox_loss* parodo, kaip gerai regionus siūlantis tinklas lokalizuoja objektus;

- *mrcnn_class_loss* parodo, kaip gerai Mask R-CNN atpažįsta objekto klase;
- *mrcnn_bbox_loss* parodo, kaip gerai Mask R-CNN aptinka objektus;
- *mrcnn_mask_loss* parodo, kaip gerai Mask R-CNN segmentuoja objektus;
- dominančių sričių *RoI* skaičius po nemaksimalaus slopinimo prognozavimo metu;
- dominančių sričių *RoI* skaičius po nemaksimalaus slopinimo mokymo metu;
- nemaksimalaus slopinimo slenkstis regionus siūlančio tinklo pasiūlymams filtruoti;
- mokymuisi naudojamų vaizdo dominančių sričių *RoI* skaičius;
- egzempliorių kaukių mažinimas.

1 lentelėje pateikiami dešimties šiame poskyryje nagrinėjamų modelių konfigūracijų aprašymai.

1 lentelė. Modelių konfigūracijų skirtumai

Modelio nr.	Mokymosi perkėlimas	EPOCH skaičius	Maksimalus atpažįtamų egzempliorių skaičius	Pradiniai klaidų svoriai	Maksimalus naudojamų tikrųjų egzempliorių skaičius	<i>ROI</i> skaičius po nemaksimalaus slopinimo prognozavimo metu	<i>ROI</i> skaičius po nemaksimalaus slopinimo mokymo metu	Nemaksimalaus slopinimo slenkstis RPN pasiūlymams filtruoti	Mokymui naudojamų vaizdo <i>ROI</i> skaičius	Egzempliorių kaukių mažinimas
1	Ne	140	400	Visi lygūs 1	100	2000	1000	0,7	128	Taip
2										
3										
4										
5	Taip, COCO pradiniai svoriai	300	1000	<i>mrcnn mask loss</i> = 2, kiti lygūs 1	300	3000	2000	0,9	512	Ne
6										
7										
8										
9	Taip, COCO pradiniai svoriai	329	1000	<i>mrcnn mask loss</i> = 2, kiti lygūs 1	300	3000	2000	0,9	512	Ne
10										

Modeliams apmokyti buvo panaudoti 139 vaizdai, paruošti 3.1 poskyryje aprašytu būdu.

Iš kiekvienos konfigūracijos 1 lentelėje pasirinktas vienas tam tikroje epochoje apmokytas modelis. Epocha parenkama pagal didžiausią vidutinio preciziškumo su skirtingomis *IoU* reikšmėmis vidurkį, apskaičiuotą bendrai visiems vaizdams (2 lentelė).

Segmentavimo tikslumas vertinamas pagal vidutinio preciziškumo reikšmę, kai IoU lygus 0,5, taip pat vidutinio preciziškumo su skirtingomis IoU reikšmėmis vidurkį (mAP) bei F_1 koeficientą. Šios metrikos skaičiuojamos tiek pikselių, tiek dalelių tikslumu.

2 lentelė. Kiekvieno modelio geriausios epochos parinkimas

Modelio nr.	Didžiausias vidutinio preciziškumo su skirtingomis IoU reikšmėmis vidurkis	Epocha
1	0,3172	134
2	0,1388	137
3	0,2959	136
4	0,469	278
5	0,5313	296
6	0,5336	280
7	0,5374	293
8	0,5545	343
9	0,5586	249
10	0,5512	316

3 lentelėje pikselių klasifikavimo ir dalelių atpažinimo statistikos gautos su IoU reikšme lygia 0,5. Šios reikšmės yra apibendrintos kiekvienam modeliui – visų vaizdų statistikos susumuotos.

3 lentelė. Apibendrintos pikselių klasifikavimo ir dalelių atpažinimo statistikos

Modelio nr.	TP pikseliai	TP dalelės	TN pikseliai	FP pikseliai	FP dalelės	FN pikseliai	FN dalelės
1	46015	1199	962662	3857	68	36042	644
2	40566	1047	963044	3475	28	41491	796
3	44164	1135	963576	2943	46	37893	708
4	59742	1411	959524	6991	47	22315	432
5	63833	1465	959374	7145	50	18224	378
6	65374	1543	960485	6034	98	16683	300
7	64356	1499	960189	6330	72	17701	344
8	67507	1545	959574	6945	89	14550	298
9	68267	1550	958731	7778	93	13790	293
10	69532	1582	958041	8478	99	12525	261

Naudojant 3 lentelės statistikas apskaičiuotos tikslumo, preciziškumo, atkūrimo bei F_1 koeficiento reikšmės pateikiamos 4 lentelėje. Taip pat lentelėje yra apskaičiuotos kiekvieno modelio vidutinės AP , kai $IoU = 0,5$, ir mAP reikšmės.

Apibendrinant 4 lentelėje pateiktas metrikas galima matyti, jog geriausi rezultatai pasiekiami su 10 modeliu – aukščiausios vidutinio AP , kai $IoU = 0,5$, F_1 koeficiento reikšmės, taip pat vidutinė AP reikšmė nedaug skiriasi nuo 9 modelio, kur ši reikšmė aukščiausia. 10 modelio charakteristikos kiekvienam vaizdai pateikiamos 5 lentelėje.

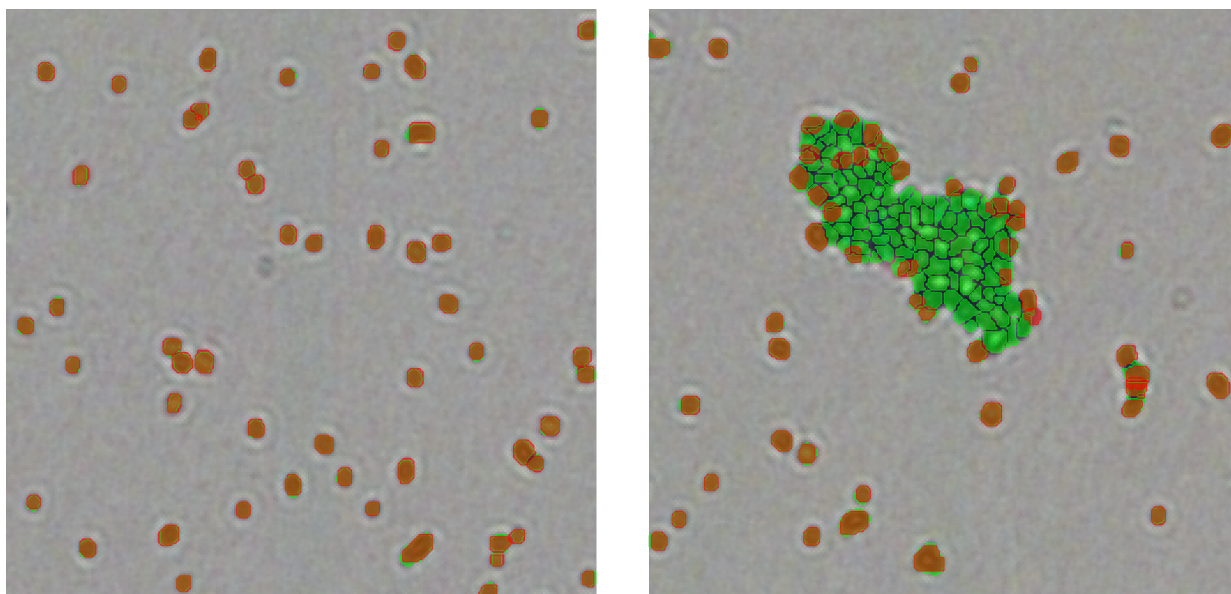
Pagal 5 lentelėje pateiktus rezultatus, geriausiai dalelės atpažįstamos 10 vaizde, o prasčiausiai – 9. Šie vaizdai su jų tikromis ir modelio prognozuotomis bakterijų kaukėmis pateikiami 13 paveiksle. Matoma, jog 9 vaizde didelė bakterijų dalis sudaro koloniją ir modeliui sudėtinga atpažinti kolonijos viduje esančias bakterijas.

4 lentelė. Apibendrintos kiekvieno modelio vertinimo metrikos

Modelio nr.	Tikslumas	Vidutinis <i>mAP</i>	Vidutinis <i>AP</i> , kai <i>IoU</i> = 0,5	Preciziškumas pagal pikselius	Preciziškumas pagal daleles	Atkūrimas pagal pikselius	Atkūrimas pagal daleles	F ₁ koeficientas pagal pikselius	F ₁ koeficientas pagal daleles
1	0,962	0,317	0,667	0,923	0,946	0,561	0,651	0,698	0,771
2	0,957	0,319	0,600	0,921	0,974	0,494	0,568	0,643	0,718
3	0,961	0,296	0,642	0,938	0,961	0,538	0,616	0,684	0,751
4	0,972	0,469	0,780	0,895	0,968	0,728	0,766	0,803	0,855
5	0,976	0,531	0,823	0,899	0,967	0,778	0,795	0,834	0,873
6	0,978	0,533	0,853	0,915	0,940	0,797	0,837	0,852	0,886
7	0,977	0,537	0,833	0,910	0,954	0,784	0,813	0,843	0,878
8	0,980	0,555	0,860	0,907	0,823	0,823	0,838	0,863	0,889
9	0,979	0,559	0,863	0,898	0,832	0,832	0,841	0,864	0,889
10	0,980	0,551	0,873	0,891	0,847	0,847	0,858	0,869	0,898

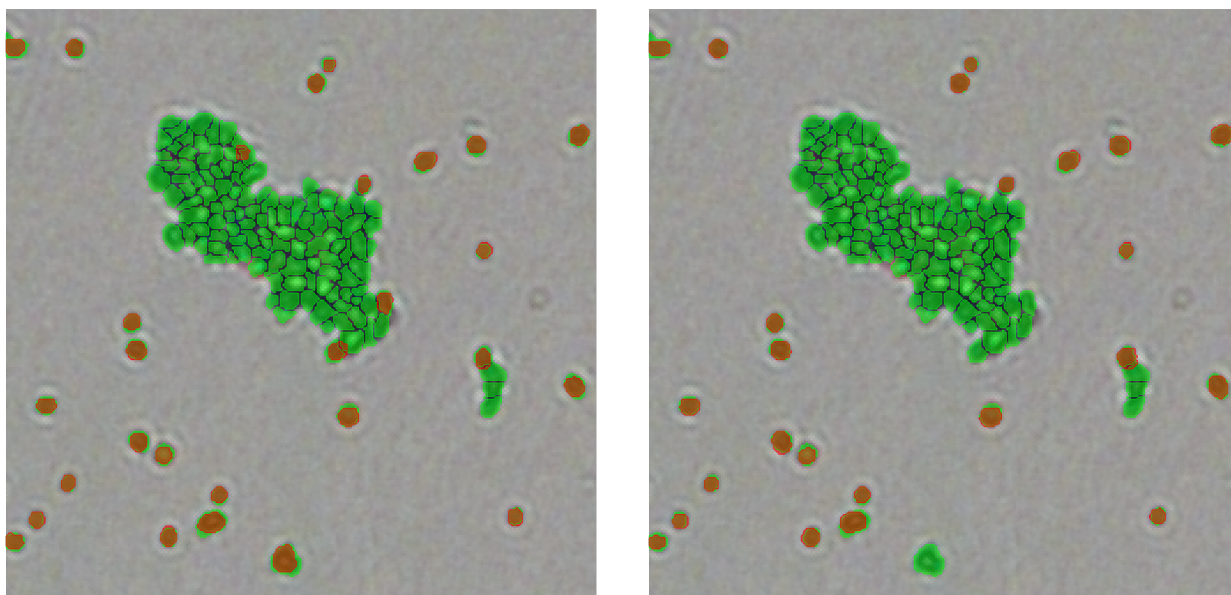
5 lentelė. Geriausio modelio segmentavimo tikslumo metrikos kiekvienam vaizdai

Vaizdo nr.	Tikslumas	<i>mAP</i>	<i>AP</i> , kai <i>IoU</i> = 0,5	Preciziškumas pagal pikselius	Preciziškumas pagal daleles	Atkūrimas pagal pikselius	Atkūrimas pagal daleles	F ₁ koeficientas pagal pikselius	F ₁ koeficientas pagal daleles
1	0,989	0,525	0,842	0,887	0,881	0,876	0,852	0,881	0,867
2	0,989	0,563	0,892	0,890	0,900	0,885	0,900	0,888	0,900
3	0,990	0,599	0,925	0,892	0,963	0,885	0,929	0,889	0,945
4	0,994	0,664	0,918	0,912	0,978	0,914	0,978	0,918	0,947
5	0,993	0,644	0,982	0,899	0,931	0,926	0,982	0,913	0,956
6	0,991	0,63	0,938	0,913	1,000	0,889	0,938	0,901	0,968
7	0,990	0,572	0,918	0,900	0,882	0,897	0,994	0,898	0,902
8	0,993	0,608	0,919	0,875	0,959	0,954	0,922	0,913	0,940
9	0,947	0,169	0,260	0,845	0,672	0,474	0,273	0,608	0,388
10	0,993	0,637	1,000	0,851	0,981	0,972	1,000	0,907	0,991
11	0,959	0,487	0,868	0,943	0,968	0,782	0,870	0,855	0,916
12	0,973	0,583	0,914	0,932	0,966	0,855	0,915	0,892	0,940
13	0,968	0,567	0,923	0,890	0,973	0,875	0,924	0,882	0,948
14	0,970	0,520	0,911	0,856	0,940	0,899	0,919	0,877	0,929
15	0,972	0,516	0,863	0,874	0,912	0,882	0,871	0,878	0,891
16	0,969	0,536	0,887	0,872	0,971	0,883	0,895	0,878	0,932



13 pav. Geriausio modelio panaudojimas bakterijoms segmentuoti: kairėje – geriausias segmentavimas (10 vaizdas), dešinėje – prasčiausias (9 vaizdas). Žalia spalva žymimos tikrosios, rankomis pažymėtos bakterijų kaukės, raudona spalva – modelio aptiktų bakterijų kaukės

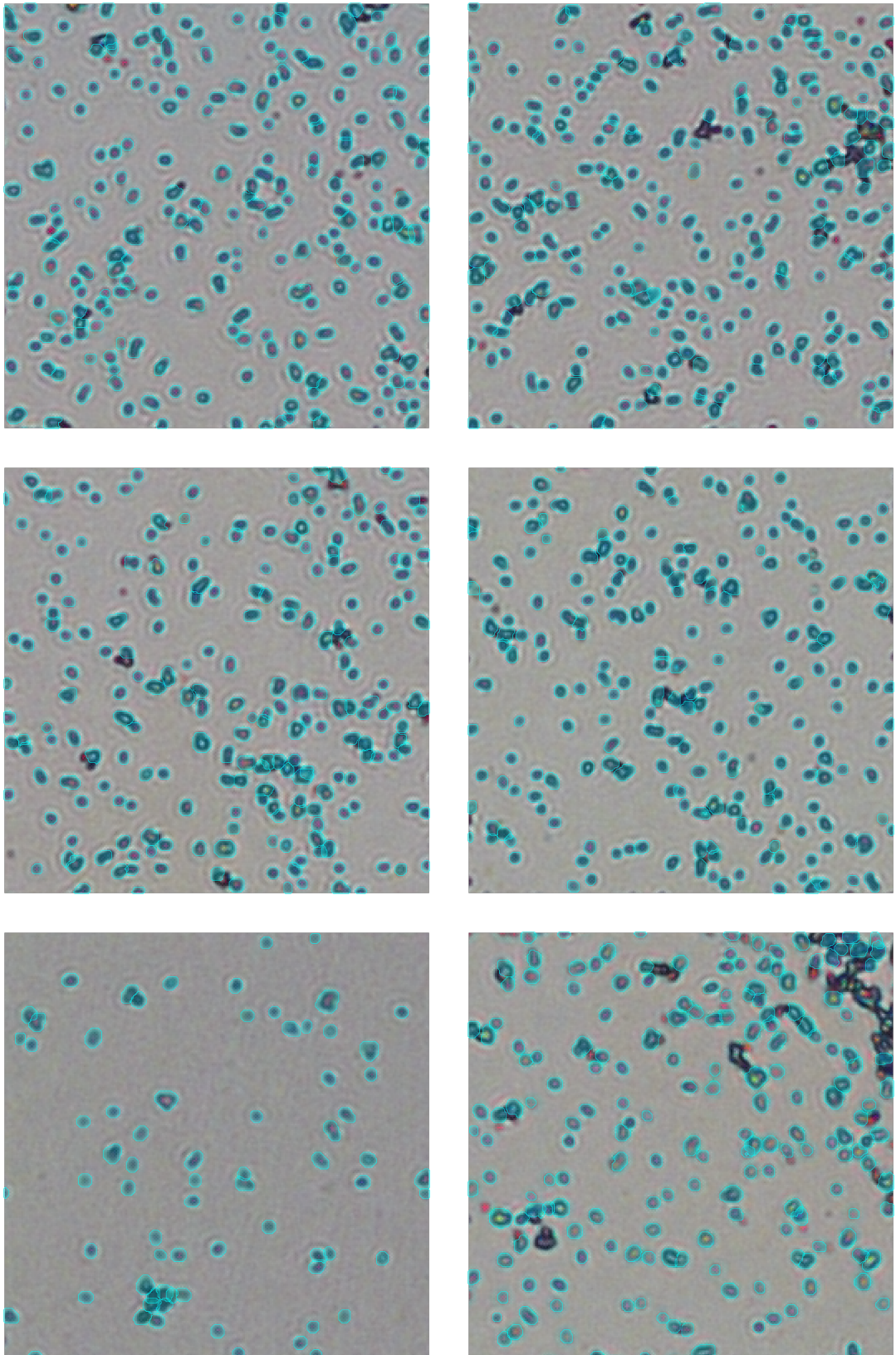
Galima palyginti 9 vaizdo geriausio modelio bakterijų aptikimo kokybę su 1 ir 2 modelių išskirtomis bakterijomis (14 pav.). Matoma, jog geriausias modelis (14 pav. dešinėje) tiksliau segmentuoja pavienes bakterijas, taip pat aptinka besiliečiančias bakterijas ir daugiau bakterijų didžiojo klasterio kraštuose.



14 pav. 9 vaizdo segmentavimas: kairėje – naudojant 1 modelį, dešinėje – naudojant 2 modelį

Pritaikant modelį naujiems, rankomis nesegmentuotiems vaizdams galima patvirtinti, jog modelis labai gerai atpažįsta didžiąją dalį bakterijų (15 pav.). Didžiausi sunkumai iškyla, kuomet bakterijos

sudaro didesnius klasterius, yra labiau susijungusios, tokiu atveju modelis dažniausiai aptinka tik sankaupų kraštuose esančias bakterijas, kaip ir jau pastebėta 13 paveiksle.



15 pav. Geriausio modelio pritaikymas bakterijoms segmentuoti

3.3. Bakterijų pasiskirstymo vertinimas

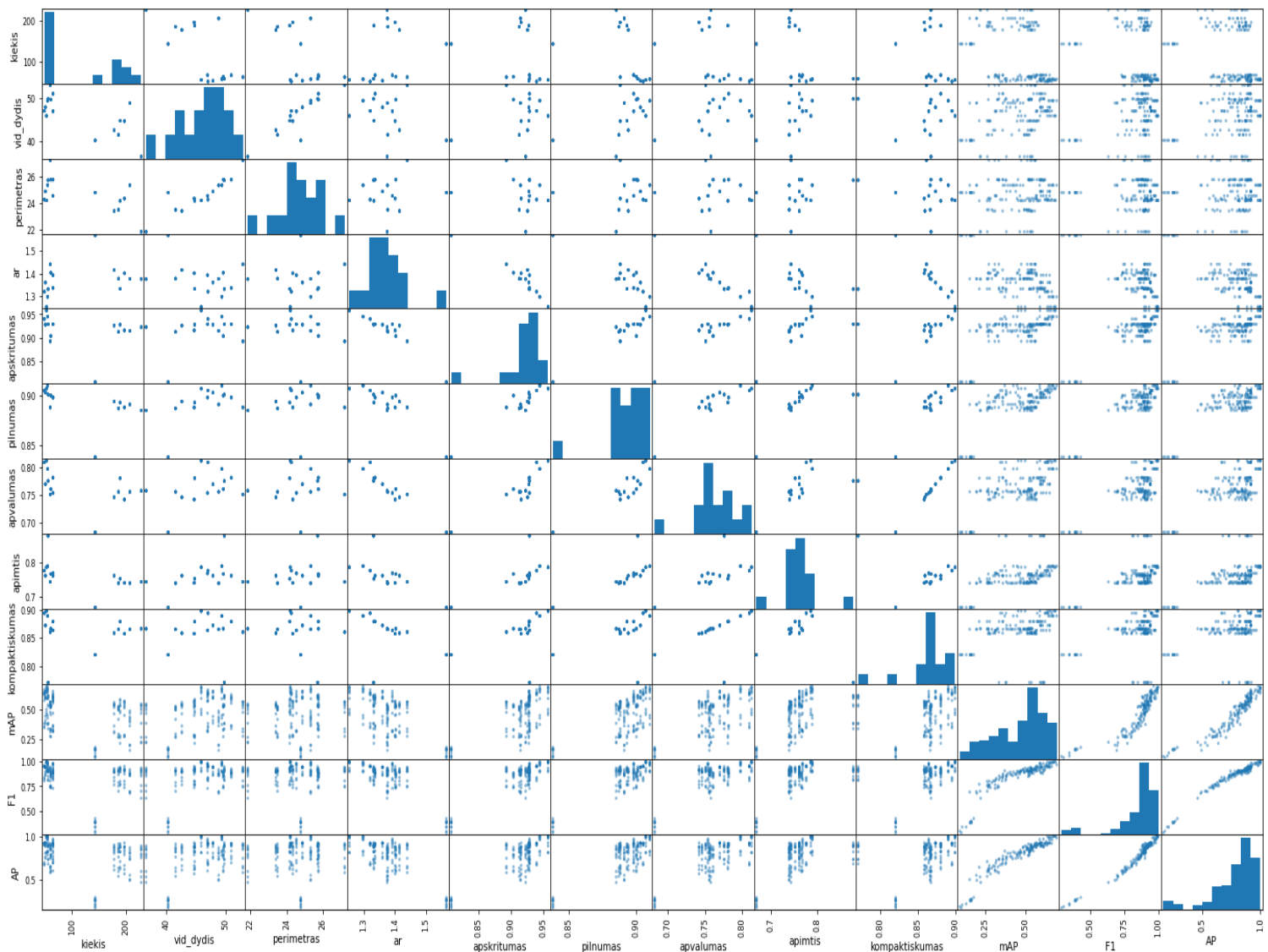
Įvertintos kiekvieno vaizdo bakterijų charakteristikos pateikiamos 6 lentelėje.

6 lentelė. Kiekvieno vaizdo dalelių charakteristikos

Vaizdo nr.	Dalelių kiekis	Dalelių plotas	Vid. dydis	Dalelių ploto dalis, %	Vid. perimetras	Vid. apskritumas	Vid. pilnumas	Vid. kraštinių santykis	Vid. apvalumas	Vid. apimtis	Vid. kompaktiškumas
1	61	2995	49,10	4,57	25,751	0,904	0,9	1,403	0,761	0,766	0,867
2	60	3092	51,53	4,72	27,196	0,893	0,888	1,440	0,751	0,743	0,861
3	56	2806	50,11	4,28	25,71	0,929	0,901	1,331	0,776	0,878	0,770
4	49	2313	47,20	3,53	24,26	0,94	0,905	1,320	0,810	0,776	0,895
5	55	2671	48,56	4,08	25,332	0,945	0,91	1,297	0,798	0,789	0,890
6	65	3070	47,23	4,68	24,539	0,929	0,898	1,392	0,754	0,768	0,864
7	65	3323	51,12	5,07	25,75	0,929	0,898	1,336	0,782	0,761	0,880
8	51	2448	48,00	3,74	24,872	0,928	0,903	1,360	0,770	0,761	0,873
9	143	5707	39,91	8,71	24,779	0,807	0,838	1,567	0,682	0,668	0,820
10	53	2441	46,06	3,72	24,204	0,958	0,907	1,253	0,813	0,786	0,899
11	207	10116	48,87	15,44	25,326	0,915	0,891	1,376	0,756	0,739	0,866
12	189	8539	45,18	13,03	24,171	0,928	0,893	1,332	0,781	0,752	0,880
13	197	8848	44,91	13,50	24,341	0,916	0,888	1,401	0,742	0,740	0,858
14	186	7729	41,55	11,79	23,5	0,913	0,887	1,377	0,756	0,739	0,866
15	178	7618	42,80	11,62	23,413	0,926	0,894	1,415	0,746	0,761	0,859
16	228	8341	36,58	12,73	21,862	0,923	0,885	1,375	0,758	0,743	0,867

Pastebėtas tiesinis ryšys tarp modelių metrikų ir dalelių antimikrobiniuose paviršiuose vidutinio apskritumo, pilnumo bei apvalumo pagal 16 paveiksle pateiktus sklaidos grafikus. Taip pat matomas tiesinis ryšys tarp modelių metrikų.

Apskaičiuoti Pearson'o koreliacijos koeficientai (7 lentelėje) rodo, kad tarp modelių metrikų ir bakterijų apskritumo, pilnumo, apvalumo, kraštinių santykio, bei apimties yra vidutinio stiprumo / stiprūs tiesiniai ryšiai.



16 pav. Modelių metrikų ir vidutinių charakteristikų koreliacinės matricos grafinis vaizdas

7 lentelė. Pearson'o koreliacijos koeficientai tarp dalelių charakteristikų ir modelių metrikų

	<i>mAP</i>	<i>AP</i> , kai <i>IoU</i> = 0,5	F1
Apskritumas	0,627	0,793	0,865
Pilnumas	0,653	0,800	0,863
Apvalumas	0,606	0,711	0,751
Kraštinių santykis	-0,591	-0,720	-0,765
Apimtis	0,499	0,572	0,599
Dalelių kiekis	-0,388	-0,309	-0,261
Vidutinis dydis	0,323	0,371	0,371
Perimetras	0,062	0,040	0,005
Kompaktiškumas	0,283	0,362	0,395

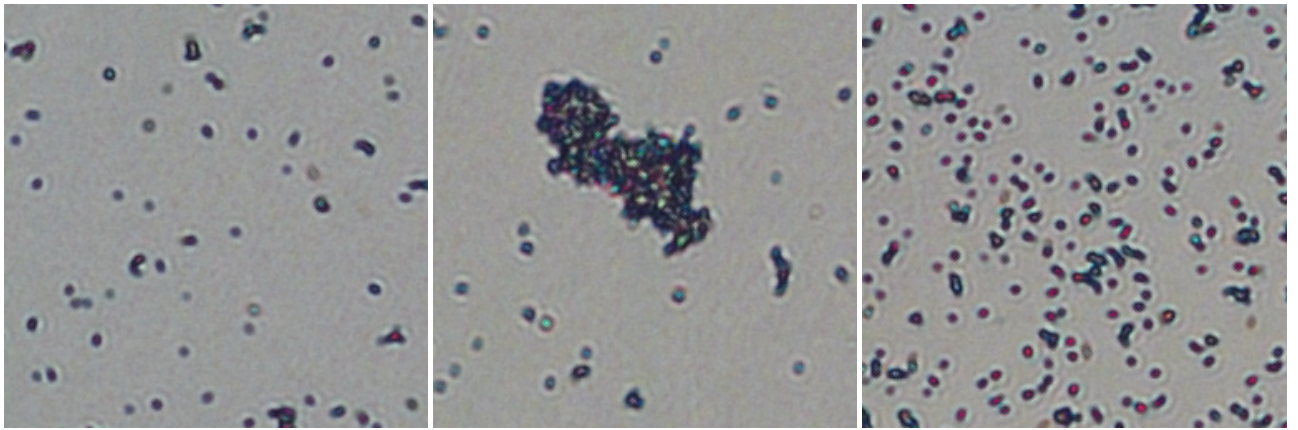
Taip pat įvertintas dalelių pasiskirstymas antimikrobiniuose paviršiuose – ar jos pasiskirsčiusios atsitiktinai, ar yra atsiskyrusios, ar sudarančios klasterius. Pasiskirstymas vertintas naudojant

rankomis sužymėtus bakterijų vaizdus. Vertinimo rezultatai pateikiami 8 lentelėje. Dalelių pasiskirstymo vertinimas skiriasi keturiems vaizdams (1, 2, 12 ir 14 vaizdams) priklausomai nuo vertinamo pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą ar vidurkį.

8 lentelė. Kiekvieno vaizdo artimiausio kaimyno atstumo teorinės bei įvertintos reikšmės ir dalelių pasiskirstymo nustatymas pagal jas

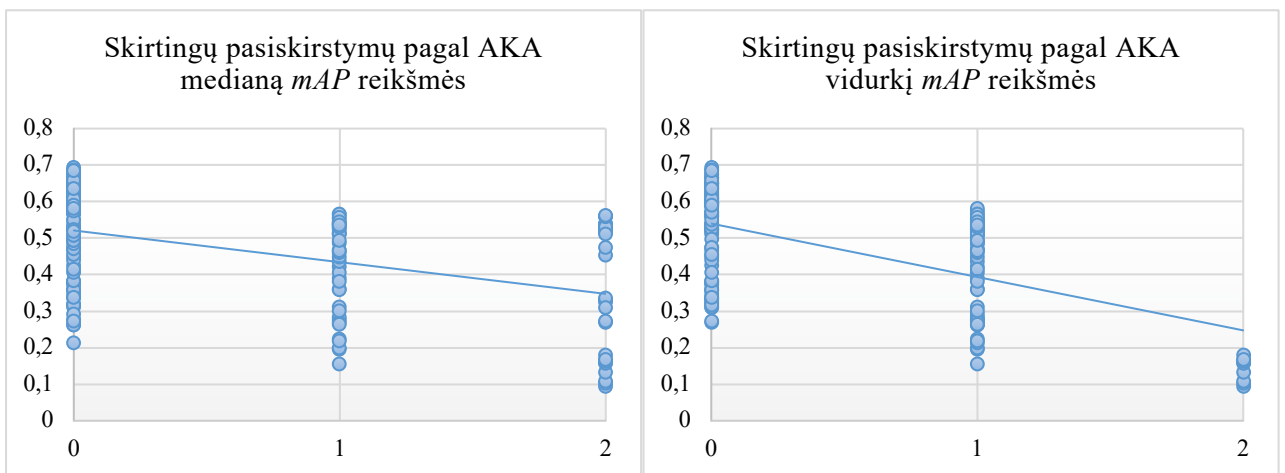
Vaizdo nr.	Teorinis atsitiktinis AKA	Įvertintas centroidų AKA				Dalelių pasiskirstymas pagal centroidų AKA medianą	Dalelių pasiskirstymas pagal centroidų AKA vidurkį
	Reikšmė ir dispersija	Mediana	Dispersija apie medianą	Vidurkis	Dispersija apie vidurkį		
1	16,52	13,61	94,47	16,28	87,35	Sudarančios klasterius	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
2	16,81	12,29	105,89	16,03	91,92	Sudarančios klasterius	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
3	17,10	15,15	240,89	19,98	217,55	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
4	18,29	18,88	101,05	19,35	100,83	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
5	17,42	15,16	96,66	18,01	88,55	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
6	18,88	15,36	75,15	16,64	73,51	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
7	15,88	16,00	57,50	16,62	57,13	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
8	17,92	15,90	130,83	118,61	10,89	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
9	10,90	6,40	72,36	8,96	65,84	Sudarančios klasterius	Sudarančios klasterius
10	17,58	17,43	107,85	19,03	105,28	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsitiktinai pasiskirsčiusios
11	8,92	9,63	17,35	10,72	16,15	Atsiskyrušios dalelės	Atsiskyrušios dalelės
12	9,29	9,83	22,13	11,34	19,85	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsiskyrušios dalelės
13	9,12	10,67	16,40	11,21	16,11	Atsiskyrušios dalelės	Atsiskyrušios dalelės
14	9,41	9,90	20,85	11,01	19,62	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsiskyrušios dalelės
15	9,59	10,99	19,88	11,85	19,14	Atsiskyrušios dalelės	Atsiskyrušios dalelės
16	8,51	9,21	13,76	10,13	12,91	Atsiskyrušios dalelės	Atsiskyrušios dalelės

Kiekvieno dalelių pasiskirstymo pavyzdžiai pateikiami 17 paveiksle.

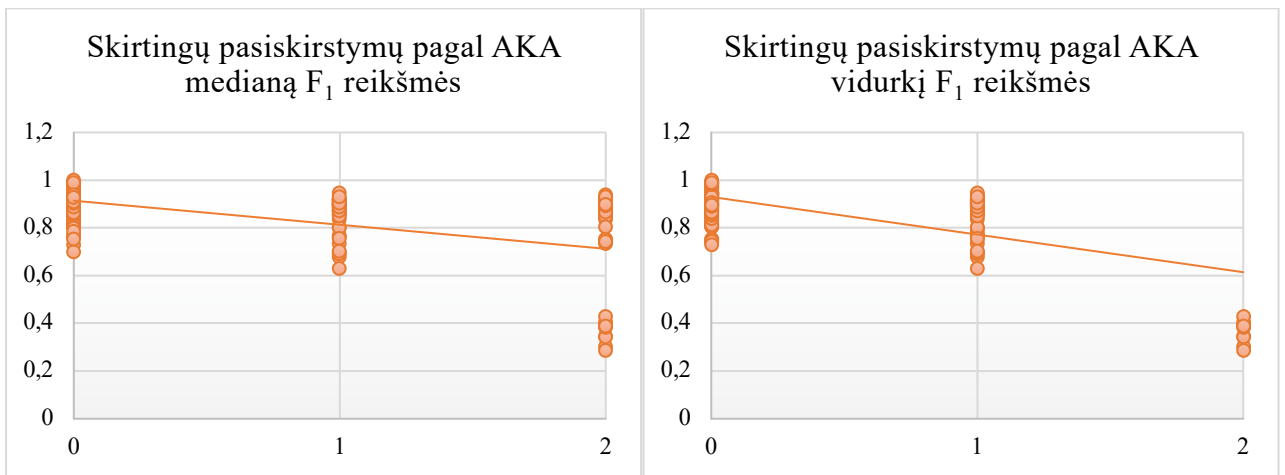


17 pav. Dalelių pasiskirstymo pavyzdžiai antimikrobiniuose paviršiuose: kairėje atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės (vaizdo nr. – 6), viduryje – klasterius sudarančios dalelės (vaizdo nr. – 9), dešinėje – atsiskyrusios dalelės (vaizdo nr. – 16)

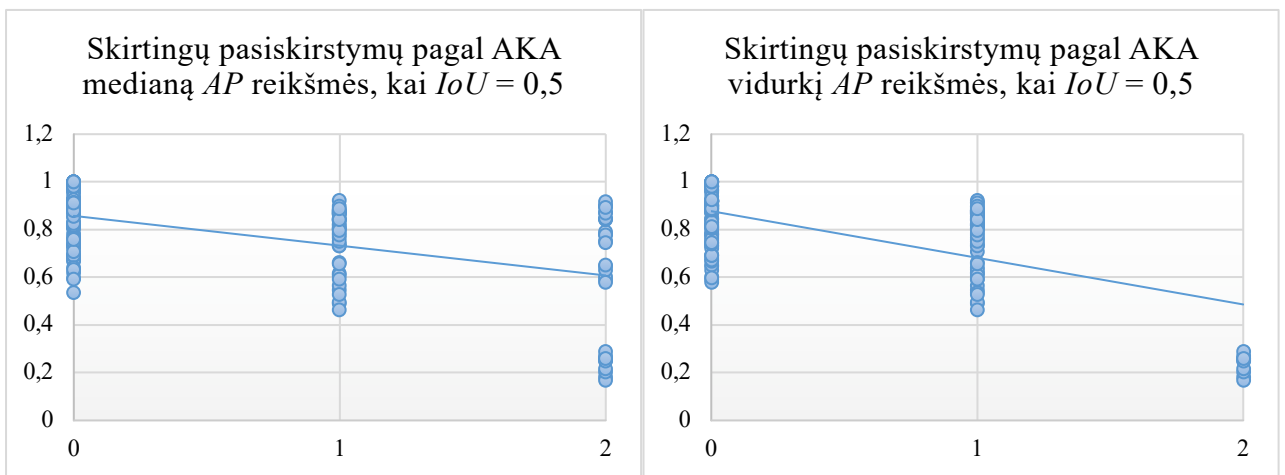
Kiekvienai pasiskirstymo vaizdų grupei apskaičiuojamos visų dešimties 1 lentelėje aprašytų modelių metrikų charakteristikos ir pateikiamos 9 ir 10 lentelėse. Neapibendrintos statistikos grafiniu būdu vaizduojamos 18 – 20 paveiksluose.



18 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) mAP reikšmės. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės



19 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) F_1 reikšmės. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės



20 pav. Skirtingų pasiskirstymų pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą (kairėje) ir vidurkį (dešinėje) AP reikšmės, kai $IoU = 0,5$. 0 – atsitiktinai pasiskirsčiusios dalelės, 1 – atsiskyrusios dalelės, 2 – klasterius sudarančios dalelės

9 lentelė. Visų modelių apibendrintos charakteristikos, kai dalelių pasiskirstymas nustatomas pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą

Dalelių pasiskirstymas	Pasiskirstymas pagal centroidų AKA medianą						
	n	mAP		F_1		AP , kai $IoU = 0,5$	
		Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Vidurkis	Standartinis nuokrypis
Atsitiktinai pasiskirsčiusios	90	0,532	0,123	0,912	0,060	0,863	0,103
Atsiskyrusios dalelės	40	0,423	0,125	0,850	0,082	0,756	0,132
Sudarančios klasterius	30	0,355	0,176	0,688	0,239	0,592	0,275

10 lentelė. Visų modelių apibendrintos charakteristikos, kai dalelių pasiskirstymas nustatomas pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkį

Dalelių pasiskirstymas	Pasiskirstymas pagal centroidų AKA vidurkį						
	n	mAP		F ₁		AP, kai IoU = 0,5	
		Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Vidurkis	Standartinis nuokrypis
Atsitiktinai pasiskirsčiusios	90	0,528	0,120	0,902	0,066	0,849	0,111
Atsiskyrusios dalelės	60	0,428	0,124	0,854	0,079	0,766	0,127
Sudarančios klasterius	10	0,144	0,031	0,367	0,046	0,234	0,040

Iš 18 – 20 paveikslų bei 9 ir 10 lentelėse pateiktų apskaičiuotų charakteristikų galima formuluoti hipotezes, jog atsitiktinai pasiskirsčiusių dalelių modelių metrikų vidurkiai yra didesni negu atsiskyrusių dalelių ir sudarančių klasterius dalelių, taip pat atsiskyrusių dalelių modelių metrikų vidurkiai yra didesni negu sudarančių klasterius dalelių.

Norint patikrinti iškeltas hipotezes, pirmiausia patikrinamos hipotezės apie kiekvienos grupės normalumą pagal Shapiro-Wilk ir Anderson-Darling normalumo testus. Hipotezių tikrinimo rezultatai (p reikšmės) pateikiamos 11 lentelėje.

11 lentelė. Kiekvienos grupės normalumo patikrinimas, p reikšmės

Centroidų AKA mediana ar vidurkis dalelių pasiskirstymui nustatyti	Dalelių pasiskirstymas	Modelio metrika	Shapiro-Wilk	Anderson-Darling
Mediana	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	mAP	<0,001	<0,001
		F ₁	<0,001	<0,001
		AP, kai IoU = 0,5	<0,001	<0,001
	Atsiskyrusios dalelės	mAP	0,001	<0,001
		F ₁	<0,001	<0,001
		AP, kai IoU = 0,5	<0,001	<0,001
	Sudarančios klasterius	mAP	0,001	<0,001
		F ₁	<0,001	<0,001
		AP, kai IoU = 0,5	<0,001	<0,001
Vidurkis	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	mAP	<0,001	<0,001
		F ₁	<0,001	0,001
		AP, kai IoU = 0,5	<0,001	<0,001
	Atsiskyrusios dalelės	mAP	<0,001	<0,001
		F ₁	<0,001	<0,001
		AP, kai IoU = 0,5	<0,001	<0,001

Centroidų AKA mediana ar vidurkis dalelių pasiskirstymui nustatyti	Dalelių pasiskirstymas	Modelio metrika	Shapiro-Wilk	Anderson-Darling
	Sudarančios klasterius	mAP	0,102	0,097
		F_1	0,305	0,249
		AP , kai $IoU = 0,5$	0,453	0,430

Kadangi tik vienoje grupėje gautų metrių pasiskirstymas suderinamas su normaliuoju skirstiniu, hipotezės apie grupių metrių vidurkių m_1 ir m_2 tikrinamos neparametriniu vienusiu Wilcoxon-Mann-Whitney U testu:

$$H_0: m_1 = m_2$$

$$H_a: m_1 > m_2$$

12 lentelė. Vienpusio Wilcoxon-Mann-Whitney U testo p reikšmės lyginant modelių metrių vidurkius tarp grupių, kai jos sudaromos remiantis centroidų artimiausio kaimyno atstumo mediana

Modelio metrika	$m_1 \backslash m_2$		Sudarančios klasterius
	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsiskyrusios dalelės	
mAP	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$9,9 \cdot 10^{-7}$
	Atsiskyrusios dalelės		0,0789
F_1	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-8}$
	Atsiskyrusios dalelės		0,0032
AP , kai $IoU = 0,5$	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
	Atsiskyrusios dalelės		0,0212

13 lentelė. Vienpusio Wilcoxon-Mann-Whitney U testo p reikšmės lyginant modelių metrių vidurkius tarp grupių, kai jos sudaromos remiantis centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkiu

Modelio metrika	$m_1 \backslash m_2$		Sudarančios klasterius
	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	Atsiskyrusios dalelės	
mAP	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	$2,3 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
	Atsiskyrusios dalelės		$4,2 \cdot 10^{-7}$
F_1	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	0,0001	$1,2 \cdot 10^{-7}$
	Atsiskyrusios dalelės		$2,5 \cdot 10^{-7}$
AP , kai $IoU = 0,5$	Atsitiktinai pasiskirsčiusios	$5 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$
	Atsiskyrusios dalelės		$2,5 \cdot 10^{-7}$

Remiantis 12 ir 13 lentelėse pateiktomis p reikšmėmis, matoma, jog beveik visais atvejais priimtina alternatyvi hipotezė – pirmosios lyginamos grupės vidurkis yra statistiškai reikšmingai didesnis už antrosios grupės. Tik vienu atveju neatmetama nulinė hipotezė apie vidurkių lygybę – kai alternatyvi hipotezė yra, jog atsiskyrusių dalelių grupės mAP vidurkis didesnis už sudarančių klasterius dalelių grupės, kuomet dalelių pasiskirstymas nustatomas pagal centroidų artimiausio kaimyno atstumo medianą.

Išvados

Darbe atlikta literatūros bei naudojamų metodų apžvalga, analizuoti sidabro ir aukso nanodalelėmis padengtų titano dioksido plonų plėvelių antibakterinio aktyvumo prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* rūšis, susijusias su burnos ligomis, tyrimo metu gauti vaizdai. Atliktas šių vaizdų pirminis paruošimas tyrimui, bakterijoms segmentuoti vaizduose apmokyti skirtingi Mask R-CNN modeliai, o tyrimo metu padarytos išvados:

1. Modeliams vertinti pasirinktos tokios metrikos – vidutinis preciziškumas, kai IoU lygus 0,5, taip pat vidutinio preciziškumo su skirtingomis IoU reikšmėmis vidurkis bei F_1 koeficientą. Geriausio modelio apibendrintos metrikos: vidutinis preciziškumas, kai IoU lygus 0,5, – 0,873, vidutinio preciziškumo su skirtingomis IoU reikšmėmis vidurkis – 0,551 ir F_1 koeficientas dalelių tikslumu – 0,898;
2. Apskaičiuotos bakterijų antimikrobiniuose paviršiuose charakteristikos – kiekis, užimamas plotas, vidutinis dydis, perimetras, apskritumas, pilnumas. Pastebėta, kad tarp modelių metrikų ir apskritumo, pilnumo, apvalumo, kraštinių santykio, bei apimties yra vidutinio stiprumo / stiprūs tiesiniai ryšiai;
3. Įvertintas bakterijų pasiskirstymas antimikrobiniuose paviršiuose – ar bakterijos pasiskirsčiusios atsitiktinai, ar yra atsiskyrusios, ar sudarančios klasterius. Pasiskirstymo vertinimas atliktas naudojant centroidų artimiausio kaimyno atstumo vidurkį arba medianą. Didžiojoje vaizdų dalyje (56,25 % vertinant tiek pagal medianą, tiek pagal vidurkį) bakterijos pasiskirsčiusios atsitiktinai, mažesnėje dalyje (25 % vertinant pagal medianą ir 37,5 % pagal vidurkį) bakterijos yra atsiskyrusios ir mažiausioje dalyje (18,75 % vertinant pagal medianą ir 6,25 % vertinant pagal vidurkį) bakterijos sudaro klasterius;
4. Palyginus metrikų vidurkių reikšmes skirtingo bakterijų pasiskirstymo vaizduose nustatyta, jog atsitiktinai pasiskirsčiusių dalelių metrikų vidurkiai yra statistškai reikšmingai didesni už atsiskyrusių dalelių ir už klasterius sudarančių dalelių atitinkamų metrikų vidurkius. Taip pat atsiskyrusių dalelių metrikų vidurkiai beveik visais atvejais yra statistškai reikšmingai didesni už klasterius sudarančių dalelių tų pačių metrikų vidurkius;
5. Sudaryta metodinė bakterijų pasiskirstymo vertinimo antimikrobiniuose paviršiuose eiga. Ši metodika galėtų reikšmingai prisidėti prie tolesnių antibakterinio aktyvumo prieš *Veillonella parvula* ir *Neisseria sicca* bakterijas tyrimų, kadangi sudarytų galimybes atskirai vertinti kiekvieną koloniją sudarančią bakteriją.
6. Apibendrinant galima teigti, kad naudotos metodikos silpnoji vieta – klasterius sudarančių bakterijų aptikimas ir atskyrimas. Tačiau tai yra sudėtinga užduotis ir bakterijas žymint rankiniu būdu, kadangi ne visuomet galima tiksliai nustatyti besiliečiančių bakterijų ribas ar netgi kiekį. Norint sudarytą metodiką visapusiškai taikyti praktikoje (ypač atpažįstant klasterius sudarančias bakterijas) pirmiausiai reikėtų patobulinti egzempliorių segmentavimo užduočiai skirtą modelį.

Literatūros sąrašas

1. PANIGRAHI, S., et al. *Misic, a general deep learning-based method for the high-throughput cell segmentation of complex bacterial communities*. 2021, eLife, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.65151>.
2. NAETS, T., et al. *A Mask R-CNN approach to counting bacterial colony forming units in pharmaceutical development*. arXiv, 2021. <https://doi.org/10.48550/arxiv.2103.05337>.
3. JECKEL, H. and K. DRESCHER. Advances and opportunities in image analysis of bacterial cells and communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 2021, 45, 4, p. 1-14. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa062>.
4. KULIKOV, V. and V. LEMPITSKY. *Instance Segmentation of Biological Images Using Harmonic Embeddings*. 2020 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR), 2020, p. 3842-3850. doi: 10.1109/CVPR42600.2020.00390.
5. What is computer vision? *IBM*. [Tinkle, žiūrėta 2022-04-20] <https://www.ibm.com/topics/computer-vision>.
6. TIAN, D., et al. *Review of object instance segmentation based on deep learning*. 4, 2022, Journal of Electronic Imaging, 31. <https://doi.org/10.1117/1.JEI.31.4.041205>.
7. VICAR, T., et al. *Cell segmentation methods for label-free contrast microscopy: review and comprehensive comparison*. 360, 2019, BMC Bioinformatics, 20. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2880-8>.
8. GONZALEZ, Rafael C. and Richard E. WOODS. *Digital Image Processing*. 4th Edition. New York : Pearson, 2018. 978-0133356724.
9. SRISHA R. and A. KHAN. *Morphological Operations for Image Processing : Understanding and its Applications*. 2013. NCVSComs-13. p. 17-19.
10. HEYDORN A., et al. *Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT*. 2000, Microbiology, 146, p. 2395–2407. doi:10.1099/00221287-146-10-2395.
11. YANG X., H. BEYENAL, G. HARKIN, Z. LEWANDOWSKI. *Evaluation of biofilm image thresholding methods*. 5, 2001, Water research, 35, p. 1149-1158. doi:10.1016/s0043-1354(00)00361-4.
12. BEYENAL, H., C. DONOVAN, Z. LEWANDOWSKI, G. HARKIN. *Three-dimensional biofilm structure quantification*. 3, 2004, Journal of Microbiological Methods, 59, p. 395-413. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.08.003>. ISSN 0167-7012.
13. YERLY, J., Y. HU, S. M. JONES, R. J. MARTINUZZI. *A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images*. 3, 2007, Journal of microbiological methods, 70, p. 424-433. doi:10.1016/j.mimet.2007.05.022.
14. RENSLOW, R., Z. LEWANDOWSKI, H. BEYENAL. *Biofilm image reconstruction for assessing structural parameters*. 6, 2011, Biotechnol Bioeng, 108, p. 1383-1394. doi: 10.1002/bit.23060.
15. KLINGER-STROBEL, M., H. SUESSE, D. FISCHER, M. W. PLETZ, O. MAKAREWICZ. *A Novel Computerized Cell Count Algorithm for Biofilm Analysis*. 5, 2016, PloS one, 11. doi:10.1371/journal.pone.0154937.
16. CAICEDO, J. C., et al. *Nucleus segmentation across imaging experiments: the 2018 Data Science Bowl*. 2019, Nature Methods, 16, p. 1247-1253. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0612-7>.

17. RONNEBERGER O., P. FISCHER, T. BROX. *U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation*. Springer, Cham, 2015. Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015. 9351. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28. ISBN 978-3-319-24574-4.
18. SCHMIDT U., M. WEIGERT, C. BROADDUS, G. MYERS. *Cell detection with star-convex polygons*. Springer, Cham, 2018. Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018. T. 11071. DOI: 10.1007/978-3-030-00934-2_30. ISBN : 978-3-030-00933-5.
19. HOLLANDI R., et al. *A deep learning framework for nucleus segmentation using image style transfer*. Cold Spring Harbor Laboratory, 2019, bioRxiv. 10.1101/580605.
20. HE K., G. GKIOXARI, P. DOLLÁR, R. GIRSHICK. *Mask R-CNN*. 2017. 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). p. 2980-2988. doi: 10.1109/ICCV.2017.322.
21. STRINGER, C., T. WANG, M. MICHAELIS, M. PACHITARIU. *Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation*. 2021, Nature Methods, 18, p. 100-106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>.
22. WEIGERT, M., et al. *Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy*. 2018, Nature Methods, 15, p. 1090-1097. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0216-7>.
23. MOEN, E., et al. *Deep learning for cellular image analysis*. 2019, Nature Methods, 16, p. 1233-1246. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0403-1>.
24. GIRSHICK, R., J. DONAHUE, T. DARRELL, J. MALIK. *Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation*. 2014. 2014 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. p. 580-587. doi: 10.1109/CVPR.2014.81.
25. Selective Search for Object Detection | R-CNN. *GeeksforGeeks*. [Tinkle, žiūrėta 2022-04-15] 2021. <https://www.geeksforgeeks.org/selective-search-for-object-detection-r-cnn/>.
26. GIRSHICK, R. *Fast R-CNN*. 2015. 2015 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). p. 1440-1448. doi: 10.1109/ICCV.2015.169.
27. REN, S., K. HE, R. GIRSHICK, J. SUN. *Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks*. 2015. In Proceedings of the 28th International Conference on Neural Information Processing Systems - Volume 1 (NIPS'15). p. 91-99. <https://dl.acm.org/doi/10.5555/2969239.2969250>.
28. DAI, J., K. HE, J. SUN. *Instance-Aware Semantic Segmentation via Multi-task Network Cascades*. 2016. 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). p. 3150-3158. doi: 10.1109/CVPR.2016.343..
29. LIU, S., L. QI, H. QIN, J. SHI, J. JIA. *Path Aggregation Network for Instance Segmentation*. 2018. 2018 IEEE/CVF Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. p. 8759-8768. doi: 10.1109/CVPR.2018.00913.
30. ROMERA-PAREDES, B. and P. H. S. TORR. *Recurrent instance segmentation*. Springer, Cham, 2016. Computer Vision – ECCV 2016. p. 312-329. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46466-4_19. ISBN 978-3-319-46466-4.
31. HOCHREITER, S. and J. SCHIDHUBER. *Long short-term memory*. 8, 1997, Neural Comput, 9, p. 1735-1780. doi: <https://doi.org/10.1162/neco.1997.9.8.1735>.

32. REN, M. and R. S. ZEMEL. *End-to-end instance segmentation with recurrent attention*. 2017. 2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). DOI:10.1109/CVPR.2017.39.
33. BANCHER, B., A. MAHBOD, I. ELLINGER, R. ECKER, G. DORFFNER. *Improving Mask R-CNN for Nuclei Instance Segmentation in Hematoxylin & Eosin-Stained Histological Images*. 2021. Proceedings of the MICCAI Workshop on Computational Pathology. 156, p. 20-35. <https://proceedings.mlr.press/v156/bancher21a/bancher21a.pdf>
34. MAHMOOD, F., et al. *Deep Adversarial Training for Multi-Organ Nuclei Segmentation in Histopathology Images*. 2020. IEEE Transactions on Medical Imaging. 39, p. 3257-3267. doi: 10.1109/TMI.2019.2927182.
35. WEISS, K., T. M. KHOSHGOFTAAR, D. WANG. *A survey of transfer learning*. 9, 2016, Journal of Big Data, 3. <https://doi.org/10.1186/s40537-016-0043-6>.
36. FERRARI, A., S. LOMBARDI, A. SIGNORONI. *Bacterial colony counting with convolutional neural networks in digital microbiology imaging*. 2015. 2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC). p. 7458-7461. doi: 10.1109/EMBC.2015.7320116.
37. BUDGINAITĖ, E., M. MORKŪNAS, A. LAURINAVIČIUS, P. TREIGYS. *Deep Learning Model for Cell Nuclei Segmentation and Lymphocyte Identification in Whole Slide Histology Images*. 4, 2021, Informatica, 32, p. 1-18. DOI:10.15388/20-INFOR442.
38. VUOLA, A. O., S. U. AKRAM, J. KANNALA. *Mask-RCNN and U-Net Ensembled for Nuclei Segmentation*. 2019. 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019). p. 208-212. doi: 10.1109/ISBI.2019.8759574.
39. FUDICKAR, S., E. J. NUSTEDE, E. DREYER, J. BORNHORST. *Mask R-CNN Based C. Elegans Detection with a DIY Microscope*. 8, 2021, Biosensors, 11. doi 10.3390/bios11080257. ISSN 2079-6374.
40. BARBER, P. R., et al. *Automated counting of mammalian cell colonies*. 2001, Physics in Medicine & Biology, 46. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/46/1/305>.
41. NIYAZI, M., I. NIYAZI, C. BELKA. *Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software*. 4, 2007, Radiation oncology, 2. doi:10.1186/1748-717X-2-4.
42. BRUGGER, S., et al. *Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates*. 3, 2012, PLoS one, 7. doi:10.1371/journal.pone.0033695.
43. KHAN, A. u. M., A. TORELLI, I. WOLF, N. GRETZ. *Autocellseg: robust automatic colony forming unit (cfu)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques*. 2018, Scientific Reports, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24916-9>.
44. GEISSMANN, Q. *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. 2, 2013, PLoS ONE, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054072>.
45. MCQUIN, C., et al. *Cellprofiler 3.0: Next-generation image processing for biology*. 7, 2018, PLoS Biol, 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>.
46. KULIKOV, V., V. YURCHENKO, V. LEMPITSKY. *Instance segmentation by deep coloring*. arXiv, 2018. <https://doi.org/10.48550/arxiv.1807.10007>.
47. HOU, L., et al. *Unsupervised Histopathology Image Synthesis*. 2017, ArXiv. <https://doi.org/10.48550/arxiv.1712.05021>

48. TU, J., G. YANG, P. QI, Z. DING, G. MEI. *Comparative investigation of parallel spatial interpolation algorithms for building large-scale digital elevation models*. 6, 2020, PeerJ Computer Science. <http://doi.org/10.7717/peerj-cs.263>.
49. SRIUBAS, M., et al. *Antibacterial Activity of Silver and Gold Particles Formed on Titania Thin Films*. 1190, 2022, *Nanomaterials*, 12. <https://doi.org/10.3390/nano12071190>.
50. [CV] 2. Image Processing Basic: Gaussian and Median Filter, Separable 2D filter. *medium*. [Tinkle, žiūrėta 2022-03-15] 2020. <https://medium.com/jun94-devpblog/cv-2-gaussian-and-median-filter-separable-2d-filter-2d11ee022c66>
51. WEISSTEIN, E. W. Convolution. *MathWorld*. [Tinkle, žiūrėta 2022-02-18] From MathWorld-- A Wolfram Web Resource. <https://mathworld.wolfram.com/Convolution.html>
52. WENG, L. *Object Detection for Dummies Part 3: R-CNN Family*. 2017, lilianweng.github.io. <https://lilianweng.github.io/posts/2017-12-31-object-recognition-part-3/>
53. PRAKASH, J. Non Maximum Suppression: Theory and Implementation in PyTorch. *LearnOpenCV*. [Tinkle, žiūrėta 2022-03-19] 2021. <https://learnopencv.com/non-maximum-suppression-theory-and-implementation-in-pytorch/>
54. HUI, J. mAP (mean Average Precision) for Object Detection. *medium*. [Tinkle, žiūrėta 2022-02-10] 2018. <https://jonathan-hui.medium.com/map-mean-average-precision-for-object-detection-45c121a31173>
55. GLEN, S. Jaccard Index / Similarity Coefficient. *Statistics How To*. [Tinkle, žiūrėta 2022-02-10] <https://www.statisticshowto.com/jaccard-index/>
56. BioVoxel Toolbox. *ImageJ*. [Tinkle, žiūrėta 2022-03-13] <https://imagej.net/plugins/biovoxel-toolbox>
57. F-Test for Equality of Two Variances. *NIST*. [Tinkle, žiūrėta 2022-04-12] <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda359.htm>
58. ABDULLA, W. Mask R-CNN for object detection and instance segmentation on Keras and TensorFlow. *github*. [Tinkle, žiūrėta 2022-01-12] 2017. https://github.com/matterport/Mask_RCNN
59. EVERINGHAM, M. L. V. GOOL, C. K. I. WILLIAMS, J. WINN, A. ZISSERMAN. *The PASCAL Visual Object Classes (VOC) Challenge*. 2010, *International Journal of Computer Vision*, 88, p. 303-338. <https://doi.org/10.1007/s11263-009-0275-4>.
60. Definitions for quantization. *definitions*. [Tinkle, žiūrėta 2022-04-29] <https://www.definitions.net/definition/quantization>
61. COCO Dataset. *cocodataset*. [Tinkle, žiūrėta 2022-01-23] <https://cocodataset.org/#home>