



Kauno technologijos universitetas

Informatikos fakultetas

Biologinių ląstelių atpažinimas ir jų funkcinių savybių įvertinimas taikant dirbtinio intelekto metodus

Baigiamasis magistro projektas

Lukas Keršys

Projekto autorius

Doc. Andrius Kriščiūnas

Vadovas

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Informatikos fakultetas

Biologinių ląstelių atpažinimas ir jų funkcinių savybių įvertinimas taikant dirbtinio intelekto metodus

Baigiamasis magistro projektas

Dirbtinio intelekto informatika (6211BX007)

Lukas Keršys

Projekto autorius

Doc. Andrius Kriščiūnas

Vadovas

**Prof. Agnė Paulauskaitė
Tarasevičienė**

Recenzentas

Kaunas, 2025



Kauno technologijos universitetas

Informatikos fakultetas

Lukas Keršys

Biologinių ląstelių atpažinimas ir jų funkcinių savybių įvertinimas taikant dirbtinio intelekto metodus

Akademinių sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdamas kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasis 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 mokėjęs;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalintas iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Lukas Keršys

Patvirtinta elektroniniu būdu



Kauno technologijos universitetas

Informatikos fakultetas

Magistro baigiamasis projektas

Projekto tema	Biologinių ląstelių atpažinimas ir jų funkcinių savybių įvertinimas taikant dirbtinio intelekto metodus	
Tematikos aprašymas	Darbas būtų atliekamas bendrai su LSMU kardiologijos instituto Tarpląstelinės sąveikos tyrimo laboratorija (duomenų reikalingų tyrimui atlikti susirinkimas, dalykinės srities konsultacijos, kt.). Pagrindinė dalykinė sritis: objektų aptikimas vaizduose, vaizdų segmentavimas, objektų palyginimas tarp skirtingų vaizdo kadro, kt..	
Vadovas	Doc. Andrius Kriščiūnas	2023-09-30

Keršys Lukas. Biologinių ląstelių atpažinimas ir jų funkcinų savybių įvertinimas taikant dirbtinio intelekto metodus. Magistro baigiamasis projektas / vadovas doc. Andrius Kriščiūnas; Kauno technologijos universitetas, Informatikos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypties grupė): Informatikos mokslai, Informatika (B01)

Reikšminiai žodžiai: „detectron2“, „YOLOv11“, „U-Net“, „Gap junctions“, „machine learning“, „cells detection using AI“, „instance segmentation“, „image segmentation“.

Kaunas, 2025. 48 p.

Santrauka

Šiandieniai biologijos tyrimai naudoja daug pažangių technologijų tyrimuose, bet vienas dalykas nuolat pristabdantis šių mokslų vystymąsi yra didelių duomenų kiekio apdorojimas, šiuose panašumų radimas, išvadų, sąryšių sudarymas. Paspirtinti šiuos tyrimus bei atrasti naujų sąsajų tarp duomenų galima naudojant dirbtinio intelekto metodus. Šio projekto užduotis – naudojant dirbtinio intelekto metodus automatizuoti, paspartinti biologinių ląstelių tyrimus - plyšinių jungčių tarp ląstelių tyrimus. Šias atpažinti, suskaičiuoti, įvertinti kiekybinius parametrus bei rasti optimaliausią modelį, sukurti architektūrą šių tikslui atpažinimui.

Dirbtinio intelekto metodai objektų segmentavimui geba atpažinti gyvas ląsteles, bet šių spartus tobulėjimas sukelia sunkumų siekiant pasirinkti optimaliausią segmentacijos modelį šiandienos užduotims. Siekiant pasirinkti optimaliausią modelį, architektūrą šiandien – suliginamas standartinis U-NET modelis prieš „Detectron2 RCNN50“ ir YOLOv11. Tyrimo rezultatai rodo, jog „Detectron2 RCNN50“ modelis pasiekia geriausius tikslumo rodiklius, kuriuos dar pagerina papildomas rezultatų apdorojimas.

Sukurta ląstelių atpažinimo ir duomenų ištraukimo architektūra – leidžia ląsteles sužymėti ir suskaičiuoti jų kiekius nuotraukoje. Naudojant žymėjimo duomenis, galima apskaičiuoti ląstelių kiekybinius parametrus ir taip kartu su jais išgauti, nubraižyti per laiką ląstelės puskanalių pralaidumo kokybės rodiklius po transfekcijos, šiuos palyginti su atpažintom netransfekavusiom ląstelėmis.

Keršys Lukas. Biological cell detection and their functionality evaluation using artificial intelligence methods. Master's Final Degree Project / supervisor Assoc. Prof. Andrius Kriščiūnas; Faculty of Informatics, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Computer science, Informatics (B01)

Keywords: „detectron2“, „YOLOv11“, „U-Net“, „Gap junctions“, „machine learning“, „cells detection using AI“, „instance segmentation“, „image segmentation“.

Kaunas, 2025. 48 p.

Summary

Nowadays medicine, biology research has a lot of advanced technologies but one thing that is always slowing down the advancement of them is big counts of data processing, similarity findings, conclusion and relationship creation. To speed up the research and find new relationships between the data – we can use artificial intelligence methods. The aim of this project – using artificial intelligence automate, speed up biological cells research, with the main goal of cell's gap junctions. To detect them, calculate them and evaluate the quantitative parameters.

Artificial intelligence methods can detect alive cells but the rapid advancement in the field creates challenges when it is need to cross-compare models, to select most optimal one for the current task at hand. To choose the best model – cross-comparison is done between standard U-NET model vs „Detectron2 RCNN50“ vs YOLOv11. The research results show that „Detectron2 RCNN50“ achieves the highest performance, which are further improved by doing additional post-processing on results.

The created cell segmentation and data extraction architecture marks the cells and calculates their counts in pictures. Using segmentation data it is capable of extracting cell quantitative parameters and as such using it is possible to calculate and plot cell's hemi-channels permeability scores after transfection, giving the ability to compare transfected cells data with non-transfected cells.

Turinys

Lentelių sąrašas.....	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas.....	11
Įvadas.....	12
1. Tarpląstelinės plyšinės jungtys ir ląstelių segmentavimo metodai	13
1.1. Tarpląstelinės jungtys	13
1.2. Dažų sklidimo koeficiento įvertinimas ląstelėje.....	14
1.3. Tiriamos ląstelės	15
1.4. Dirbtinio intelekto metodai ląstelių atpažinimui, klasifikavimui	16
1.5. Metodai gerinti ląstelių atpažinimo tikslumą	19
1.6. Naudojamos tikslumo metrikos	21
2. Ląstelių atpažinimo sistemos specifikacija: metodai, įrankiai ir kiekybiniai rodikliai	23
2.1. Principinė modelių tyrimo schema	23
2.2. Principinė praktinio tyrimo schema.....	25
3. Segmentavimo modelių eksperimentinė analizė	27
3.1. Duomenų rinkimas	27
3.2. Ląstelių klasifikavimas, segmentavimas	30
3.3. Papildomas „Detectron2“ segmentacijų filtravimas.....	33
3.4. Šviesiausios apskritiminės dalies segmentacijoje paieška	34
3.5. Ląstelių kokybinių, kiekybinių parametrų surinkimas	34
4. Dažų sklidimo ir elektrofiziologijos tyrimas Cx26 HeLa ląstelėse.....	38
4.1. Šviesumo skaičiavimų metodų palyginimai	38
4.2. Elektrofiziologijos matavimų tyrimai.....	39
4.3. Dažų sklidimo matavimų tyrimai	40
4.4. Transfekuotų ląstelių nustatymas	42
Išvados	44
Literatūros sąrašas	45
Priedai.....	48
1 priedas. „4 th Baltics Biophysics Conference“ dalyvavimas, plakato pristatymas tema: „AI-Driven Analysis of Cell Imaging“	48
2 priedas. ICIST 2025 straipsnio priėmimas	48

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Modelių mokymo parametrai	30
2 lentelė. Išmokytų galutinių objektinio segmentavimo modelių tikslumo rodikliai.....	31
3 lentelė. Išmokytų modelių pikseliniai segmentavimo tikslumo rodikliai	32

Paveikslų sąrašas

1 pav. Plyšinės jungties struktūra [1] (kairysis paveikslėlis). Plyšinių jungčių atsidarymas, užsidarymas (dešinysis paveikslėlis) (kairėje sveikas, dešinėje nesveikas) [2]	14
2 pav. Dažų sklidimas, į ląsteles įterpus transfekcijos blokatorius [8]	15
3 pav. „U-NET“ modelio išėjimo kaukė dešinėje ir kairėje apmokymui sužymėtos ląstelės [13] ...	17
4 pav. „Mask-RCNN“ modelio algoritmas [9]	17
5 pav. „YOLO“ modelio aprėpties langelio segmentavimo veikimo principas [28]	18
6 pav. ResNet50 architektūra [10]	19
7 pav. FPN architektūra [11]	19
8 pav. Netikslus ląstelių žymėjimas naudojantis standartiniais segmentacijos metodais, be duomenų transformacijų [12]	20
9 pav. Ląstelių kontūro atpažinimo metodas [12]	20
10 pav. „CellStyle“ modelio architektūra. a) ląstelių dydžio suliginimas; b) stiliaus perkėlimas nuo X_{src} į X_{sty} ; c) stilizuotų nuotraukų naudojimas modelio mokymo procese [27]	21
11 pav. Principinė modelių tyrimų schema	24
11 pav. Principinė modelių pikselinio tikslumo išvedimo schema	25
13 pav. Principinė tyrimų schema (viršuje – elektrofiziologiniai matavimai, o apačioje – fluorescenciniai tyrimai)	25
14 pav. Gautas pavyzdinis ląstelių vaizdas	28
15 pav. Apšvitintų transfekuotų CX30 ląstelių vaizdas (kairėje); neapšvitintų transfekuotų CX30 ląstelių vaizdas (dešinėje)	28
16 pav. DAPI dažų sklidimo tyrimo a-c) laikinė seka (T0001 -> T0060 -> T0160)	29
17 pav. Elektrofiziologijos eksperimentų nuotrauka su pipete (tipinis apšvietimas)	29
18 pav. Gautas ląstelių nuotraukos objektų atpažinimo, standartinis klasifikavimo rezultatas	31
19 pav. Gauti skirtingų modelių ląstelių atpažinimo rezultatai tai pačiai nuotraukai. A) „Detectron2 Mask-RCNN50“; B) „YOLOv11“; C) „U-NET“	32
20 pav. „Detectron2 Mask-RCNN50“ Ląstelių segmentavimo rezultatas prieš papildomą filtravimą (kairėje), ir po (dešinėje)	33
21 pav. „Detectron2 Mask-RCNN50“ blogo segmentacijos poligono šalinimas (raudona segmentacija: multi-poligoninė)	34
22 pav. Ląstelių segmentacija su išvestais papildomais duomenimis prie kiekvienos ląstelės	36
23 pav. Kairėje – ląstelių nuotrauka su atliktu „Canny“ kontūrų aptikimu, dešinėje – originali	37
24 pav. Ląstelių duomenų surinkimo įranga (dažų matavimo duomenims)	38
25 pav. Visų fluorescencinių tyrimų segmentacijų ląstelės ir fono šviesumo skirtumo pokytis per laiką, kuomet ląstelė netransfekavus (apačioje – šviesiausio taško šviesumas, o viršuje – viso ląstelės ploto šviesumas; mėlyna linija – visų vidurkis)	39
26 pav. Elektrofiziologijos tyrimų į ląsteles paduodamas įtampos profilis (kairėje) ir išmatuotos srovės signalai (dešinėje, Im, max) per laiką	40
27 pav. Elektrofiziologijos tyrimų šviesumo intensyvumas prieš išmatuotą srovę. Kairėje Cx26-A49E varianto ląstelių mėginys, dešinėje tipinis Cx26	40
28 pav. Ląstelių segmentacijos vaizdas, naudojamas šviesumo kitimo matavimams, segmentuotas pagal apšviestos, normalių sąlygų nuotraukos segmentacijas, su išvestais papildomais duomenimis prie kiekvienos ląstelės	41
29 pav. Cx26-A49E transfekuotų ir netransfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas)	41

30 pav. Cx26 transfekuotų ir netransfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas).....	42
31 pav. Cx26-A49E prieš Cx26 transfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas).....	42
32 pav. Transfekuotų ląstelių nustatymas (dešinėje) iš modelio ir po filtravimo išvestų rezultatų duomenų (kairėje) DAPI švytėjimo nuotraukai.....	43

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

COCO – segmentacijos vaizdų formatas (angl. *Common objects in context*);

CNN – konvoliucinis neuroninis tinklas (angl. *Region-based convolutional network*);

Cx – koneksinas;

DAPI – fluorescenciniai ląstelių dažai, kurie pradeda švytėti susijungus su ląstelėje esančiu RNR ir apšvitinus 461 nm (stipriausiam švytėjimui) šviesos bangomis;

DL – gilusis mokymasis (angl. *Deep learning*);

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

FCN – pilnai konvoliucinis tinklas (angl. *Fully convolutional network*);

FPN - (angl. *Feature pyramid network*);

HeLa – vėžinių ląstelių linija;

IoU – Dviejų segmentacijų persidengimo rodiklis (angl. *Intersection over Union*);

mAP – (angl. *mean average precision*)

NMS – koeficientas leidžiantis pašalinti persidengiančias segmentacijas, šias nufiltruojant pagal IoU ir pasitikėjimo vertės santykį (angl. *Non-Maximum Supression*)

RCNN – regionu grįstas konvoliucinis neuroninis tinklas (angl. *Region-based convolutional network*);

ResNeT – (angl. *Residual neural network*);

RNR - ribonukleino rūgštis;

SAM – (angl. *Segment anything model*);

U-NET – pilnai konvoliucinis neuroninis tinklas adaptuotas biomedicininiais vaizdams;

Terminai:

„Artificial intelligence“ – dirbtinis intelektas;

„Bounding box“ – „YOLO“ segmentavimo objekto žymėjimas kvadrato apvedimu;

„Feature map“ – bruožų žemėlapis, nuotraukų savybių kontekste;

„Gap-juntions“ – plyšinės jungtys;

„Mask“ – nuotraukos kaukė, kuomet spalvos regionas yra objektas, segmentacija;

„Over-fitting“ – permokymas;

„Whole-cell patch-clamp“ – metodas matuoti srovę einančią per ląstelę į šią įsmeigus adatą per kurią paduodama srovė, o mėginelio tirpale prijungiamas įžeminimas;

Įvadas

Šiais laikais dirbtinis intelektas naudojamas daugelyje sričių įskaitant mediciną, biologinius tyrimus, norint paspartinti didelio kiekio duomenų rinkinių apdorojimus, iš jų įgauti naujų įžvalgų, kurių tyrėjas gali neįžvelgti plika akimi.

Šiame darbe siekiama paspartinti biologinių ląstelių tyrimus pagrinde susijusius su plyšinėmis jungtimis, transfekcijos procesu. Siekiama automatizuoti ląstelių atpažinimą (segmentavimą) pasirenkant optimaliausią modelį ir šiam pritaikytą architektūrą, iš gautų segmentacijų ištraukti kiekybinius rodiklius.

Plyšinių jungčių tyrimai yra susiję su ligomis kaip vėžiu, neurologiniais sutrikimais, DNR mutacijom. Plyšinių jungčių mutacijos, pakitimai įtakoja ląstelių tarpusavio komunikaciją, o tai yra kritiška norint organizmui atlikti savo funkcijas, kadangi visas organizmas, šio organai tarpusavy komunikuoja būtent per plyšinių jungčių kanalus.

Darbo tikslas: pasirinkti optimaliausią modelį ląstelių segmentacijai ir sukurti architektūrą automatizuoti šių kiekybinių parametrų ištraukimus.

Darbo uždaviniai:

- Apžvelgti esamus dirbtinio intelekto modelius ląstelių tyrimams ir šiuos palyginti;
- Sukurti optimalią dirbtinio intelekto architektūrą atpažinti ląsteles ir iš duomenų išgauti ląstelių kokybinius, kiekybinius rodiklius: ląstelių plotą, šviesumą, fono šviesumą ir kitus parametrus;
- Atlikti rezultatų analizę, siekiant atrasti sąryšių gautuose duomenyse, šiuos siekiant ateityje panaudoti daugiau automatizuojant ląstelių tyrimus (plyšinių jungčių, transfekcijos, koneksinų, dažų sklidimo ląstelės tyrimuose)

1. Tarpląstelinės plyšinės jungtys ir ląstelių segmentavimo metodai

Užduotis reikalauja atlikti biologinių ląstelių analizę naudojant dirbtinio intelekto metodus. Pagrindė tirama tarpląsteliniai (ląstelių jungtys iš proteinų) plyšinių jungčių ryšiai, šių transfekcijos procesas, dažų sklaidimo koeficientas ir kiti rodikliai bei sąsajos. Tai reikalinga paspartinti tyrimus, kurie susiję su tokiomis ligomis kaip vėžiu, neurologinėmis ligomis, „DNR“ mutacijomis.

Kiekvieną plyšinę jungtį sudaro vadinamas koneksinas, kiekvienas koneksinas sudarytas iš skirtingų proteinų grandžių ir turi skirtingą laidumą, reakciją į išorės poveikius. Būtent atitinkamos mutacijos, atitinkamuose koneksinuose, kurie yra atitinkamose organizmo dalyse – sukelia komplikacijas organizmui, kuomet pasikeičia koneksino/plyšinės jungties laidumas, kaip pavyzdžiui: Cx26, Cx30 koneksinų mutacijos gali sukelti kurtumą [19].

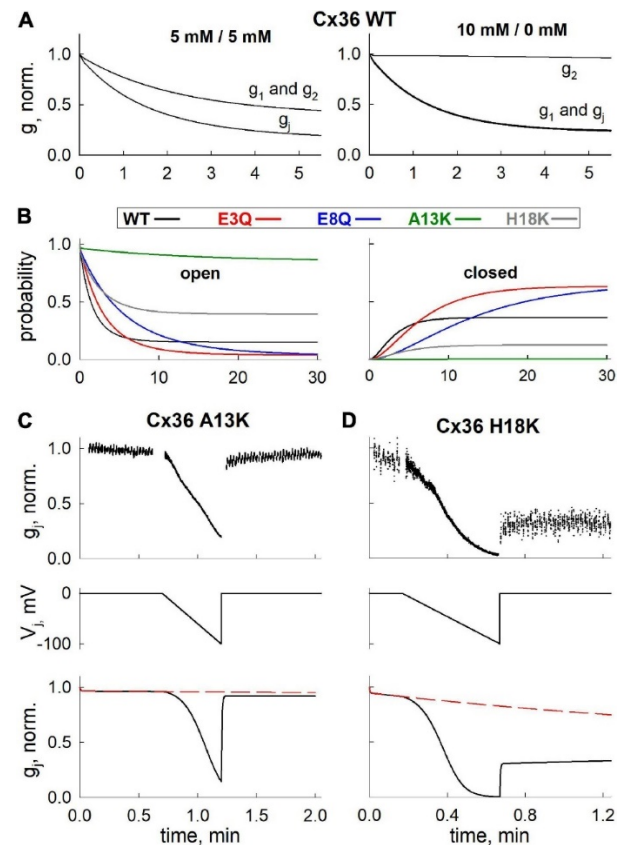
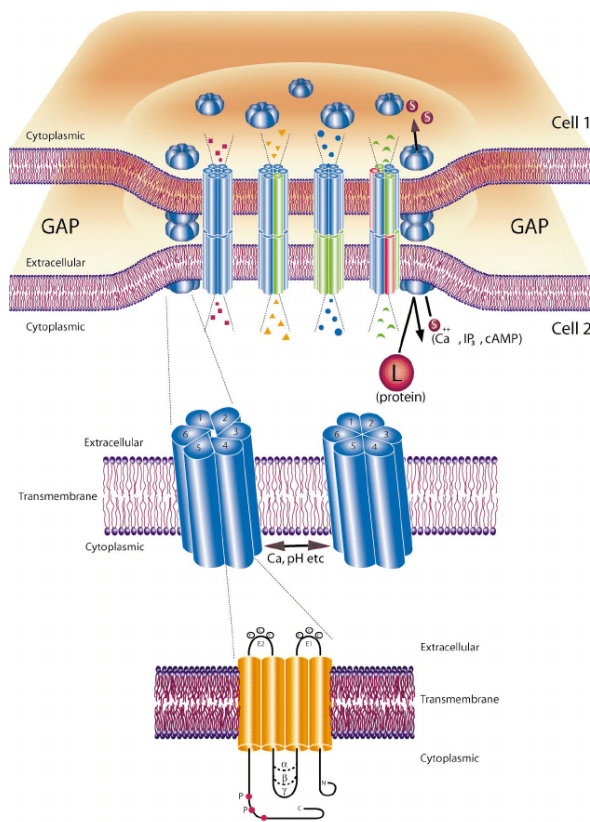
Šiuo metu tyrimai atliekami rankiniu būdu – padaromos ląstelių nuotraukos, ląstelės rankiniu būdu sužymimos, naudojant šviesiausią apskritimą ląstelėje apskaičiuojami jų šviesumai, o tada išskaičiuojami kiti rezultatai. Siekiant palengvinti ląstelių įvertinimą, aptikimą – į šias yra įterpiama „DAPI“ dažų, kurie transfekavusias ląsteles apšvitinus specifinėmis šviesos bangomis, šios pradeda švytėti dėl šių dažų prisijungimo prie „RNR“ ląstelėje, taip leidžiant lengviau identifikuoti transfekavusias ląsteles. Šių tyrimų automatizacija padės rezultatus patikslinti, nes šviesiausio apskritimo parinkimas rankiniu metodu neužtikrina rezultatų stabilumo, atkartotinumą, o visą ląstelės kontūrą žymėti rankiniu būdu yra itin per daug imlus laikui procesas.

1.1. Tarpląstelinės jungtys

Yra keli tipai tarpląstelių ryšių:

- „Tight junctions“ – veikia kaip difuzinis barjeras tarp ląstelių, blokuoja medžiagų pernašą tarp ląstelių (pvz.: skrandžio sienelės).
- „Adherens junctions“ – stipriai sujungia ląsteles, atlaikyti tempimo ir abrazyjos jėgas, pakankamai tamprios (pvz.: plaučiai).
- „Desmosomes“ – pačios stipriausios jungtys, atlaiko didžiausias tempimo ir abrazyjos jėgas (pvz.: odos ląstelės taip sujungtos)
- Plyšinės jungtys (angl. „Gap junctions“) – informacijos perdavimo jungtis tarp ląstelių (pvz.: nervai), geba pernešti ir ribotą kiekį maistinių medžiagų (pvz.: į akis)
- „Hemidesmos“ – prilipdo ląstelę prie bazės „basal lamina“ ant kurios visos ląstelės yra prilipdytos (pvz.: odos sluoksniai).

Šiame projekte tiriamos jungtys: plyšinės jungtys. Šių jungčių struktūra (žr. 1 pav.).



1 pav. Plyšinės jungties struktūra [1] (kairysis paveikslėlis). Plyšinių jungčių atsidarymas, užsidarymas (dešinysis paveikslėlis) (kairėje sveikas, dešinėje nesveikas) [2]

Šios jungtys perneša informaciją tarp ląstelių atidarydamos/uždarydamos jonų kanalą tarp ląstelių, kurį sudaro koneksonai, kurie sudaryti iš 6 apjungtų koneksinų. Keičiant kanalo krūvį, šis uždaromas arba atidaromas perduoti jonus. Įprastu atveju koneksonai teisingai atsidaro ir užsidaro, kuomet reikia, bet įvykus kokiai nors mutacijai koneksino baltymuose – informacijos perdavimo procesas sutrinka ir to pasekoje atsiranda mutacijos sukeltos genetinės ligos [19], neurologinės ligos [21], vėžinės ligos [22], nes organizmas tinkamai negebant perduoti informacijos tarp ląstelių – nebegeba tinkamai aktyvuoti imuninės, neurologinės sistemos, (žr. 1 pav, dešinėje) kuriame simuliuojamas plyšinių jungčių nebegebėjimas atsidaryti pridėjus magnio jonų į sistemą [2].

1.2. Dažų sklaidimo koeficiento įvertinimas ląstelėje

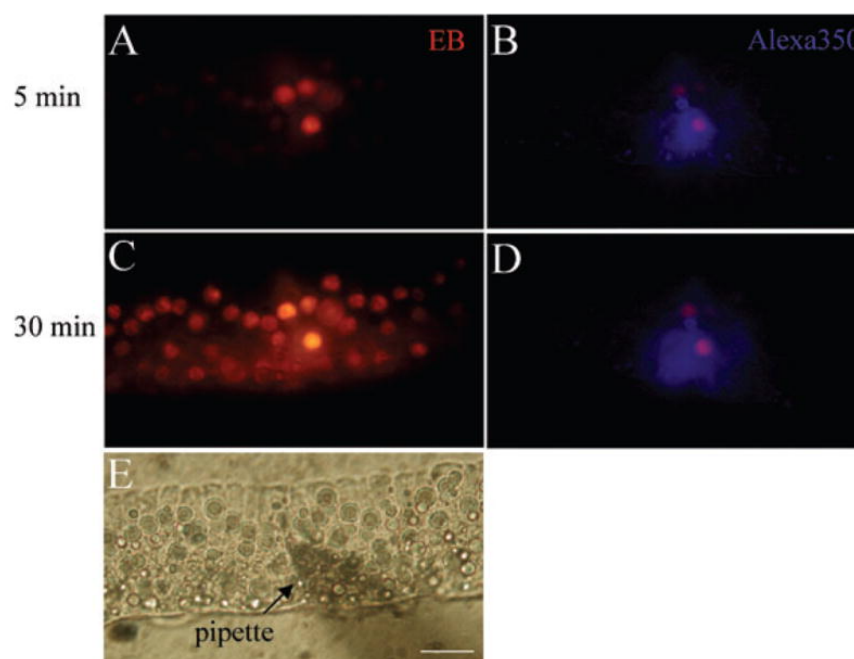
Yra specialūs dažai, kurie atitinkamai gali įsiskverbti į ląstelę per šios membraną, kiti per plyšines jungtis, o kitus kai kuriuos būtina net į pačią ląstelę su mikro-adata įterpti, apeinant šios membraną. Šie dažai atitinkamai nuo šviesos bangos ilgio – švyti ląstelėje, sureagavę su Godžio aparatu arba citoplazma.

Yra hipotezė, jog dažų sklaidimo koeficientas ląstelėje yra susijęs su ląstelės transfekcija – kuo kokybiškesnė įvykus ląstelės transfekcija, tuo dažų sklaidimo koeficientas didesnis ir to pasekoje ląstelės šviesumas, apšvitinus atitinkama tiems dažam jautria šviesos banga – ryškesnis. Taigi, norint įvertinti ląstelės dažų sklaidimo koeficientą galime apskaičiuoti kiekvienos ląstelės šviesumo ryškumą.

Šis įvertinimas, yra hipotezė, turėtų leisti nusakyti ląstelės skirtingus koneksinus, šių transfekcijos, tarpląstelinio ryšio kokybinius rodiklius. Pavyzdžiui: CX26 ir CX30 koneksinai turi skirtingą dažų

sklidimo profilį, kuris parodo, jog šios dvi ląstelės atlieka dvi skirtingas funkcijas žmogaus ausies kanale, o šių funkcijai sutrikus – gali susidaryti nesimptominis kurtumas [8].

Galime matyti kaip atrodo dažų sklidimas ląstelėse naudojant skirtingus transfekcijos blokatorius (žr. 2 pav.).



2 pav. Dažų sklidimas, į ląsteles įterpus transfekcijos blokatorius [8]

Kaip matome iš 3 pav., atitinkamai pagal įterptą transfekcijos blokatorių – dažų sklidimas ląstelėje keičiasi, taip galime užblokuoti atitinkamus koneksinus jautrius vieniems blokatoriams ir stebėti kitus, išfiltruoti nenorimus arba atrasti užblokuotų koneksinų įtaką ląstelėse. Laikui einant – atitinkami dažai išryškina neužblokuotus koneksinus (žr. 2 pav.), nes šie geriau įsiskverbia į ląsteles.

Formulė, norint apskaičiuoti ląstelės dažų sklidimo koeficientą:

$$F(t) = f \cdot C(t) + f_0.$$

Kur f yra konstanta nurodanti ląstelės šviesumo intensyvumą, f_0 yra foninis šviesumas, o $C(t)$ yra dažų koncentracijos rodiklio išvestinė laike.

1.3. Tiriamos ląstelės

Dabartinės technologijos leidžia dirbtinai, priverstinai tarp daug ląstelių sukurti plyšines jungtis naudojant procesą vadinamą transfekcija. Šio proceso metu užaugintos ląstelės yra elektrolizuojamos pasitelkiant mikro-adata ir taip tarp skirtingų ląstelių susikūrus krūviui gali susikurti plyšinės tarpląstelinės jungtys. Būtent transfektuotos ląstelės šiame darbe ir bus tiriamos, šių skirtumai su netransfektuotom, automatinis atpažinimas ir duomenų ištraukimas automatizuojamas. Transfektuojamos ląstelės gali būti bet kokios.

Tyrimams buvo naudotos „HeLa“ ląstelės (žmogaus gimdos kaklelio vėžio ląstelės), ekspresuojančios Cx26 ir Cx30 koneksino baltymo formas C gale sulietas su žaliai ar raudonai fluorescuojančiu baltymu. HeLaCx26-EGFP ir HeLaCx30-dsRed ląstelių transfektantai gauti naudojant pCx26EGFP-P ir pCx30dsRed-P plazmidinius vektorius bei „Lipofectamine® 2000“

komercinį ląstelių transfekcijos reagentą. Ląstelės kultivuotos DMEM terpėje, turinčioje 10 % jaučio vaisiaus serumo (FBS), penicilino-streptomicino mišinio (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino; Gibco Laboratorines) ir puromicino 1 µg/ml (transfekuotoms ląstelėms palaikyti).

Ląstelių švytėjimo įvertinimui: fluorescencijos signalai gauti naudojant „ORCA“ skaitmeninę kamerą su integruota „UltraVIEW“ programa, skirta vaizdinimui ir analizei. Fluorescencinis vaizdinimas buvo taikytas siekiant nustatyti dažo DAPI patekimą į HeLaCx26-EGFP ar HeLaCx30-dsRed ląsteles per puskanalius suformuotus iš koneksino baltymo. Fluorescencinis vaizdinimas taip pat panaudotas ląstelių transfekcijos efektyvumui įvertinti ir bendram puskanalių skaičiui ląstelėje nustatyti. Fluorescencijos sužadinimui buvo naudojamas „Sutter“ filtrų ratas.

Elektrofiziologijos tyrimams buvo naudotos to pačio koneksino ląstelės Cx26 ir Cx26-A49E variantas. Šios užaugintos ant stiklinių indelių buvo perkeltos ant eksperimentų įrangos – kurioje Olympus IX70 mikroskopas su fluorescencijos atvaizdavimo sistema. Visi eksperimentai daryti kambario temperatūroje. Naudojamas „whole-cell patch-clamp“ metodas norint išmatuoti srovę einančią per ląstelę – vienas elektrodas ląstelių mėginėlio tirpale, o kitas įbedamas į ląstelę. Srovė buvo matuojama 5kHz dažniu su 1kHz žemo dažniu filtru. Puskanalių matavimai buvo gauti iš paduotų įtampos laiptelių ir rampų, kurie tekėjo per ląstelę.

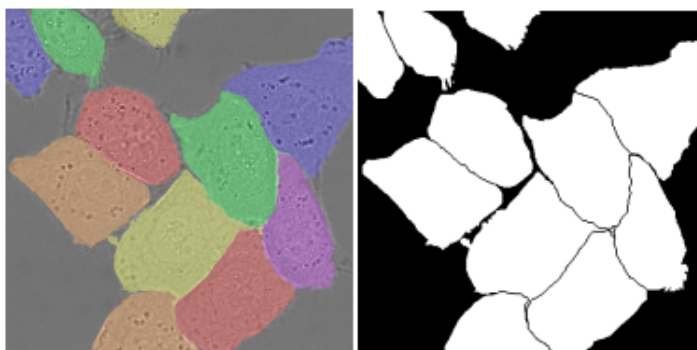
1.4. Dirbtinio intelekto metodai ląstelių atpažinimui, klasifikavimui

Norint įvykdyti vaizdo segmentaciją ir atskirti, sužymėti kelis objektus vaizde – įprastai naudojami vaizdo segmentavimo algoritmai kaip „YOLO“, „Mask-RCNN“, „CenterMask“ [15], „CellSighter“ [16], „DilatedNet“ [17] ir kiti. Modeliai kaip „YOLOv11“ (senesni nei „YOLOv8“ gali tik apibrėžti dominantį kvadratą aplink objektą) ir „Mask-RCNN“ geba apibrėžti kiekvienos ląstelės kontūrą, kuomet standartinis „U-NET“ tegali pažymėti dominančius regionus – negeba atpažinti atskirų objektų.

Visų literatūroje aprašytų modelių tikslumas svyruoja, bet didžiausia problema atsiranda bandant juos tiesiogiai sulyginti vienas su kitu – šių tikslumo tyrimai ir naudojimas praktikoje skiriasi, naudojamos skirtingos ląstelės, skirtinga vaizdų gavimo įranga, skirtingos metrikos (pikselių tikslumas U-NET, kuomet „YOLOv11“ galime objektų atpažinimo tikslumą nustatyti), taigi pasirinkti optimaliausią modelį tampa sudėtinga. Pavyzdžiui „U-NET“ gali pasiekti 95% tikslumą kuniško žiurkėno kiaušidžių ląstelių „CHO“ atpažinime [18], „CenterMask“ pasiekia 95% F1 rodiklį „LiveCell“ duomenyse, kuomet tuose pačiuose „LiveCell“ duomenyse modifikuotas U-NET geriausiai pasiekia tik 60.52% F1 rodiklio [15], o „ICOS IHC“ ląstelėse „U-NET“ su „ResNet101“ pagrindu (angl. *backbone*) pasiekia 98.93% tikslumą, kuomet „Detectron2“ su „ResNet50“ pagrindu pasiekia 98.83% pikselių tikslumą. Taigi tarp tyrimų skiriasi tiek duomenys, tiek modelių modifikacijos, tiek pačios nuotraukos, ląstelės. O kai kurie modernūs modeliai kaip „YOLOv11“, „Detectron2 RCNN50“, „SAM“ [23] – mažai minimi, tyrinėti literatūroje, dauguma literatūros koncentruota į „U-NET“ ir jo modifikacijas, taigi sunku palyginti tą patį „U-NET“ su kitais modeliais literatūroje.

Vienas iš labiausiai naudojamų vaizdo segmentavimo modelių literatūroje – „U-NET“ [13][6], šio modifikacijos [25][26]. Šis dažnai naudojamas biomedicinoje dėl savo lankstumo, modulinio dizaino ir sėkmės skirtingų biomedicinos vaizdų segmentavime [14], yra daug jo modifikacijų specifiniams segmentavimo uždaviniams spręsti [20]. „U-NET“ tikslumas skiriasi tarp skirtingų ląstelių tipų ir svyruoja nuo Viena iš pagrindinių šio modelio problemų – standartiškai jis negali segmentuoti

skirtingų objektų – žymi tik dominančius regionus, kurie visiems objektams gali priklausyti, o tikslumas matuojamas naudojant IoU metriką pikselių persidengimui.

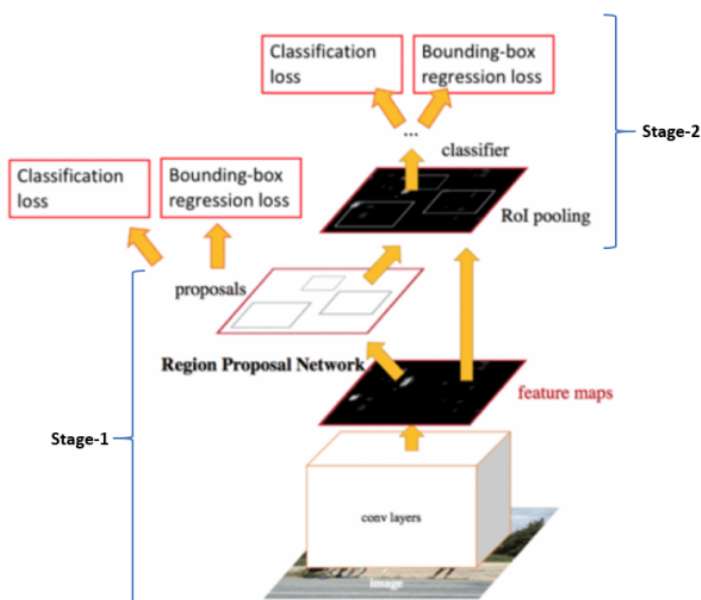


3 pav. „U-NET“ modelio išėjimo kaukė dešinėje ir kairėje apmokymui sužymėtos ląstelės [13]

Kaip matoma iš 3 pav. – „U-NET“ išvedime atiduoda juodą/baltą kaukę, kurioje juoda spalva žymimas yra fonas, o balta yra dominančios ląstelės. Šiuo atveju ląstelių kontūrai atsiskiria ir tikėtina būtų įmanoma identifikuoti kiekvieną ląstelę atskirai, bet tai ne visada nutinkantis scenarijus, dažnai dominantys regionai persipina, susilieja. Tuomet šiuos atskirti naudojamos tokios modifikacijos kaip „watershed“ metodas [24].

„U-NET“ veikimo principas yra tas, jog šio architektūra turi susitraukiantį ir trumpėjantį kelių enkoderiams ir dekoderiams, kas leidžia iš vaizdų lengviau, detaliau ištraukti ir atpažinti bruožus (angl. *features*), sugeneruoti segmentacijos žemėlapi.

Norint segmentuoti objekto kontūrą – vienas iš šiais laikais plačiausiai naudojamų yra „Mask-RCNN“ algoritmas (žr. 4 pav.).



4 pav. „Mask-RCNN“ modelio algoritmas [9]

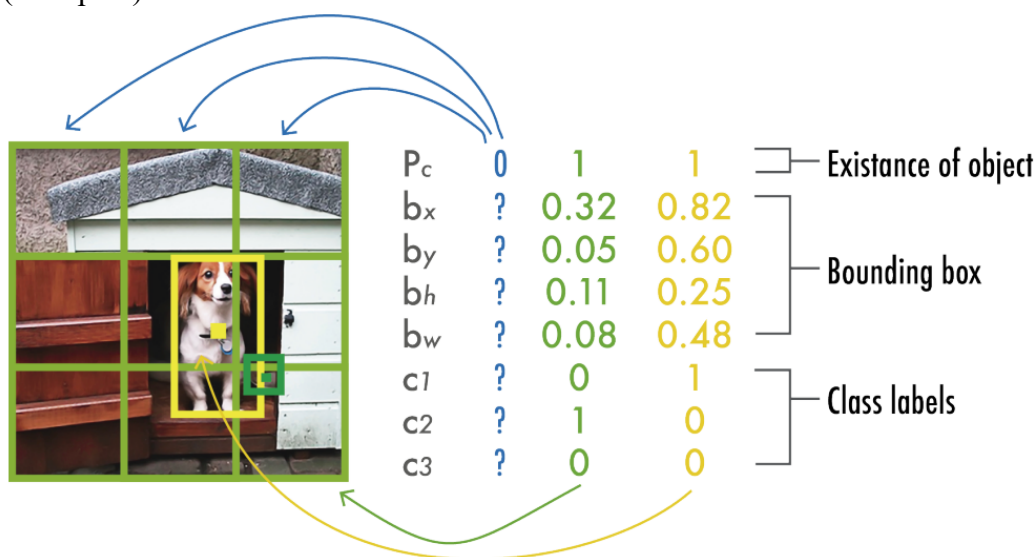
„Mask-RCNN“ veikimo principas – pirmame etape yra konvoliuciniai sluoksniai ir regionų pasiūlymo tinklas. Regionų pasiūlymo tinklas yra regionai bruožų žemėlapis (angl. *feature map*), kuriuose tikėtina yra objektas.

Antrame etape modelis suranda objektus vaizde naudojant aprėpties langelių metodą – randa skirtingo dydžio kvadratinus regionus, kuriuose tikrai yra objektas.

Trečiame etape iš aprėpties langelio regiono segmentuojamas objektas – naudojama FCN mažo tinklo architektūra apmokyta išgauti dominančių regionų nuotraukos kaukes.

Objektinių segmentacijų žymėjimui įprastai naudojamas COCO [5] formatas. COCO formato segmentacijos leidžia atskirti kiekvieną objektą, net tos paties klasės, kaip atskirą objektą.

Taip pat yra modeliai naudojantys aprėpties langelius (angl. „bounding box“). Kai kurios architektūros (nebūtinai medicinoje) naudoja aprėpties langelio modelius surasti ir iškirpti iš nuotraukos vietą, kurioje norimas segmentuoti objektas [3]. Plačiausiai naudojamas aprėpties langelių modelis yra „YOLO“. Nors šis nuo „YOLOv8“ gali ir segmentuoti objektus naudojant „CSPDarknet53“ backbone su „C2f“ moduliu, bet pradinės jo versijos prasidėjo nuo aprėpties langelių objektų atpažinimo [28]. Standartinio „YOLO“ naudojant aprėpties langelių metodą veikimo pavyzdys (žr. 5 pav.).



5 pav. „YOLO“ modelio aprėpties langelio segmentavimo veikimo principas [28]

Iš 5 pav. matome, jog „YOLO“ supjausto nuotrauką į kvadratus ir šiuose ieško ar objektas egzistuoja, tuomet tikėtinai radęs objektą tame langely – suranda jo galimo aprėpties langelį ir tuomet nuspėja šio klasę..

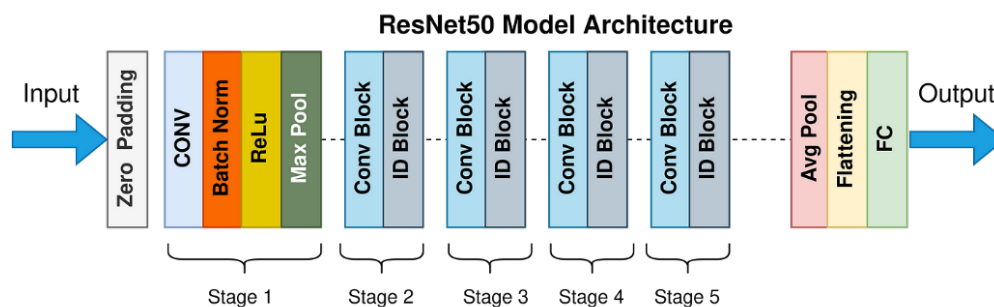
Yra naudojamos ir kompleksiškesnės architektūros kaip „BCNN“ naudojimas kartu su „DilatedNet“ įvairių ląstelių klasifikavimui nuotraukoje arba „AlexNet“ [4].

„AlexNet“ architektūros principas – 5 konvoliuciniai ir 3 pilnai apjungti konvoliuciniai sluoksniai bei ReLU „rectifier unit“ [4]. „AlexNet“ architektūra pakankamai atspari permokymui ir geba atskirti didelius kiekius skirtingų kategorijų.

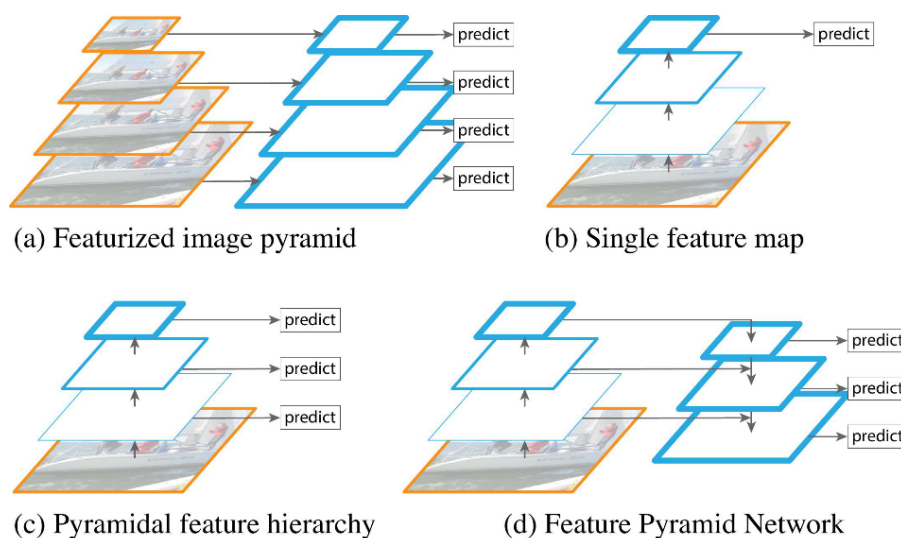
„BCNN“ tinklo veikimo principas – ląstelės nuotrauka yra paduodama į vieną „CNN“ ir šio išėjimai yra dauginami su jo transpozicija naudojant kiekvienos vaizdo lokacijos išorinį produktą ir yra apjungiami norint gauti bilinearų vektorių [4]. Galiausiai tai pereina per klasifikacijos sluoksnį, kuris sudaro spėjimus [4].

Taip pat yra viena iš populiariausių vaizdo segmentavimo atpažinimų bibliotekų su dideliu tikslumu ir našumu: „Detectron2“, kuri išsivystė iš „mask R-CNN“.

„Detectron2“ biblioteka, leidžia segmentuoti vaizdus pasirenkant norimo modelio konfigūraciją, leidžia COCO formato sužymėjus ir turi kitų funkcijų kaip papildomų rezultatų, segmentavimo duomenų išvedimas. Tipiškai naudojama, įprastai didžiausio tikslumo, „mask_rcnn_R_50_FPN_3x“ konfigūracija. Kas reiškia: „Mask-RCNN“ modelis, „Resnet 50“ 50 sluoksnių (48 konvoliucijos sluoksniai ir 1 „MaxPool“ su „AvgPool“ sluoksniai) „ResNet“ bruožų ištraukimo tinklas (žr. 6 pav.), „FPN“ – „feature pyramid network“ (žr. 7 pav.) architektūra skirta pirmame etape efektyviau sukurti bruožų žemėlapių skirtingo dydžio objektams..



6 pav. ResNet50 architektūra [10]



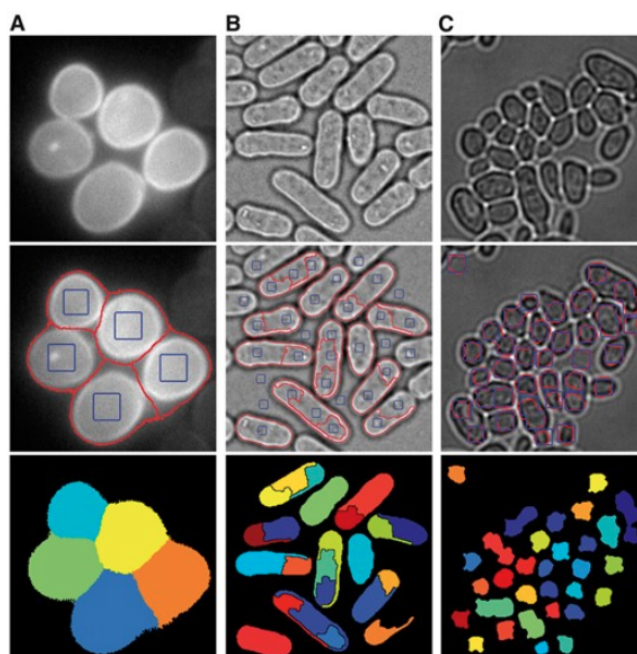
7 pav. FPN architektūra [11]

„Detectron2“ privalumas, kad bene draugiškiausia vartotojui ir itin gerai dokumentuota biblioteka, vis atnaujinama, tobulinama, kuri naudojama ne tik biologiniuose tyrimuose, nėra nišinė, yra lengva adaptuoti skirtingoms užduotims.

1.5. Metodai gerinti ląstelių atpažinimo tikslumą

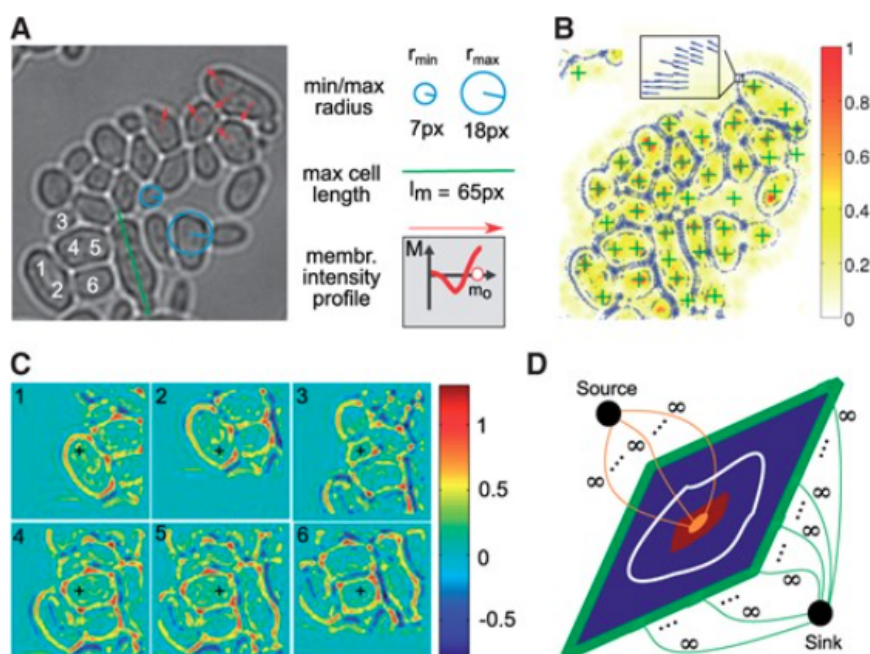
Norint pagerinti ląstelės kontūro apvedimą gali būti naudojamos įvairios vaizdo transformacijos arba patikslinami sužymėti modelio apmokymo duomenys, jei šie nevisiškai tiksliai sužymėti.

Įprastiniuose vaizdo segmentavimuose yra ląstelių membranų kontūro sužymėjimo iššūkis – dažnai ta pati ląstelė išskaidoma į kelias, kaip ląstelė apvedamas tik ląstelės branduolys ar aplink ląstelę esantis švytėjimas suklaidina ląstelės kontūrą (žr. 8 pav.) [12].



8 pav. Netikslus ląstelių žymėjimas naudojantis standartiniais segmentacijos metodais, be duomenų transformacijų [12]

Straipsnyje [12] aptariamas metodas gerinti segmentacijos tikslumą: naudoti „MPCS“. Kas leidžia nurodyti biologiškai intuityvius parametrus nustatyti membraną segmentacijoje ir tuomet naudojant signalų analizę – lyginti kontūrą su, kas tikėtina turėtų būti membrana, pagal signalą (pikselių matricos vertes). Taip koreguojant gautos segmentacijos formą. Šio veikimo principas yra tiesiog atrasti ląstelės membraną, kontūrą pagal pikselių matricos skirtingumą, tikėtiną ląstelės plotį (lyg pločio riba, kad per didelio arba mažo vaizdo ploto nepaimtų kaip ląstelės) (žr. 9 pav.)



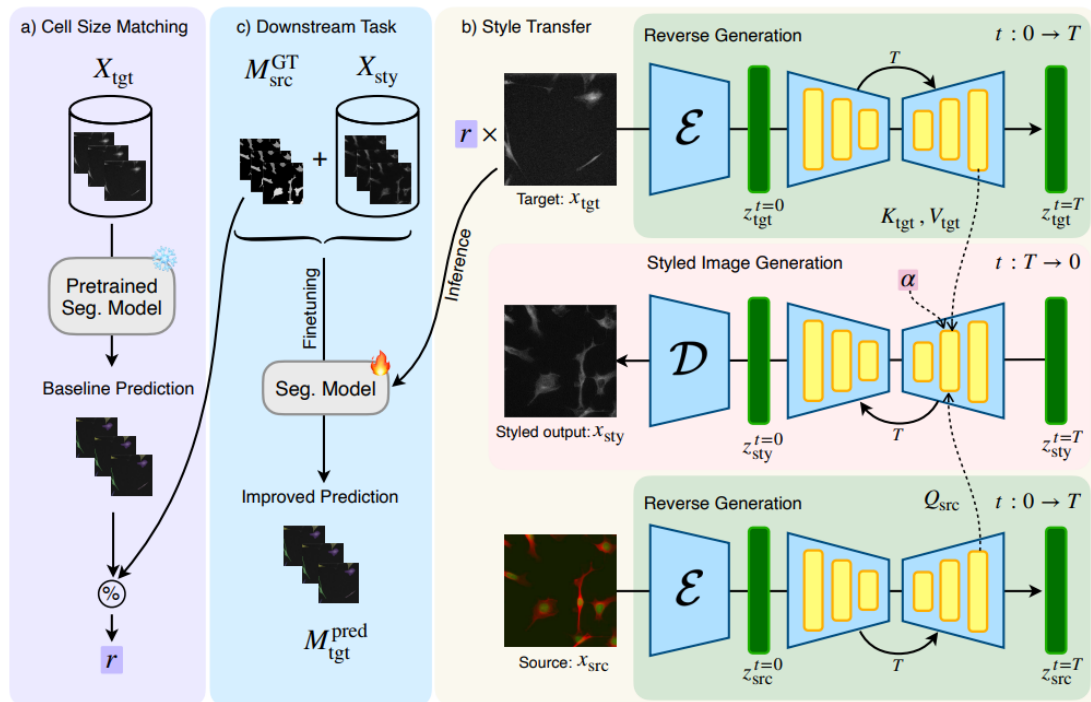
9 pav. Ląstelių kontūro atpažinimo metodas [12]

Kaip matoma iš 9 pav. – nusistatome tikėtinus maksimalius ir minimalius ląstelių pločius pikseliais, tada nusistatome membranos pikselių „šviesumo/intensyvumo“ vertės membranos profilį (kokiose ribose profilis gali kisti arba kaip) ir tuomet naudojamas gradientinis „Hough“ algoritmas ir gauname

vaizdo ryškumo maksimumus, minimumus. Naudojant šiuos ir membranos intensyvumo profilį – galime aptikti, apvesti ląstelės kontūrus [12].

Jeigu jau turime sužymėtas ląsteles ne itin tiksliais kontūrais – galime lengvai išgauti visus ląstelių parametrus, skirtus nurodyti kontūrų paieškai ir taip panaudoti šį tikslinimo metodą norint patikslinti apvestų ląstelių kontūrus, kurie reikšmingi dažų sklaidimo skaičiavimuose ir transfekcijos įvertinimuose.

Gerinti tikslumui taip pat pasiteikiamos vaizdų generavimo technologijos – turėdami pirmines sužymėtas segmentacijas, nuotraukas, naudojant dirbtinio intelekto modelius galime susintezuoti kitokį nuotraukos/ląstelės stilių ant jau esamų duomenų ir papildomai mokyti modelį naudojant nesužymėtas nuotraukas[27], taip transformuodami nuotrauką ir modelio mokymo procese šį pritaikant įvairiems ląstelių tipams. Šio „CellStyle“ modelio architektūra (žr. 10 pav.).



10 pav. „CellStyle“ modelio architektūra. a) ląstelių dydžio sulyginimas; b) stiliaus perkėlimas nuo X_{src} į X_{sty} ; c) stilizuotų nuotraukų naudojimas modelio mokymo procese [27]

Kaip matoma iš 10 pav.: galime generuoti sintetines nuotraukas ant nesužymėtų duomenų perkeliame naujų nuotraukų stilių ant jau sužymėtų – taip paspartinant tiek mokymo procesą ir pagerinant modelio tikslumą įvairesniems duomenims.

Taip pat yra metodai, kuriuose naudojami keli modeliai, pavyzdžiui apjungiant „U-NET“ ir „Mask-RCNN“ modelius, gaunami geresni tikslumo rezultatai: mAP padidėja 0.04, nuo 0.28 iki 0.32 [30]. Tai pavyksta, nes „U-NET“ ir „Mask-RCNN“ klysta skirtingose vietose ir naudojant vieną ar kitą modelį jų stipriosiose pusėse pasiekiamas aukštesnis tikslumas.

1.6. Naudojamos tikslumo metrikos

Norint įvertinti modelių efektyvumą nepakanka tiesiog įvertinti šio tikslumo metrikos, taipogi skiriasi ir pikselinių modelių kaip „U-NET“ metrikų specifika nuo objektnių kaip „Detectron2 Mask RCNN50“.

Norint išgauti bet kokias modelio metrikas reikia pirmiausia turėti skaičius kiek segmentacijų tiksliai atpažinta, kiek šių viso buvo, kiek suklysta (nuspėjant ne tą klasę esamai segmentacijai) ir kiek haliuconuoja (kuomet spėjimo regione iš tikrųjų neegzistavo joks norimas nuspėti objektas).

- TP – „True Positive“ teisingai sužymėta segmentacija;
- TN – „True Negative“ segmentacija egzistuoja, bet modelio nuspėta klasė klaidinga;
- FN – „False Negative“ validavimo duomenyse esanti segmentacija nerasta testuojant;
- FP – „False Positive“ testuojant, perteklinė (haliuconacinė) segmentacija, neegzistuojanti tiesos validavimo duomenyse;
- Persidengimo plotas – tiesos ir modelio spėjamos segmentacijos persidengiantis plotas
- Suminis plotas – tiesos ir modelio spėjamos segmentacijos suminis plotas (lyg patapus viena segmentacija);

Verta paminėti: metrikose, pavyzdžiui TP, pikseliniuose modeliuose kaip „U-NET“, vietoj teisingai sužymėtos segmentacijos objekto skaičiuojame kiek teisingai pikselių sužymėta visoje nuotraukoje. Kuomet objektiniai modeliai, viršijus tam tikrą „IoU“ yra įskaitomi kaip teisinga segmentacija, taip skaičiuojame kiek teisingai nuspėtų objektų nuotraukoje.

Įprastai literatūroje naudojamos metrikos [29]:

- IoU – „Intersection over Union“ metrika apskaičiuojanti dviejų segmentacijų persidengimo rodiklį;

$$IoU = \frac{\text{Persidengimo plotas}}{\text{Suminis plotas}};$$

- AUC – „Area Under Curve“ modelio kokybės kriterijus. Kuomet rodiklis 0.5, modelis spėlioja, o kuomet 1.0 puikiai atpažįsta, atskiria klases

$$AUC = 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{FP}{FP+TN} + \frac{FN}{FN+TP} \right);$$

- Tikslumas – „Accuracy“ kiek segmentacijų/pikselių sutampa iš visų santykis

$$\text{Tikslumas} = \frac{TP}{TP+FP+TN+FN};$$

- Jautrumas - „Recall“ kiek iš visų validavimo (tiesos) segmentacijų iš tikrųjų pavyko rasti.

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP+FN};$$

- Preciziškumas – „Precision“ kiek iš visų segmentacijų, kuomet segmentacijos regionas yra tiek validavime tiek modelio spėjime – teisingos klasės

$$\text{Preciziškumas} = \frac{TP}{TP+FP};$$

- F1 rodiklis – „F1 score“ arba dar žinomas kaip „DSC – Dice Simillarity Coefficient“

$$F1 \text{ rodiklis} = \frac{2 \times \text{Preciziškumas} \times \text{Jautrumas}}{\text{Preciziškumas} + \text{Jautrumas}};$$

- Specifiškumas – „Specificity“ gali nurodyti kiek pikselių teisingai atpažinta kaip foninių.

$$\text{Specifiškumas} = \frac{TN}{TN+FP}.$$

Kaip ir teisingų pikselių/segmentacijų skaičiavimuose, taip ir su apskaičiuotomis metrikos – tiesiogiai lyginti objektinių segmentacijų metrikas su pikselinėmis negalima, nebent visose nuotraukose yra tik vienas vienintelis kiekvienai klasei nuspėti objektas – tuomet galima palyginti tik IoU ir AUC.

2. Ląstelių atpažinimo sistemos specifikacija: metodai, įrankiai ir kiekybiniai rodikliai

Tikslas – rasti efektyviausią modelį ląstelių atpažinimui ir pasitelkiant dirbtinio intelekto technologijas paspartinti ląstelių, tarpląstelinių plyšinių tarpląstelinių jungčių tyrimus. Iš gautų segmentacijų ištraukti kiekybinius duomenis ir atlikti dažų sklaidimo ir transfekcijos, fluorescencijos rezultatų analizę.

Užduoties siekis yra sukurti modelį, kuris automatiškai sužymi visas ląsteles ir šias segmentuoja pagal tai, kurios gyvybingos. Toliau naudojant segmentacijos duomenis atlieka papildomus duomenų išvedimus kaip kiekvienos ląstelės šviesumas, plotas. Galiausiai sukurta architektūra gebės įvertinti nuotraukoje esančias ląsteles ir nusakyti ar ląstelė transfekavo ar ne. Galutinė architektūros išvestis gali būti naudojama statistinėse analizėse.

Toliau nustatome užduoties reikalavimus, procesą, renkamės dirbtinio intelekto modelius ir bandome nustatyti ar galime atpažinti ląsteles nuotraukoje bei šias suklasifikuoti. Šias suklasifikavus bus išskaičiuojami kokybiniai ir kiekybiniai ląstelių rodikliai.

Funkciniai reikalavimai:

- Ne mažesnis nei 70% gyvų ląstelių segmentavimo tikslumas;
- Ne didesnis nei 10% ląstelės ploto nuokrypis;
- Nuotraukoje rodoma minimali ląstelės segmentacijos informacijoje (langelis su šviesumu, segmentacijos id...);
- Modelis turėtų išvesti kaukes ir „COCO json“ failą kiekvienai segmentuotai nuotraukai, kad gautus tarpinius rezultatus būtų galima naudoti tolimesnėje duomenų analizėje;
- Modelis turėtų „csv“ formatu išvesti kiekvienos ląstelės bent šviesumą, foninį šviesumą, šių skirtumą, ląstelės plotą;
- Šviesumo skaičiavimai segmentacijose turi būti atliekami visame plote, tiek ir šviesiausiam apskritime, turi būti pateikti kvartilai;
- Visi tarpiniai validavimo rezultatai saugojami, norint įvertinti modelio veikseną, tikslumą;

Nefunkciniai reikalavimai:

- Galimybė pačiam ekspertui patogiai apmokinti modelį sužymėtomis nuotraukomis;

Atsižvelgiant į reikalavimus, užduočiai naudojama „Python“ programavimo kalba, kadangi šiai programavimo kalbai yra itin daug bibliotekų vaizdo segmentacijai atlikti.

„Python“ aplinkai naudojama „Jupyterlab“ aplinka, siekiant užtvirtinti programos, rezultatų pastovumą ir sparčiau atlikti užduoties procesus – „Jupyterlab“ gali išsaugoti kiekvieno kodo bloko būseną, taigi galime taupyti laiką, kiekvieną kartą neperleidžiant visų kodo bloko per naują.

2.1. Principinė modelių tyrimo schema

Kadangi, pagal literatūros analizę, pasirinkti tinkamiausią modelį sudėtinga – bus tiriami keli modeliai:

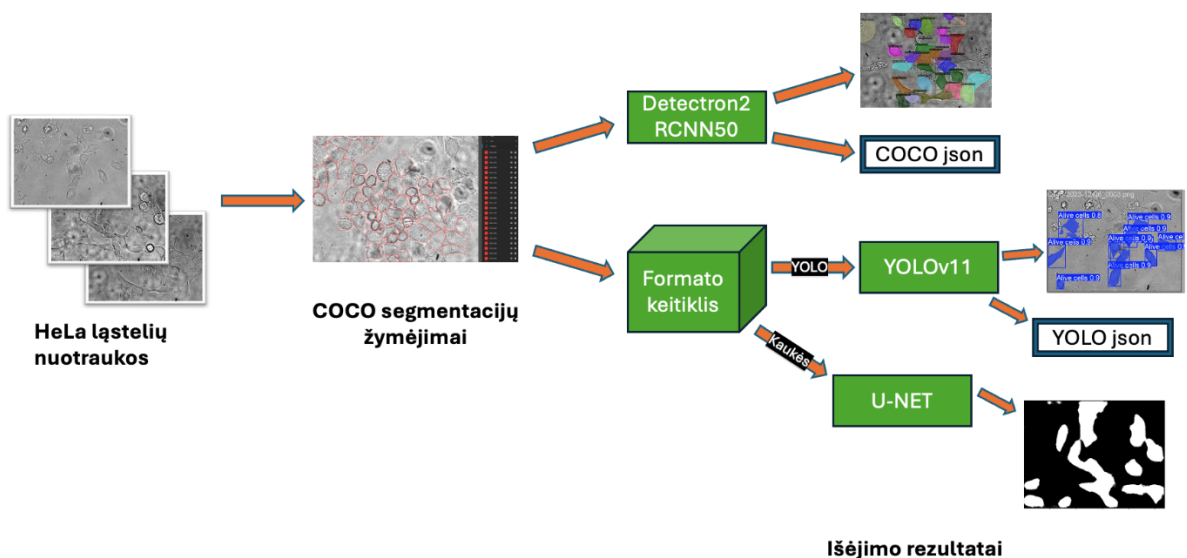
- „Detectron2 Mask-RCNN“ - yra vaizdo segmentavimo biblioteka, kurioje naudosime esantį „mask_rcnn_R_50_FN_3x“ modelį, kuris pagal „Detectron2“ dokumentaciją yra įprastai tiksliausias bendriniams vaizdams [7].;

- „YOLOv11“ – naudosime objektų segmentacijos modelį, ne kvadratinio regiono;
- „U-NET“ - be modifikacijų, siekiant sulygtinti su esamais literatūroje.

Kadangi visų trijų tiriamų modelių mokymo ir išėjimo formatai skiriasi, taip pat „U-NET“ yra pikselinis modelis, o ne objektinis:

- „YOLOv11“ ir „Detectron2 Mask-RCNN50“ modeliui apskaičiuosime objektinio tikslumo metrikas ir pikselinio tikslumo metrikas;
- „U-NET“ skaičiuojamos tik pikselinio tikslumo metrikos, šias galima sulygtinti su „YOLOv11“ ir „Detectron2 Mask-RCNN50“ pikselinio tikslumo metrikomis;
- Ląstelių žymėjimui naudojamas COCO formatas, kuriam pasirenkamas „Makesense AI“ [31] įrankis, kuris lengvai visiems prieinamas internetu, taigi tai leidžia supaprastinti duomenų dalijimąsi, peržiūrą su ekspertais, taipogi šį formatą galima lengvai konvertuoti į kitus – kaukių ir YOLO.

Modelių tyrimo principinė schema (žr.11 pav.)

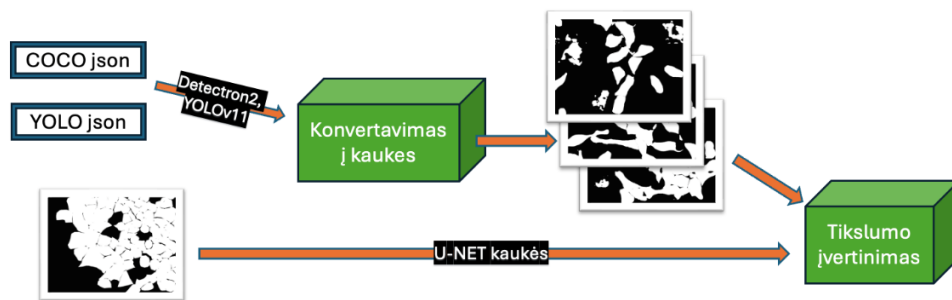


11 pav. Principinė modelių tyrimų schema

Pagal 11 pav:

- 1) Pirmiausia padaromos HeLa ląstelių nuotraukos LSMU tyrimų laboratorijoje;
- 2) Nuotraukos sužymimos COCO formatu naudojant „Makesense AI“ įrankį;
- 3) „Detectron2“ geba tiesiogiai mokytis naudojant COCO formatą, kuomet YOLOv11 modeliui formatą konvertuojame į YOLO, o U-NET modeliui į kaukes;
- 4) Gaunami rezultatų išėjimai – segmentacijos COCO ir YOLO formate bei U-NET kaukės formate;

Gauti rezultatai sulyginami, o norint gauti pikselinius tikslumus, tiesiog konvertuojami YOLO ir COCO formatai į binarines kaukes – tai leidžia tiesiogiai sulygtinti šių modelių rezultatus su U-NET (žr. 12 pav.).



12 pav. Principinė modelių pikselinio tikslumo išvedimo schema

Pagal 12 pav. matoma, jog „YOLO“ ir „Detectron2“ COCO formatai konvertuojami į kaukes, o „U-NET“ išvestis naudojama tiesiogiai, siekiant apskaičiuoti pikselinio tikslumo metrikas.

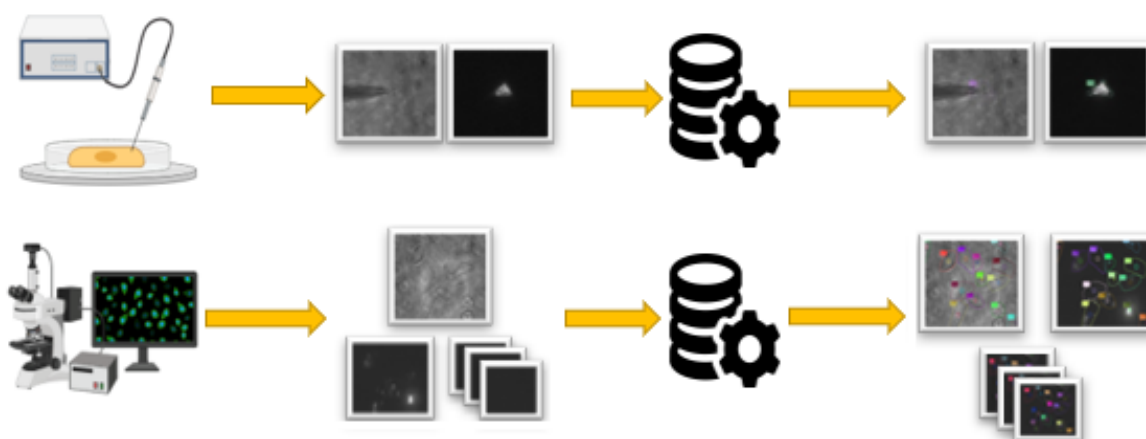
Apmokyto modelio tikslumo įvertinimams naudojamos metrikos:

- Preciziškumas;
- Jautrumas;
- F1 metrika;
- Tikslumas;

2.2. Principinė praktinio tyrimo schema

Pirmiausia atliekami tyrimai ir padaromos jų nuotraukos. Tuomet pateikiamos nuotraukos apmokintam modeliui apdoroti ir šis apdoroja kiekvieną eksperimentą. Nuspėjama ar ląstelė transfekavo ar ne, randami šviesiausi taškai, apskritimai, kvartiliai ir kiti kiekybiniai parametrai. Galiausiai iš modelio išvesties rezultatų braižomi ląstelių šviesumo grafikai per laiką (žr. 29-31 pav.) ir sužymima kiekviena šviesumo matavimo nuotrauka, naudojant tipiška apšviestų ląstelių nuotraukų segmentacijos duomenis (žr. 28 pav.).

Principinė supaprastinta modelio naudojimo, praktinio tyrimo schema pateikta 13 pav.



13 pav. Principinė tyrimų schema (viršuje – elektrofiziologiniai matavimai, o apačioje – fluorescenciniai tyrimai)

Norint apdoroti elektrofiziologijos tyrimų rezultatus – reikia ląstelių nuotraukos su pipete, be pipetės ir tamsoje apšvitintos tam tikro bangos ilgio šviesa. Gauname transfekavusios ląstelės kokybinius, kiekybinius parametrus ir sužymėtas nuotraukas. Papildomai įterpiami rankiniai srovės matavimo

rezultatai, siekiant šiuos sulyginti su automatiniu būdu gautais fluorescencijos rezultatais – tikrinama ar srovė koreliuoja su švytėjimo intensyvumu.

Norint apdoroti dažų sklaidimo matavimų rezultatus – reikia vienos tipinio apšvietimo ląstelių nuotraukos, vienos tamsoje apšvitintos ir tamsoje neapšvitintų darytų kas 30s, 30 min intervale. Gauname visų gyvų ląstelių kokybinius, kiekybinius parametrus ir sužymėtas nuotraukas, kiekvienos nuotraukos ląstelių šviesumo intensyvumo kitimą per laiką.

3. Segmentavimo modelių eksperimentinė analizė

3.1. Duomenų rinkimas

Renkami duomenys LSMU kardiologijos institute. Laboratorijoje užauginamos HeLa tipo ląstelės. Tuomet pagal tyrimo tipą daromos nuotraukos dažų laidumo eksperimentams arba elektrofiziologijos eksperimentams:

- a) Dažų laidumo eksperimentams: Cx26-A49E varianto 10 nuotraukų ir Cx26 16 nuotraukų. DAPI švytėjimo nuotrauka: sužadinimo filtras: 480/10 nm, o emisinis filtras 510/5 nm. DAPI dažų kitimo per laiką nuotraukos („tamsoje“): 1 nuotrauką kas 30 s ir taip 30 min, sužadinimo filtras 360/10 nm, emisinis filtras 450/40 nm.
- b) Elektrofiziologijos eksperimentams: Cx26 47 eksperimentai ir Cx26-A49E 42 eksperimentai. Padaromos kelios nuotraukos kiekvienam eksperimentui: viena su pipete tipiniame apšvietime (kad žinoti į kuria ląstelę buvo įsmeigta adata srovei praleisti), viena be pipetės tipiniame apšvietime ir viena proteino sužadinimo būsenoje (DAPI švytėjimas).
- c) Modelio mokymui, testavimui, validavimui: 72 nuotraukos su 1618 sužymėtų ląstelių naudojamos mokymui, kuomet 32 nuotraukos su 139 sužymėtom ląstelėm naudojamos validavimui, o testavimui – 26 nuotraukos su 320 sužymėtų ląstelių.

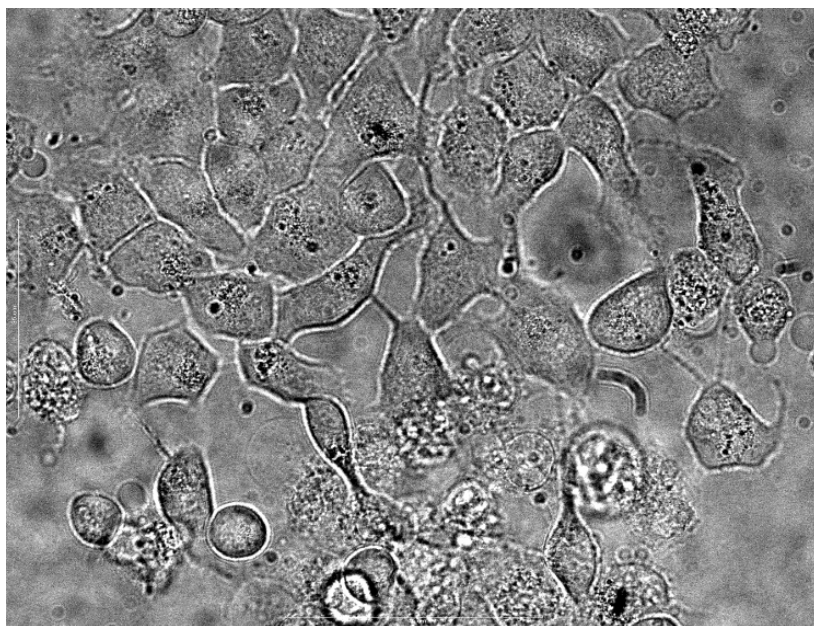
Kiekviena nuotrauka yra juodai balta (bespalvė), rezoliucija 1344x1024, o pikselio dydis 0.1075 nm. Pikselių šviesumo vertės tarp 0-255. Papildomas nuotraukų apdorojimas, transformacijos nėra daroma.

Dažų laidumo eksperimentų hipotezė – kuo didesnis koneksinų laidumas, tuo daugiau dažų į ląstelę įsigeria, tuo intensyviau ji tuomet šviečia. Taigi į ląstelių mėginėlį įleidžiama DAPI dažų, sužadinama transfekcija, siekiant atidaryti puskanalius ir apšvitinus tam tikro bangos ilgio šviesa, daromos ląstelių nuotraukos. Kuomet daugiau dažų įsigeria - intensyvesnis švytėjimas ląstelėse. Taip pat padaromos nuotraukos esant tipiniam apšvietimui. Kuo intensyviau ląstelė šviečia, tuo daugiau puskanalių turėtų būti atsidarę.

Elektrofiziologijos eksperimentų hipotezė – kuo ląstelė intensyviau švyti, įvykus transfekcijai, tuo didesnis jos laidumas – didesnė išmatuota srovė. Į pačią ląstelę įkišamas elektrodas ir matuojama šios srovės pralaidumas į mėginio išorę (taip išmatuojamas puskanalių laidumas, kadangi per šiuos eina K^+ , Na^+ , Cl^- jonai galintys nešti elektros krūvį). Padaromos nuotraukos esant tamsai ir tipiniam apšvietimui be ir su pipete.

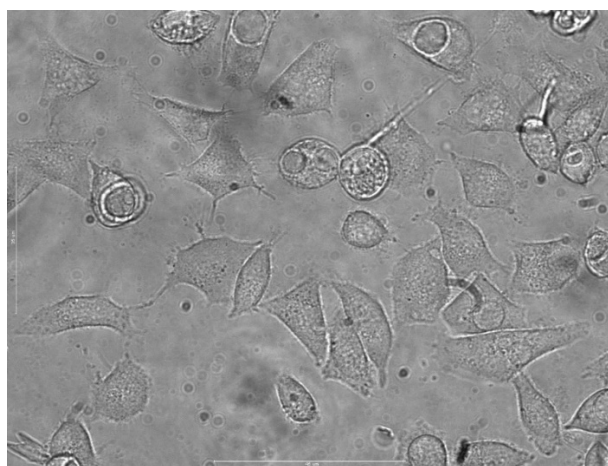
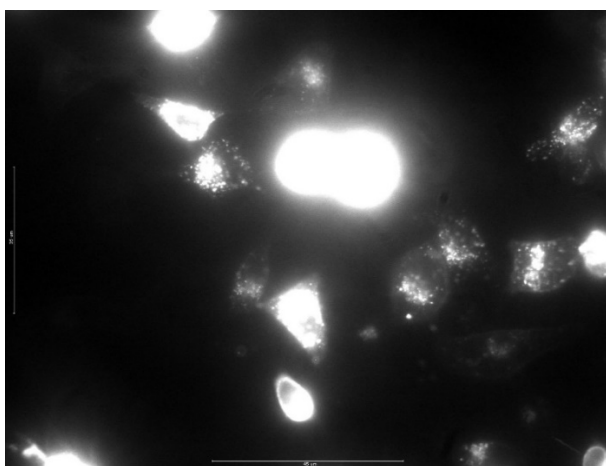
Iš duomenų surinkimo schemas (žr. 13 pav.): pirmiausiai padarome ląstelių nuotraukas, tuomet šias sužymime. Ekspertas peržiūri sužymėtas nuotraukas ir, jei reikia, pataiso. Patikslintos, peržiūrėtos nuotraukos tuomet naudojamos modeliams mokyti.

Išsaugotų vaizdų, dar netransfekavusių ląstelių, gautas vaizdo pavyzdys pateiktas 14 pav..



14 pav. Gautas pavyzdinis ląstelių vaizdas

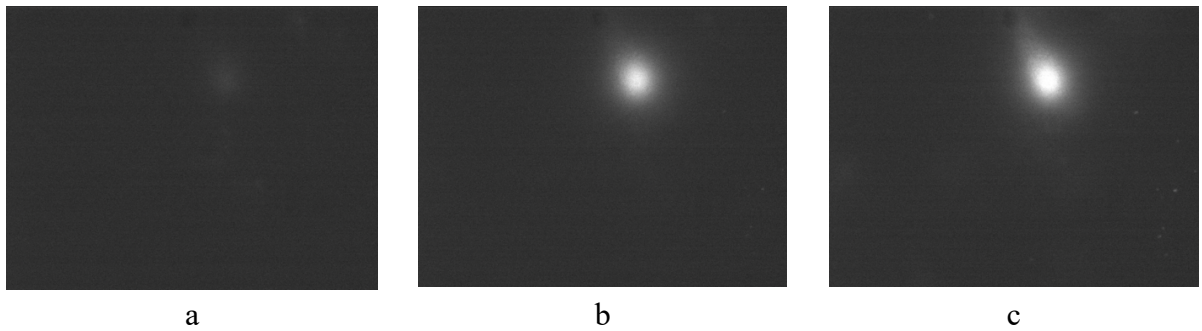
Iš 14 pav. matyti, jog gauta nuotrauka yra bespalvė, nors kai kurių ląstelių kontūrai aiškiai matyti, tai nėra tikslinga visoms. Ląstelių formos skiriasi, tekstūra skiriasi, vienos gyvos kitos ne. Mokinami objekcinio segmentavimo modeliai turės atskirti kiekvieną ląstelę tokiose nuotraukose atskirai.



15 pav. Apšvitintų transfekuotų CX30 ląstelių vaizdas (kairėje); neapšvitintų transfekuotų CX30 ląstelių vaizdas (dešinėje)

Taip pat padaromos ląstelių nuotraukos po transfekcijos, į jas įleidus DAPI dažų pigmento ir apšvitinant (žr. 15 pav. kairėje) ir neapšvitinant (žr. 15 pav. dešinėje). Tipinio apšvietimo nuotraukos (žr. 15 pav. dešinėje) bus naudojamos mokyti dirbtinio intelekto modelį sužymėti, segmentuoti ląsteles.

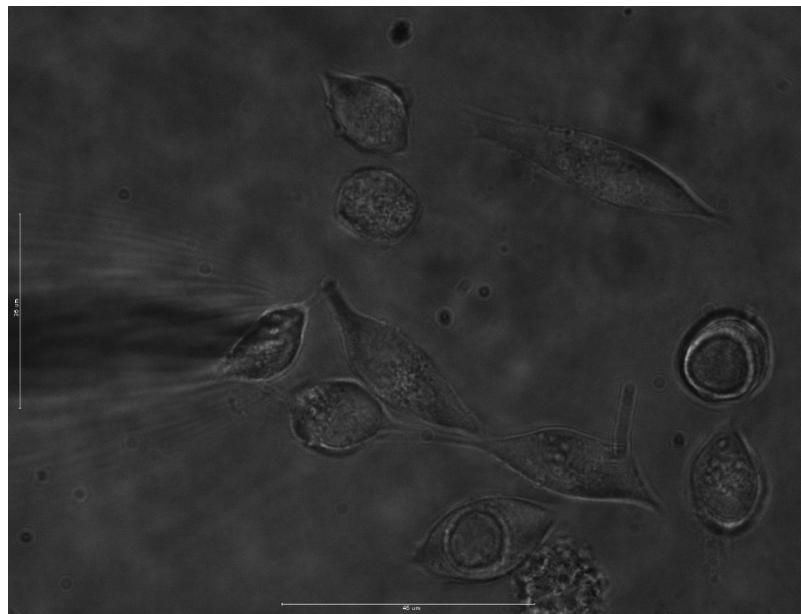
15 pav. (kairėje) tipo nuotraukos, bus naudojamos nustatyti ląstelės transfekcijai – kurios transfekavo, kurios ne (transfekavusios švytinčios, nes tai reiškia jų puskanaliai atsidarė ir pateko DAPI dažų, kurie prisijungę prie RNR ir apšvitinti pradėjo švytėti).



16 pav. DAPI dažų sklaidimo tyrimo a-c) laikinė seka (T0001 -> T0060 -> T0160)

16 pav. tipo nuotraukos, bus naudojamos laikinei švytėjimo analizei, siekiant nustatyti dažų sklaidimą, ląstelės švytėjimo intensyvumo pokytį per laiką. Ant šių nuotraukų bus perdengiamos tipinio apšvietimo nuotraukų gauti segmentacijų žymėjimai. Nuotraukos tokios pačios, tik apšviestos skirtingu bangos ilgiu, todėl galime tai padaryti. Nuotraukos daromos kas 30 s ir paskutinė yra po 30 min nuo eksperimento pradžios – tai taipogi netrukdo perdengti gautas segmentacijas, nes tiriamos ląstelės nenukeliauja jokio reikšmingo atstumo, praktiškai nepakeičia pozicijos per tą laiką.

Taip pat be tipinio apšvietimo ir DAPI švytėjimo nuotraukos, elektrofiziologijos eksperimentams padaroma nuotrauka su matoma įbesta pipetė (žr. 17 pav.).



17 pav. Elektrofiziologijos eksperimentų nuotrauka su pipete (tipinis apšvietimas)

Iš 17 pav. kairiojo krašto matomas tamsus pipetės kontūras, kuris galiausiai yra įbestas į ląstelę. Ši nuotrauka naudojama atpažinti, išsaugoti kurioje būtent ląstelėje yra įbesta pipetė, kad būtų galima apjungti automatinius šviesumo matavimus ir rankinius elektrofiziologijos, srovės laidumo matavimus.

14 pav. ir 17 pav. nors ir skiriasi šviesumu, tai du skirtingi eksperimentai. 14 pav. skirtas dažų sklaidimo matavimams, o 17 pav. yra skirtas elektrofiziologijos matavimams. Pačiuose tyrimuose tokių nuotraukų ryškumo variacijų nėra – visos vienodo ryškumo. Transfekcijos atpažinimui bus naudojamas ląstelės ir foninio šviesumo skirtumas, o laikiniuose grafikuose bus vėlgi stebima ne konkreči šviesumo vertė, bet koks pokytis vyksta per laiką.

3.2. Ląstelių klasifikavimas, segmentavimas

Ląstelių klasifikavimui tiriama „Detectron2 Mask-RCNN50“, „YOLOv11“ ir „U-NET“ modeliai. Modelis su geriausiais tikslumo rodikliais bus pasirenkamas naudoti ląstelių žymėjimo ir duomenų ištraukimo architektūroje.

„Detectron2“ bibliotekoje [7] segmentacijoms mokytis pasirenkamas naudoti „mask_rcnn_R_50_FPN_3x“ modelis, nes šio kūrėjų pateiktas greičio ir tikslumo santykis bene geriausias [32]. „YOLOv11“ pasirenkamas segmentavimo režimas, o „U-NET“ naudojamas toks koks standartiškai yra. Optimalūs modelių mokymo parametrai pateikiami 1 lentelėje.

1 lentelė. Modelių mokymo parametrai

Modelis	Apmokomų nuotraukų rezoliucija	IoU riba	NMS	Partijos dydis	Mokymosi greitis
Detectron2 RCNN50	1024x1344	0.5	0.75	256	0.00025
YOLOv11	1344x1344	0.5	0.75	8	0.01
U-NET	1024x1344	-	-	4	0.005

Verta paminėti – „YOLOv11“ rezoliucija yra 1344x1344, nes šis mokomas naudojant vienodos dimensijos nuotraukas (kvadratinės), kuomet šiuo atveju turime 1024x1344 nuotrauką ir „YOLOv11“ nurodome mokytis ant 1344x1344 – šis likusią dalį nuotraukos užpildo tuštuma (255 vertės pikseliai), ši tuštuma neturi įtakos mokymo procesui, bei taip išvengiame nuotraukos dimensijų keitimo ir galime išlaikyti visą nuotraukos rezoliuciją per visus modelius.

IoU riba nusako kiek segmentacija turi persidengti su tiesa, kad būtų įskaityta kaip TP, o NMS parametras leidžia nufiltruoti segmentacijas, kurios tarpusavy persidengia. „Detectron2 Mask-RCNN50“ rezultatus itin prastino persidengimai, kuriems NMS mažai tepadėjo, 0.75 koeficientas optimalus, nes kitu atveju pradedamos nufiltruoti net ir geros segmentacijos, kas dar labiau suprastina tikslumą, kuomet „YOLOv11“ neturėjo tokios problemos, o „U-NET“ pagal savo dizainą ir negali turėti, nes ne objektus segmentuoja.

Klasifikuoti pasirinkome tik gyvas ląsteles, nes negyvos, šiukšlės ir visa kita yra nenaudingi duomenys tyrimams. Verta paminėti – tyrimų pradžioje šios klasės buvo žymimos ir modeliai apmokomi, bet kadangi didžioji dauguma duomenų buvo gyvos ląstelės, kitų klasių atpažinimo tikslumas buvo itin mažas (žemiau 50%), todėl idėjos klasifikuoti kelias klases atsisakyta, nors ir tikslus negyvų ląstelių atpažinimas būtų leidęs apskaičiuoti tam tikrus ląstelių mėginėlio gyvybingumo rodiklius.

Naudojant sužymėtus duomenis, mokome dirbtinio intelekto modelius. Geriausias modelio rezultatas pasiekiamas, kai šis mokomas naudojant įvairiausių ląstelių rinkinį (ląstelių tipas HeLa vienodas, bet koneksino tipai skirtingi, taigi šiek tiek gali pasikeisti ląstelės forma, struktūra, bet jos vis tiek panašios).

Gavus rezultatus iš objektinio segmentavimo modelių – šiuos konvertuojame į COCO formatą (šiuo atveju „YOLOv11“ segmentavimo rezultatai konvertuojami į COCO), siekiant užtikrinti vienodą ir patikimą modelių rezultatų tikrinimą. Taipogi, gautus COCO failus konvertuojame į kaukes, kad galėtume sulyginti su „U-NET“ modelio pikseliniais rezultatais.

Modelių mokymo rezultatų rodikliai pateikti 2-3 lentelėje. 2 lentelėje pateikiami objekcinio segmentavimo tikslumo rodikliai „YOLOv11“ ir „Detectron2 Mask-RCNN50“ modeliui, o 3 lentelėje pateikiami pikselinio tikslumo rodikliai visiems trimis modeliams.

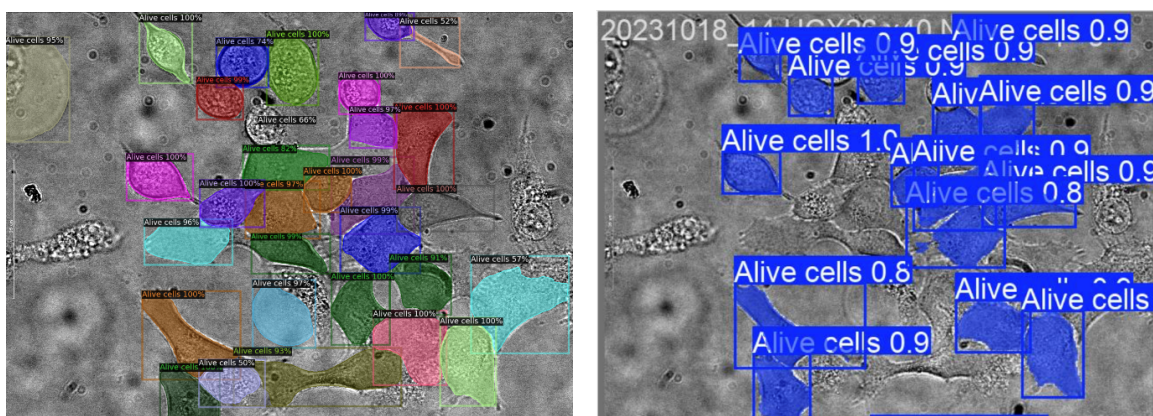
2 lentelė. Išmokytų galutinių objekcinio segmentavimo modelių tikslumo rodikliai

Modelis	Matavimas	Preciziškumas, %	Jautrumas, %	F1 rodiklis, %	Tikslumas, %
Detectron2 RCNN50	Validavimas	74.01	94.24	82.91	70.81
	Validavimas + filtravimas	91.43	92.09	91.76	84.77
	Testavimas	79.71	86.48	82.96	70.88
	Testavimas + filtravimas	97.16	86.16	91.33	84.05
YoloV11	Validavimas	82.54	74.82	78.49	64.60
	Testavimas	88.03	39.30	54.34	37.31

Kaip matome iš 2 lentelės – „Detectron2 Mask-RCNN50“ modelis tiksliausiai atpažįsta ląsteles net be papildomo segmentacijų filtravimo, kuris buvo įvestas pastebėjus reikšmingą „Detectron2“ persidengiančių segmentacijų skaičių, kuriam NMS įvedimas nepadėjo (aptariamo 3.3 skyriuje). „Detectron2“ lenkia „YOLOv11“ tikslumą ~6 %, jautrumą ~20 % validavimo duomenyse, ir daugiau nei dvigubai (~47 %) testavimo duomenyse, bet preciziškume pasirodė šiek tiek prasčiau dėl didelio kiekio persidengiančių segmentacijų. Įvedus papildomą rezultatų filtravimą į „Detectron2“, visi rodikliai išskyrus jautrumą šoktelėjo bene 10 % ir visi „Detectron2“ rodikliai lenkia „YOLOv11“ tiek validavimo tiek testavimo duomenyse tarp ~9-47 %.

Verta paminėti, jog „YOLOv11“ mokymas nebuvo stabdomas, „YOLOv11“ pats automatiškai sustoja mokytis po kelių šimtų epochų, kuomet tikslumas nustoja gerėti, kuomet „Detectron2“ buvo ribotas iki 4500 epochų, nes kitaip nesustotų toliau mokytis pats. „Detectron2 Mask-RCNN50“ apmokymas truko apie ~8 min, o „YOLOv11“ apie ~13 min naudojant „NVIDIA A100-PCIE-40GB“ vaizdo kortą.

„Detectron2 Mask-RCNN50“ standartinio rezultato išėjimas pateiktas 18 pav. (kairėje), o YOLOv11 (dešinėje).



18 pav. Gautas ląstelių nuotraukos objektų atpažinimo, standartinis klasifikavimo rezultatas

Iš 18 pav. matome kokią standartinę išėjimą pateikia „Detectron2“ ir „YOLOv11“ peržvelgti segmentuotas nuotraukas. Pastebima, jog „YOLOv11“ tiesiog neatpažįsta daugelio ląstelių nuotraukoje, kuomet „Detectron2“ identifikuoja beveik visas.

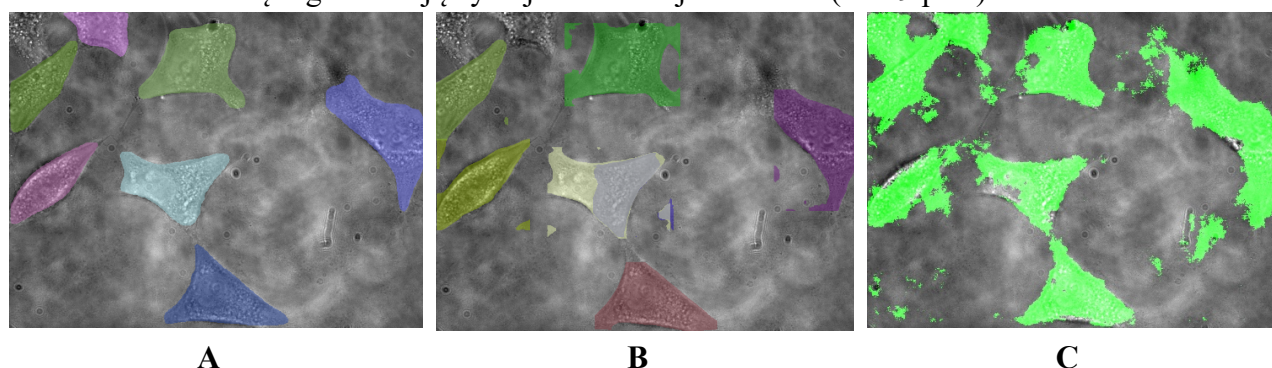
Toliau apžvelgiamas pikselinis tikslumas pateiktas 3 lentelėje.

3 lentelė. Išmokyty modelių pikseliniai segmentavimo tikslumo rodikliai

Modelis	Matavimas	Preciziškumas, %	Jautrumas, %	F1 rodiklis, %	Tikslumas, %
Detectron2 RCNN50	Validavimas	87.77	94.37	90.27	97.28
	Validavimas + filtravimas	88.99	92.93	90.13	97.27
	Testavimas	87.74	89.51	88.44	92.64
	Testavimas + filtravimas	88.41	88.66	88.37	92.57
YoloV11	Validavimas	57.49	94.16	69.81	89.49
	Testavimas	66.81	90.13	76.21	82.97
U-NET	Validavimas	75.38	83.30	76.88	94.10
	Testavimas	52.84	86.67	61.76	66.40

Iš 3 lentelės matyti, jog ir pikseliniame tikslume „Detectron2 Mask-RCNN50“ modelis yra tiksliausias – visais atvejais preciziškume, F1 rodikliu, tikslumu lenkia „U-NET“ ir „YOLOv11“, o nusileidžia tik jautrume – geriausias jautrumo rezultatas pasiektas „YOLOv11“ tiek validavimo tiek testavimo duomenyse ~1-2 % skirtumu „YOLOv11“ naudai. „U-NET“ rezultatai itin prasti testavimo duomenyse, nors kartais lenkia „YOLOv11“ validavimo rezultatuose, kas galėtų reikšti „U-NET“ modelio polinkį persimokinti, būti optimizuotam ant validavimo duomenų. Papildomos transformacijos ir „U-NET“ modifikacijos tikėtina pasiektų geresnių rezultatų, bet bazinis „U-NET“ šiuo atveju prasčiausias iš trijų modelių. „Detectron2“ pasiekia ganėtinai aukštą 92.57 % tikslumą testavimo duomenims, kas yra ~10 % daugiau nei „YOLOv11“ ir ~26 % daugiau nei „U-NET“. Kas pastebima, jog po papildomo „Detectron2“ filtravimo žingsnio – jo jautrumas šiek tiek sumažėja, nors preciziškumas pagerėja – tą gali įtakoti itin retos ląstelės, kurios iš tikrųjų persidengia tikslingai ir kiekvienos išmetimas filtravime gali reikšti šiek tiek sumažėjusį tikslumo rodiklį, nors preciziškumas ir tikslumas gali padidėti ženkliai.

Suvienodinti modelių segmentacijų žymėjimai naudojant kaukes (žr. 19 pav.).



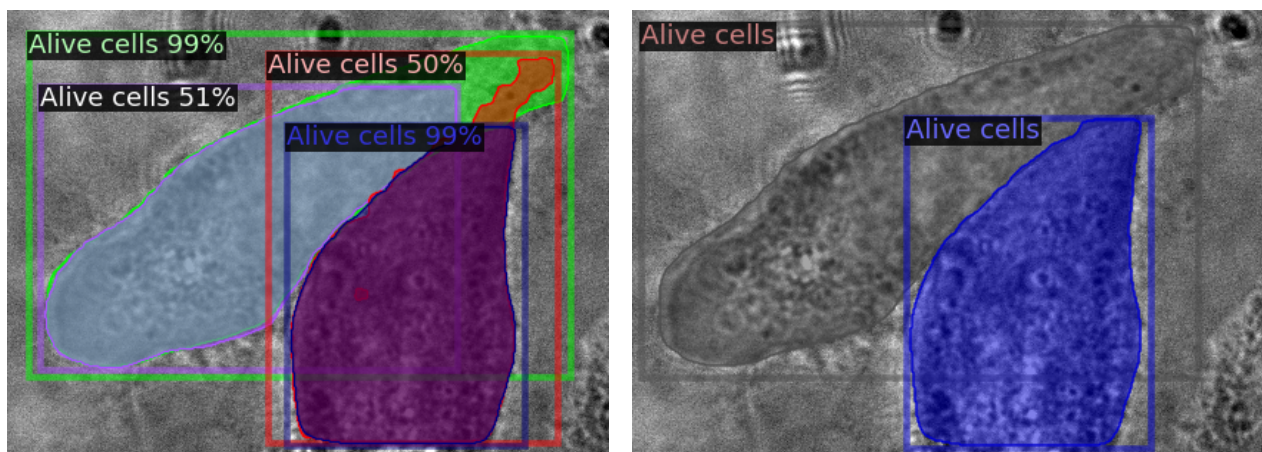
19 pav. Gauti skirtingų modelių ląstelių atpažinimo rezultatai tai pačiai nuotraukai. A) „Detectron2 Mask-RCNN50“; B) „YOLOv11“; C) „U-NET“.

Kaip matoma iš 19 pav. – geriausiai ląstelės atpažįstamos „Detectron2“ modelio, kuomet „YOLOv11“ lyg įspraudžia ląstelės kontūrą į kvadratą ir netgi matyti itin aiškos šio kvadrato ribos, kuriose segmentacija baigiasi nukirpta (žr. 19 pav. B, žalios spalvos segmentacija centro viršuje), o „U-NET“ išvis išsina iš kontūrų ribų ir „dominančius“ regionus spėja, kur net šių neturėtų būti.

Pagal gautus rezultatus – „Detectron2 Mask-RCNN50“ modelis yra labiausiai tinkamas tiriamų ląstelių segmentacijai ir pasiekia aukščiausius tikslumo rodiklius, taigi šis modelis bus naudojamas tolimesnėje ląstelių duomenų ištraukimo ir segmentavimo architektūroje.

3.3. Papildomas „Detectron2“ segmentacijų filtravimas

Darant eksperimentus, pastebėtas didelis „Detectron2 Mask-RCNN50“ trūkumas – jis itin linkęs žymėti daug persidengiančių segmentacijų, kas šio tikslumą sumažina net ~14 % (žr. 2 lentelę). Rezultatuose yra segmentacijų, kurios persidengia, ko neturėtų būti – ląstelės beveik negali persidengti. Koreguojant modelio NMS parametraž, šis neduoda pakankamo lankstumo ir pradeda išmetinėti geras segmentacijas, taigi daromas papildomas rezultatų filtravimas po pirminės modelio išvesties. Rezultatas pateiktas 20 pav.



20 pav. „Detectron2 Mask-RCNN50“ Ląstelių segmentavimo rezultatas prieš papildomą filtravimą (kairėje), ir po (dešinėje)

Ląstelių filtravimas išmeta visas persidengiančias ląsteles daugiau nei 50% plotu ir palieka tik tas, nepersidengiančias, kurių pasitikėjimo metrika buvo didžiausia. Taipogi apdorojamas atvejis, kai mažesnė segmentacija yra viduje didesnės – išmetama mažesnė. Tam tiksliai apskaičiuoti pasitelkiama ir sukurama IC metrika „intersection coefficient“.

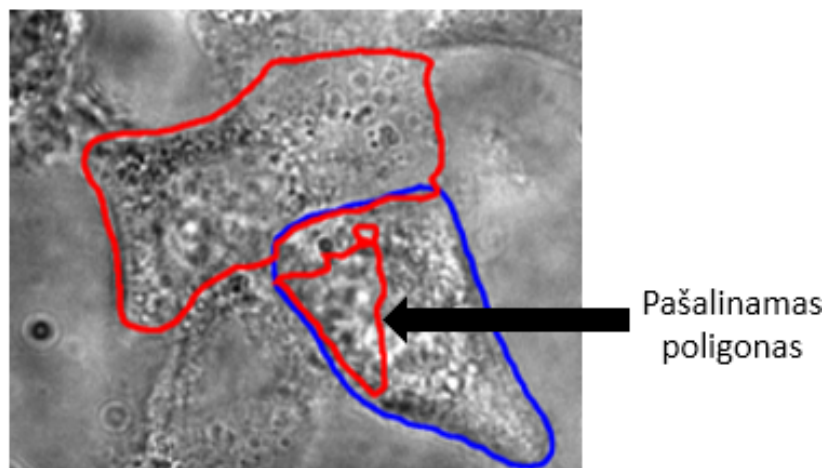
$$IC = \frac{A_0}{\min(A_1, A_2)};$$

A0 – segmentacijų persidengimo plotas;

A1, A2 – pačių segmentacijų plotas.

Taigi, jei $IC > 0.5$, segmentacija, kurios pasitikėjimo koeficientas mažesnis: išmetama.

Be to, „Detectron2“ turėjo dar vieną problemą, kuomet retsykiais viena nuspėta ląstelė yra sudaryta iš kelių poligonų – to negali būti, ląstelė gali būti tik vienas vientisas poligonas, taigi tą ištaisyti buvo išmetami segmentacijos poligonų „likučiai“, paliekant didžiausią poligoną, kuris būtent ir buvo pagrindinis ląstelės poligonas (žr. 21 pav.).



21 pav. „Detectron2 Mask-RCNN50“ blogo segmentacijos poligono šalinimas (raudona segmentacija: multi-poligoninė)

Kaip matoma iš 21 pav. – raudonas kontūras yra viena segmentacija, o mėlyna kitas. Filtravimo procese apskaičiuojant persidengimo koeficientą iškildavo bėda, jei „pašalinamas poligonas“, dabar pažymėtas 21 pav., buvo kaip pirmasis poligonas masyve, tai susinaikindavo visa gera segmentacija, nes mažesnis poligonas viduje didesnės (mėlynos) segmentacijos. Taigi išspręsti šią problemą ir pagerinti segmentavimo tikslumą – pažymėtas „Pašalinamas poligonas“ yra pašalinamas pirmiau nei atliekamas segmentacijų filtravimo pagal IC procesas. Ir tai atliekama su visom segmentacijom, kurioje ląstelė segmentuojama kaip multi-poligonas, tikrinamos visos, ar nėra multi-poligoninės, ir jei yra – mažesnieji poligonai šalinami paliekant vieną pagrindinį, didžiausią.

3.4. Šviesiausios apskritiminės dalies segmentacijoje paieška

Standartiniuose ekspertų rankiniuose rezultatuose – naudojama ne viso segmentacijos ploto šviesumas. Vietoj to, viduje ląstelės iš akies pasirenkamas kintamo dydžio apskritimas ir apibrėžiama matomai šviesiausia vieta ląstelėje. Tai atkartoti – pasirenkame maksimalų apskritimo diametrą pagal sukurta formulę:

$$d = \frac{\sqrt{\text{Segmentacijos plotas} \div \pi}}{5}.$$

Tuomet naudojant slenkančio lango metodą, segmentacijose ieškome šviesiausių šių apskritimų, o jei nerandame – mažiname apskritimo dydį ir bandome ieškoti per naują. Randame šviesiausius segmentacijos apskritimus tiek tipinio šviesumo nuotraukai, bet ir DAPI švytėjimo nuotraukoms bei laikinėms nuotraukoms, kiekvienai ši skaičiuojant.

Be to, bandyta įvesti ir nuotraukos šviesumo verčių 4 kvartilio keitimas 3-čiu bei 4 kvartilio verčių pakeitimas 3-čio vidurkiu, tuomet atliekami išvedimai, bet tai nepasiteisino nagrinėjant rezultatus ir buvo mesta (neatsirado didesnė koreliacija su srovės tekėjimo duomenimis ar stabilesnis, nuspėjamesnis švytėjimo kilimas laike). Tuo siekta nufiltruoti maksimalias, perryškintas pikselių vertes, kurios nebūtinai yra tikslus DAPI švytėjimas, bet gali būti anomalija.

3.5. Ląstelių kokybinių, kiekybinių parametrų surinkimas

Norint įvertinti dažų sklaidimą, fluorescenciją, turime iš gautų gyvų ląstelių segmentacijų išskaičiuoti šviesumus ir šių plotus.

Siekiant gauti kiek įmanoma tikslesnius rezultatus – „Detectron2 Mask-RCNN50“ modelio rezultatai yra peržiūrimi ranka ir pakoreguojami, norint pasiekti 100 % tikslumą, tuomet pradedamas kiekybinių duomenų ištraukimo procesas iš segmentacijų.

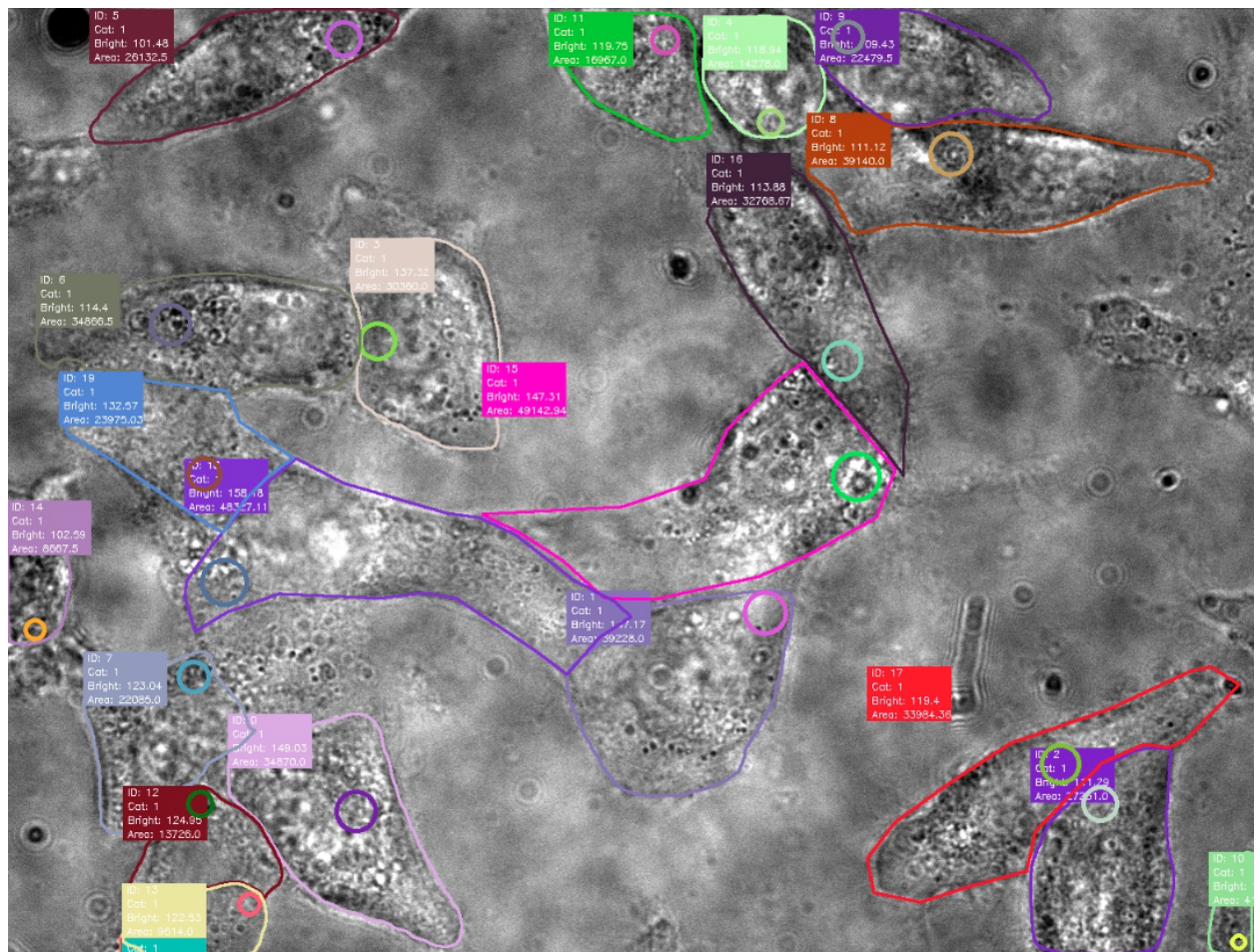
Sužymėjimo išvedime, greitai peržiūrai reikalaujama:

- Rodyti segmentacijos ID;
- Rodyti ląstelės šviesumą – šis apskaičiuojamas imant visų pikselių vidutinį pilkumą/šviesumą tarp 0-255 pikselių verčių, segmentacijos plote;
- Rodyti ląstelės plotą (pikseliais);
- Apibrėžti ląstelės kontūrą;

Rezultatų dokumento išvestyje minimaliai reikalaujama:

- Foninis šviesumas (išpjovus segmentacijas, vidurkis) ir šio 4-tasis, 3-čiasis, 1-asis kvartilių vidurkis, mediana;
- Foninis šviesumas (išpjovus segmentacijas, vidurkis) imant 15x15 pikselių tamsiausią kvadratą fone, šio vidurkis;
- Foninis šviesumas (išpjovus segmentacijas, vidurkis) imant tamsiausią 1 pikselį;
- Segmentacijos šviesumas ir šio 4-tasis, 3-čiasis ir 1-asis kvartiliai, šių vidurkiai, mediana;
- Segmentacijos šviesumas imant 1/5 segmentacijos ploto šviesiausią ploto skritulį, šio šviesumo vidurkis;
- Segmentacijos šviesumas imant šviesiausią 1 pikselį;
- Segmentacijos plotas pikseliais ir mikrometrais kvadratu;
- Šviesiausio segmentacijos skritulio centroido koordinatės ir diametras;

Gautas eksperto peržiūroms sužymėjimo rezultatas pateiktas 22 pav.

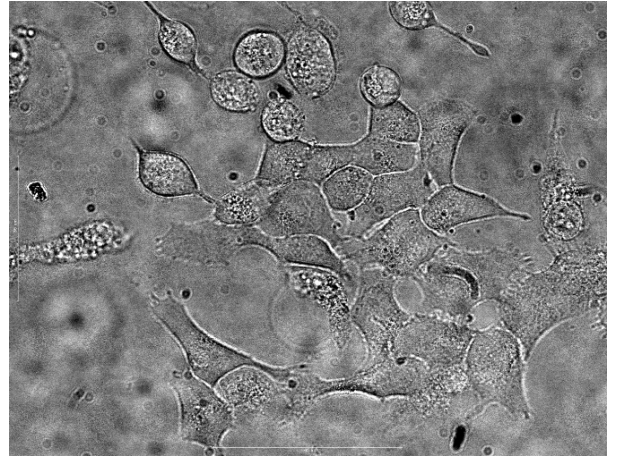
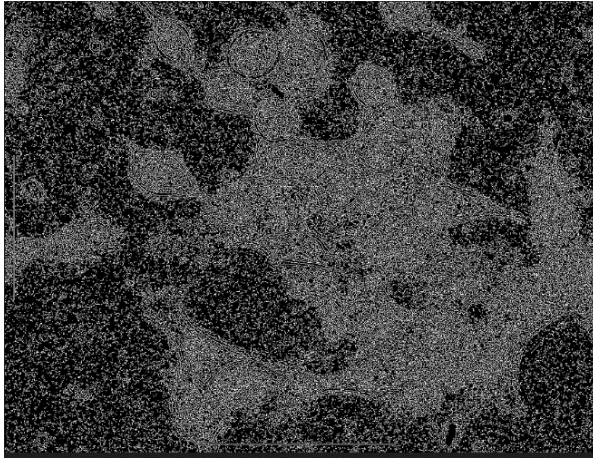


22 pav. Ląstelių segmentacija su išvestais papildomais duomenimis prie kiekvienos ląstelės

22 pav. atvaizduotas duomenų vaizdavimas padeda ne tik sparčiai įvertinti gautus rezultatus, bet ir pagal segmentacijos ID surasti norimą ląstelę, kuriai atliekama tolimesnė analizė. Pavyzdžiui: elektrofiziologijos tyrimuose turime rasti ląstelės ID, į kurią įkišta pipetė ir tuomet būtent tik šios ląstelės gautus rezultatus ištraukti tolimesnei analizei, sulyginti su srovės tekėjimo matavimais. Taip pat ląstelėse matomi apskritimai – šie apskritimai yra šviesiausias segmentacijos apskritimas, simuliuojantis buvusius rankinio žymėjimo metodo rezultatus.

Toliau papildomai išskaičiuojame kiekvienos nuotraukos foninį šviesumą (pašalinus ir nepašalinus ląsteles), kiekvienos ląstelės įtaką bendram vaizdo šviesumui, bendrą vaizdo šviesumą su ląstelėmis ir fonu, pažymime kuri ląstelė transfekavo ar ne pagal ląstelės ir foninio šviesumo skirtumą.

Eksperimentuojant su filtrais, siekiant išgauti papildomų parametrų, tokių kaip tekstūros koeficientas, vaizdų manipuliacija, atrastas kontūrų aptikimo metodas naudojant „Python“ „Canny“ funkciją, kuriai reikia nurodyti minimalią ir maksimalią slenkstinę vertę. Tinkamai parinkus šiuos koeficientus gaunamas toks vaizdas (žiūrėti 23 pav. kairėje).



23 pav. Kairėje – ląstelių nuotrauka su atliktu „Canny“ kontūrų aptikimu, dešinėje – originali

Kaip matome iš 23 pav. – yra bene tobulai aptinkamos ląstelių pozicijos, ir nors neina kiekvienos ląstelės atskirti atskirai, šis metodas gali padėti atskirti kur yra ląstelė, o kur foninis triukšmas ne tokiose aiškiose ląstelių nuotraukose ar netgi turėti kitų panaudojimo sričių. Naudojant šia „Canny“ procedūrą taip pat buvo apskaičiuotas ir išvestas „tekstūros“ koeficientas, nors šis neparodė kažkokios statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp transfekuotų ir netransfekuotų ląstelių – todėl ir dėl šios operacijos imlaus skaičiavimams laiko, buvo nuspręsta šį tekstūros koeficiento išskaičiavimą išmesti.

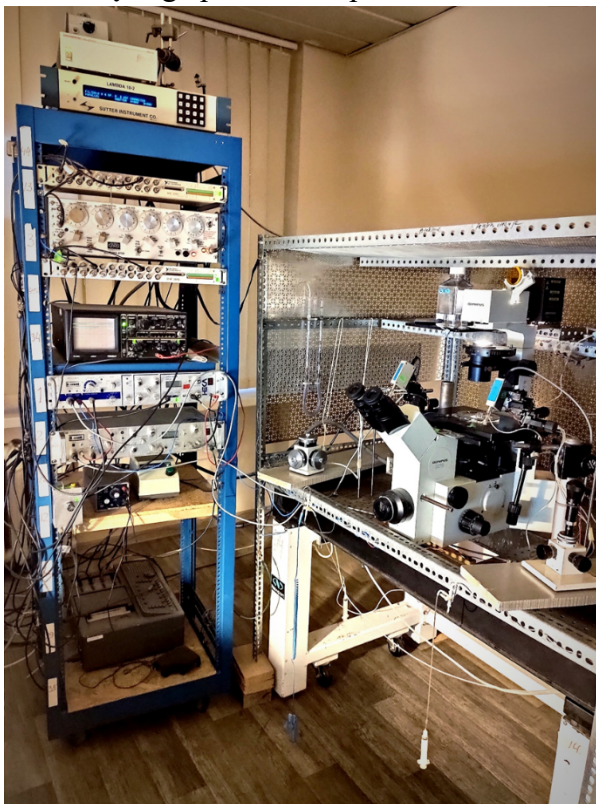
Norint tinkamai atlikti šią procedūrą ir gebėti interpretuoti duomenis tarp daug nuotraukų – reikalinga regresinė analizė suskaičiuoti tinkamus „Canny“ funkcijai reikalingus koeficientus. Rankiniu būdu bandyta sukurti tiesinę šių koeficientų apskaičiavimo funkciją nuo nuotraukos šviesumo, bet panašu, jog šių koeficientų parinkimas nėra tiesiškos priklausomybės, taigi reikalinga tolimesnė analizė, siekiant sužinoti ar šis metodas yra kažkur panaudotinas.

Teigtina, jog ši kontūro aptikimo procedūra gali padėti patikslinti ląstelės kontūrą ir lengviau padėti ekspertui interpretuoti rezultatus. Hipotezė, jog šis kontūro atpažinimas duoda tokį rezultatą, nes foniniai pikseliai yra „aštresni“ lyginant su ląstelės, kuomet per ląsteles turinčios praeiti šviesos bangos lūžta, todėl vaizdas „pasiblukina“ ir gauname, jog fone „aptinkame kraštus“, skirtingą tekstūrą, o kur ląstelės – ne, su tinkamais koeficientais.

4. Dažų sklaidimo ir elektrofiziologijos tyrimas Cx26 HeLa ląstelėse

Toliau atliekame realius eksperimentus siekiant patikrinti rezultatų stabilumą, ar hipotezės atitinka rankiniu metodu apskaičiuotų ląstelių hipotezes.

Eksperimento duomenų surinkimo įranga pateikta 24 pav.

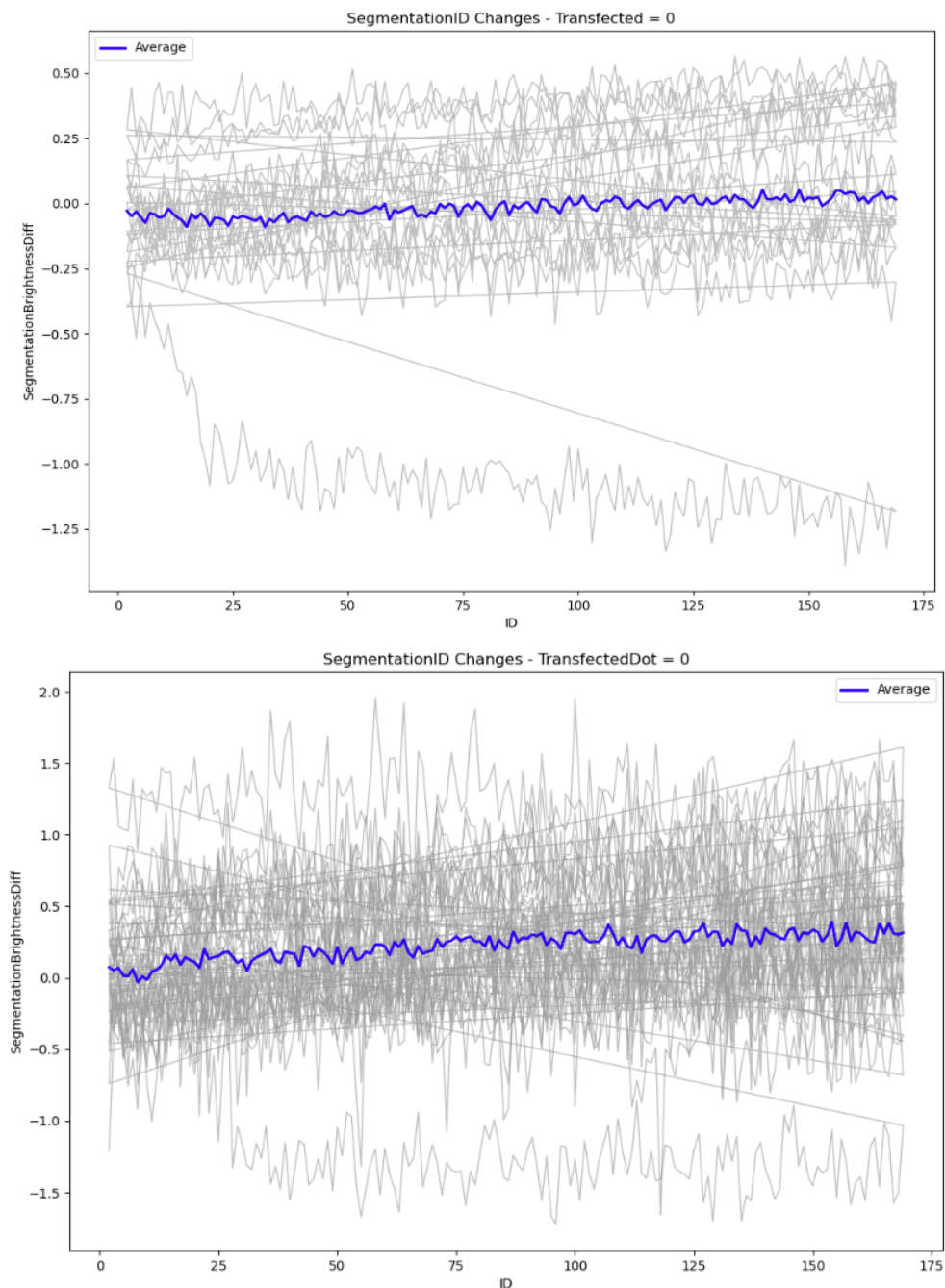


24 pav. Ląstelių duomenų surinkimo įranga (dažų matavimo duomenims)

Iš 24 pav. matyti elektrofiziologijos ir fluorescencijos tyrimų įranga – kairėje matoma elektrofiziologijos matavimų įranga, o dešinėje mikroskopas su prijungta kamera, naudotas tiek elektrofiziologijos, tiek fluorescenciniam tyrimams. Taip pat naudotas kompiuteris su programine įranga, norint išsaugoti rezultatų nuotraukas.

4.1. Šviesumo skaičiavimų metodų palyginimai

Naudojant gautus rezultatus pastebėta, jog patys stabiliausi rezultatai yra naudojant visą ląstelės plotą ir viso fono šviesumo vertes – kitu atveju rezultatus interpretuoti pasidaro sudėtingiau ir nebūtinai stabiliau. To pavyzdys pateiktas 25 pav.



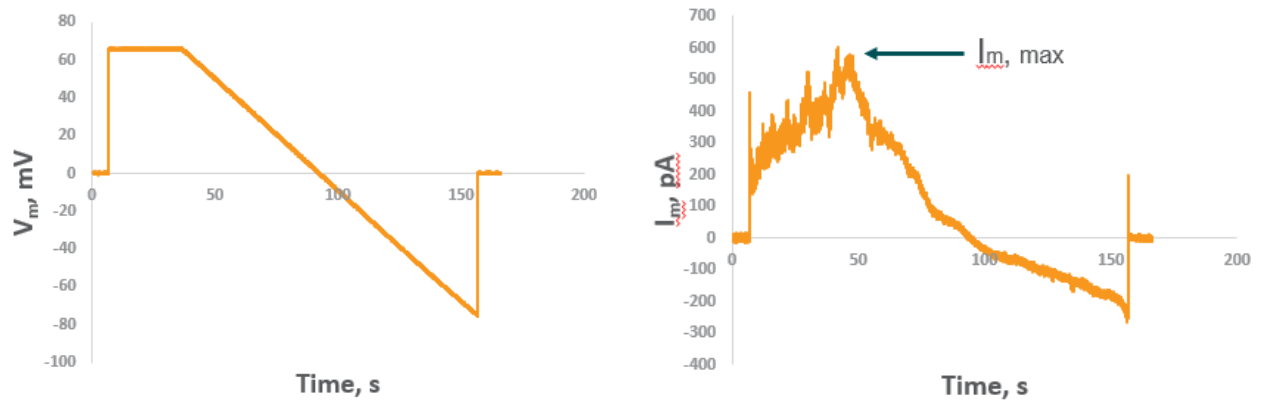
25 pav. Visų fluorescencinių tyrimų segmentacijų ląstelės ir fono šviesumo skirtumo pokytis per laiką, kuomet ląstelė netransfekavus (apačioje – šviesiausio taško šviesumas, o viršuje – viso ląstelės ploto šviesumas; mėlyna linija – visų vidurkis)

Kaip matoma iš 25 pav. – rezultatai yra žymiai stabilesni ir mažiau varijuoja lyginant su tais, kurie gauti naudojant šviesiausią segmentacijos tašką. Tas pats galioja ir transfekavusių ląstelių rezultatams – taigi optimaliausia ir stabiliausia tiesiog naudoti visos ląstelės šviesumą ir šios šviesumo skirtumą su visu fonu.

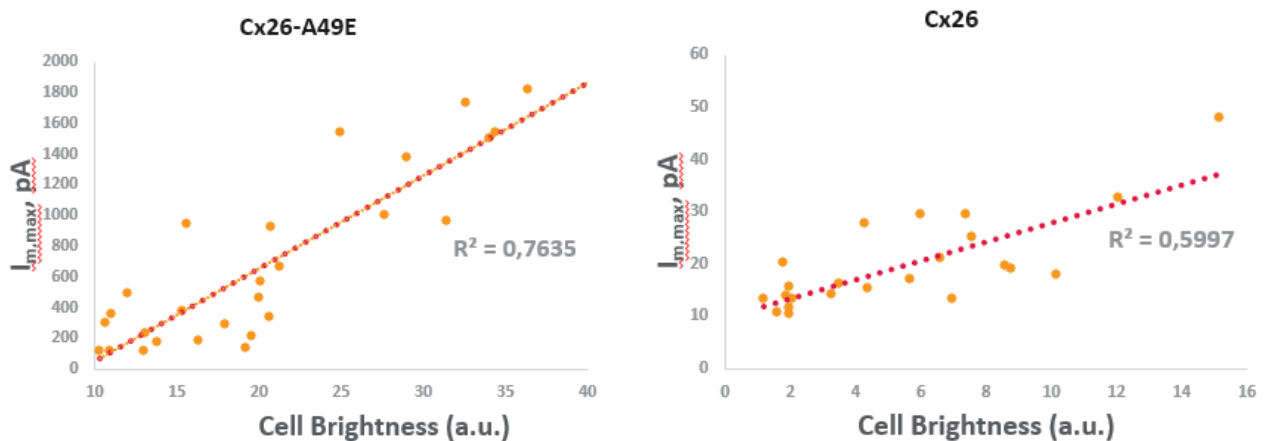
4.2. Elektrofiziologijos matavimų tyrimai

Atliekami elektrofiziologijos tyrimai siekiant patvirtinti hipotezę, jog ląstelių šviesumo intensyvumas koreliuoja su šių laidumu – kuo ląstelė ryškiau šviečia, tuo kokybiškesnė transfekcija ir didesnė per ląstelę, puskanalius einanti srovė.

Norint atlikti elektrofiziologijos tyrimus į ląstelę įbedama adata, kuri paduoda įtampą į ląstelę (žr. 26 pav. įtampos profiliui), o pats įžeminimas yra ląstelės išorėje – mėginėlio tirpale. Įtampos signalo generatorius paduodant įtampos signalą, tuo pačiu matuoja tekančią srovę laike. Paduodami ir išmatuojami signalai pateikti 26 pav. Tyrimų rezultatai išmatavus ir automatiškai ištraukus ląstelių parametrus yra pateikti 27 pav.



26 pav. Elektrofiziologijos tyrimų į ląstelės paduodamas įtampos profilis (kairėje) ir išmatuotos srovės signalai (dešinėje, $I_{m, \max}$) per laiką

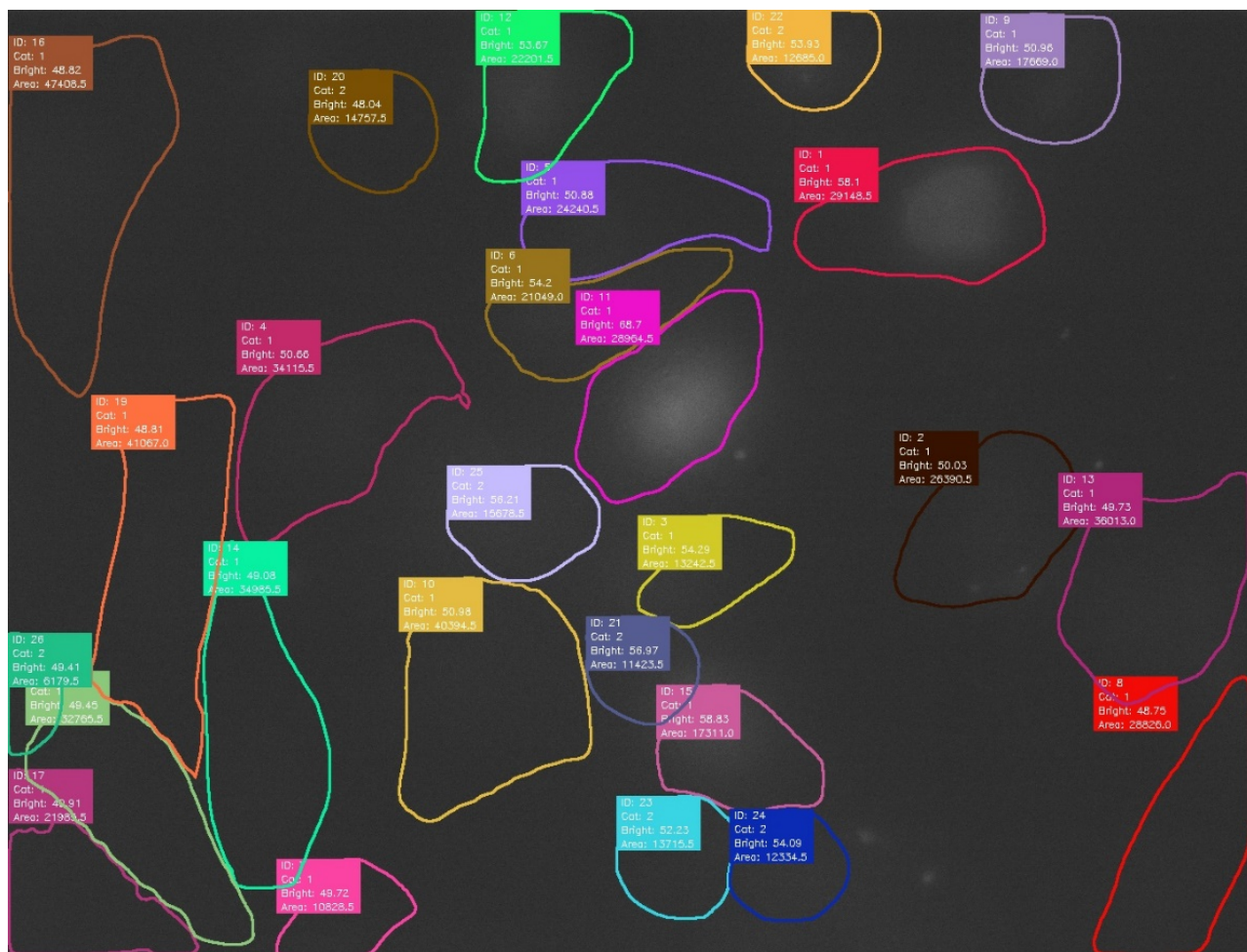


27 pav. Elektrofiziologijos tyrimų šviesumo intensyvumas prieš išmatuotą srovę. Kairėje Cx26-A49E varianto ląstelių mėginys, dešinėje tipinis Cx26

Kaip matome iš rezultatų – hipotezė nepaneigta, ląstelių šviesumas koreliuoja su pratekėjusia srove per ją – kuo didesnė pratekanti srovė per ląstelę – tuo didesnis ląstelės šviesumas, geresnė transfekcijos kokybė, daugiau atsidariusių puskanalių.

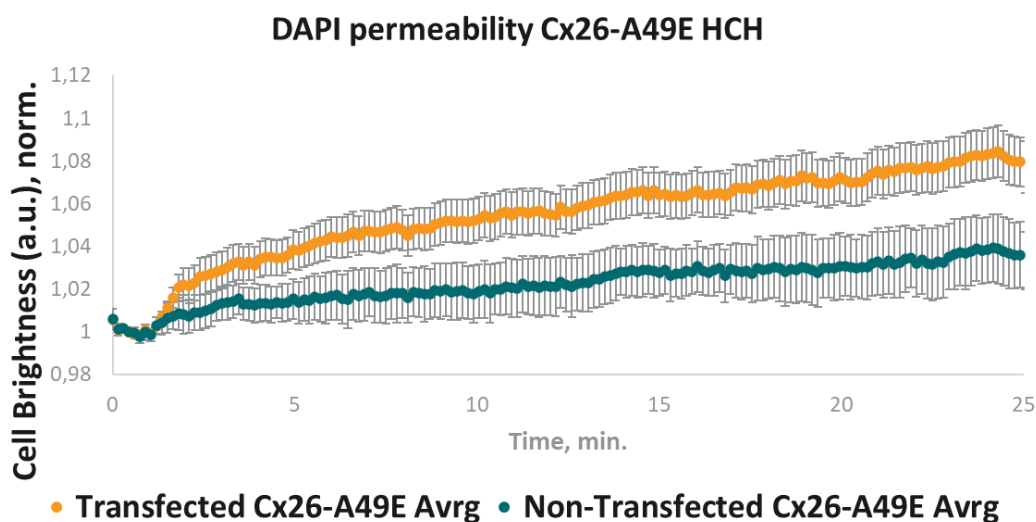
4.3. Dažų sklaidimo matavimų tyrimai

Atliekami dažų sklaidimo matavimų tyrimai siekiant patvirtinti hipotezę, jog ląstelių šviesumo intensyvumas per laiką intensyvėja, nes į ląsteles vis įsigeria daugiau dažų – kuo daugiau šių įsigeria, tuo transfekcija kokybiškesnė. Sužymėtų apdorojamų ląstelių nuotraukos pavyzdys pateiktas 28 pav., o rezultatai per laiką Cx26 ir Cx26-A49E variantui transfekuotom ir netransfekuotom ląstelėm pateikta 29-31 pav.

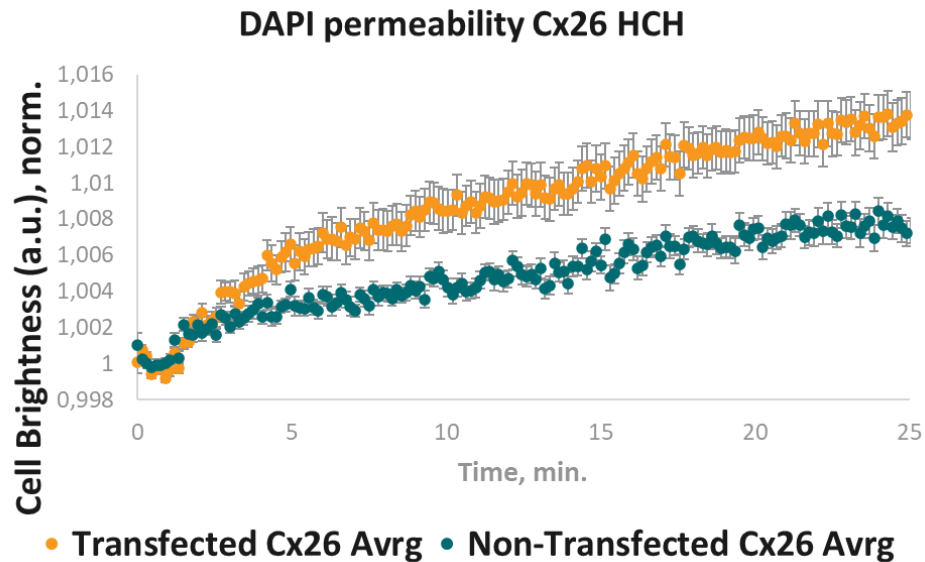


28 pav. Ląstelių segmentacijos vaizdas, naudojamas šviesumo kitimo matavimams, segmentuotas pagal apšviestas, normalių sąlygų nuotraukas segmentacijas, su išvestais papildomais duomenimis prie kiekvienos ląstelės

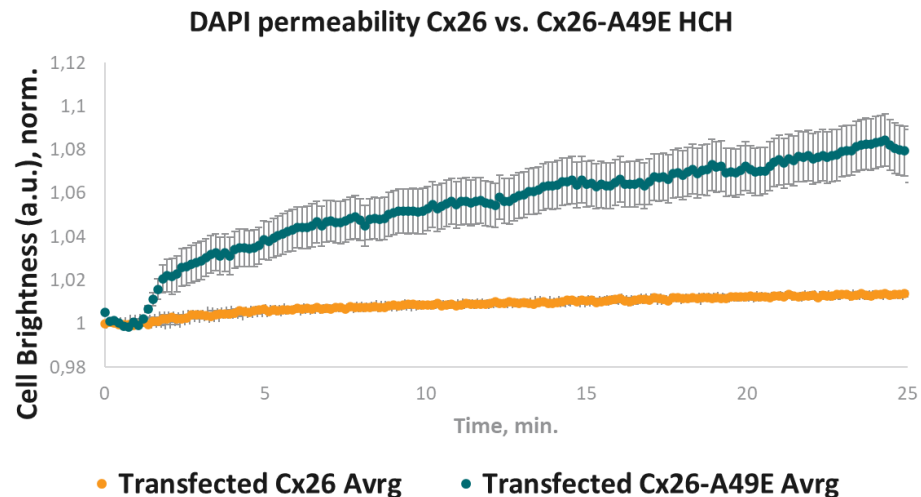
Kaip matome 28 pav. – pačių ląstelių nematyti, vietomis matyti tik jų švytėjimas, ten kur įvyko transfekcija, puskanaliai atsidarė ir DAPI dažai įsigėrė susijungti su RNR.



29 pav. Cx26-A49E transfekuotų ir netransfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas)



30 pav. Cx26 transfekuotų ir netransfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas)



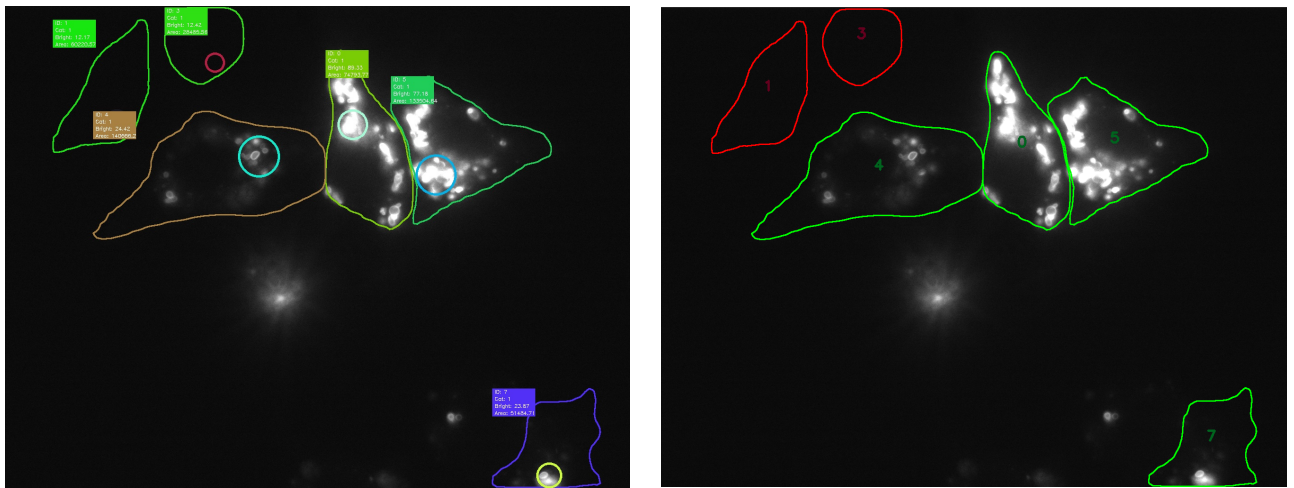
31 pav. Cx26-A49E prieš Cx26 transfekuotų ląstelių šviesumo kitimas laike (normalizuotas)

Kaip matome iš 29-31 pav. rezultatų – hipotezė nepaneigta, ląstelių šviesumas laike intensyvėja, ir transfekavusių ląstelių šviesumo kilimas yra intensyvesnis, nes šios pradeda švytėti, o netransfekavusių ląstelių švytėjimą galima paaiškinti minimaliu pašalinės šviesos patekimu į šias erdvėje nuo transfekavusių ląstelių.

Lyginant Cx26 ir Cx26-A49E variantą – pastarojo transfekcijos kokybė žymiai didesnė, atsidarė daugiau ląstelių puskanalių ir todėl ląstelių švytėjimas dėl DAPI dažų įtekėjimo intensyvesnis.

4.4. Transfekuotų ląstelių nustatymas

Ląstelių transfekciją galima nustatyti vos pasirinkus kartinę slenkstinę vertę tarp foninio ir segmentacijos šviesumo skirtumo. Šiuo atveju buvo pasirinkta vos 1.0 šviesumo skirtumo kartinė vertė (šviesumas tarp 0-255 verčių, ir viršijus 1.0 skirtumą – skaitome, jog ląstelė transfekavo), ši bene idealiai atpažino visas transfekavusias ląsteles. Rezultatai pateikti 32 pav.



32 pav. Transfektuotų ląstelių nustatymas (dešinėje) iš modelio ir po filtravimo išvestų rezultatų duomenų (kairėje) DAPI švytėjimo nuotraukai

Kaip matome iš rezultatų, praktiškai visos ląstelės teisingai atpažįstamos, kurios transfekavo, o transfekavo tos, kuriose vizualiai pastebimas švytėjimas. Vieninteliais atvejais kai tampa keblu automatizuotai atpažinti transfekavusias ląsteles – kai mėginėly yra ląstelių su defektais (plyšus ląstelės membrana) ir techniškai šios „negyvos“ ląstelės į išorę išmeta savo turinį ir fone atsiranda blukūs, dideli šviesumo taškai, kurių šviesa šiek tiek patenka ir į netransfekavusias ląsteles, taip sukuriant „false positive“ transfekavusias ląsteles naudojant tik 1.0 šviesumo kartinę vertę transfekcijos nustatymui. Išmestas turinys yra su RNR dalelėmis, taigi per stebimą zoną gali pasklisti visas plyšiosios ląstelės turinys ir sugadinti tos nuotraukos rezultatus – tokias nuotraukas reikia nufiltruoti, išmesti.

Išvados

1. Tyrimas suteikia papildomų įžvalgų į naujausių objektų segmentavimo modelių tikslumą, lyginant su tradiciniais paplitusiais metodais kaip „U-NET“. Šiame tyrime, iš modelių geriausiai pasirodė „Detectron2 Mask-RCNN50“ aplenkdamas tiek „YOLOv11“ objektiniam ir pikseliniame segmentavime, o prasčiausiai „U-NET“, kuris geba segmentuoti tik pikseliniame lygyje ir kurio tikslumas buvo bene prasčiausias 66.40 %, lyginant su „Detectron2 Mask-RCNN50“ 92.57 % pikseliniu tikslumu. Pažymėtina – „Detectron2“ modelio tikslumas itin nukenčia dėl daug perteklinių/„haliucionacinių“ segmentacijų, kurių nepadeda tinkamai pašalinti NMS naudojimas. Tenka kurti savus metodus, kurie pasiteisino, šioms išmesti ir sukurto IC koeficiento naudojimas filtravimui bei multi-poligonų šalinimas jo objektinio segmentavimo tikslumą pagerina net ~14 %, o preciziškumą ~17 %, kuomet pikseliniam turi mažai įtakos, 1-2% tikslumo rodiklių pagerėjimą, išskyrus jautrumo, kuris per tiek pat sumažėja. „YOLOv11“ modelis pasirodė prastai objektiniam segmentavime su 37.31 % tikslumu, nors geru 88.03 % preciziškumu. Standartinis „U-NET“ modelis netiktų objektų atpažinimo darbams, kuriuose reikia kiekvieną ląstelę atskirai analizuoti, bet šis suteikia lengvesnę galimybę palyginti šiame tyrime tirtus modelius su kitais egzistuojančiais, kadangi „U-NET“ modelio tyrimų literatūroje yra žymiai daugiau – sudėtinga rasti būtent „Detectron2 Mask-RCNN50“ ar „YOLOv11“ panaudojimo biologinių tyrimų literatūroje šiandieną.
2. Automatiniai modelio išvesti rezultatai stabilūs ir pakartotini, lyginant su žmogaus simuliuotais (šviesiausio apskritimo radimas). Tiek žmogaus tiek automatinio modelio rezultatai hipotezių nekeičia, bet šias patvirtina. Pažymėtina, jog žmogaus ir automatinio modelio rezultatų šviesumo intensyvumo vertės, koeficientai, šviesumo kilimo greitis skiriasi – tuo pačiu žmogaus žymėti rezultatai mažiau stabilūs (didesnė variacija per laiką), kuomet automatiniai ir naudojant visą ląstelės plotą yra stabilesni.
3. Nuspėti ar ląstelė transfekavo ar ne nereikia net atskiro modelio turint apšvitintą, švytinčių ląstelių nuotrauką – tai galima padaryti ranka nustatant kartinę šviesumo vertę tarp segmentacijos šviesumo ir foninio šviesumo skirtumo – apdorojimas netrunka nei kelių sekundžių, taigi kartinį koeficientą galima pakoreguoti ranka, prireikus. Nėra prasmės kurti tam atskiro modelio kuomet toks koeficientas, kaip naudotas 1.0 tyrime, jau praktiškai visas transfekavusias ir netransfekavusias ląsteles teisingai pažymėjo.
4. Sukurta ląstelių segmentavimo ir duomenų ištraukimo architektūra atlieka savo užduotį – geba segmentuoti ląsteles tikslumu 84.05 %, o preciziškumas netgi 97.16 %, taigi kai ląstelės aptinkamos, jos itin tikėtina, kad teisingos. Papildomi sukurti objektinio segmentavimo filtravimo algoritmai (IC ir multi-poligonų šalinimas) geba padidinti tikslumą net ~14 %, o preciziškumą ~17 %. Gautos segmentacijos yra tinkamos naudoti biologiniuose tyrimuose kur reikia apdoroti didelį kiekį nuotraukų greitai, tuomet iš tų segmentacijų ištraukti rezultatus. Sprendimo, kuris tiek segmentuoja, tiek ištraukia rodiklius fluorescencijos ir elektrofiziologijos tyrimams, literatūroje nebuvo rasta – sukurtas sprendimas apjungia dirbtinio intelekto modelių panaudojimą praktinėms biologinių tyrimų užduotims spręsti, kuriuose reikalinga didelio kiekio duomenų ląstelių kiekybinių parametrų, rodiklių analizė.

Literatūros sąrašas

1. Marwan E. El-Sabban, Lina F. Abi-Mosleh, Rabih S. Talhouk. Developmental regulation of Gap Junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation [interaktyvus] [žiūrėta 2023-10-10]. Prieiga per internetą: https://www.researchgate.net/publication/7277900_Developmental_Regulation_of_Gap_Junctions_and_Their_Role_in_Mammary_Epithelial_Cell_Differentiation
2. T. Kraujalis, L. Gudaitis, L. Kraujelienė, M. Snipas, N. Palacios-Prado. The Amino Terminal Domain and Modulation of Connexin36 Gap Junction Channels by Intracellular Magnesium Ions [interaktyvus] [žiūrėta 2023-10-30]. Prieiga per internetą: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.839223/full>
3. W. Souidene Mseddi, R. Ghali, M. Jmal, R. Attia. Fire Detection and Segmentation using YOLOv5 and U-NET [interaktyvus] [žiūrėta 2023-11-05]. Prieiga per internetą: <https://eurasip.org/Proceedings/Eusipco/Eusipco2021/pdfs/0000741.pdf>
4. R. Wang, D. Wang, D. Kang, X. Guo, C. Guo, M. Dongye, Y. Zhu, C. Chen, X. Zhang, E. Long, X. Wu, Z. Liu, D. Lin, J. Wang, K. Huang, H. Lin. An Artificial intelligent platform for live cell identification and the detection of cross-contamination [interaktyvus] [žiūrėta 2023-11-06]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7327366/>
5. T. Lin, M. Maire, S. Belongie, L. Bourdev, R. Girshick, J. Hays, P. Perona, D. Ramanan, C. Lawrence Zitnick, P. Dollar. Microsoft COCO: Common Objects in Context. [interaktyvus] [žiūrėta 2023-11-15]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/1405.0312.pdf>
6. O. Ronneberger, P. Fischer, T. Brox. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation [interaktyvus] [žiūrėta 2023-11-23]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/1505.04597.pdf>
7. „Detectron2“ dokumentacija [interaktyvus] [žiūrėta 2023-11-23]. Prieiga per internetą: <https://detectron2.readthedocs.io/en/latest/>
8. Hong-Bo Zhao. Connexin26 is responsible for anionic molecule permeability in the cochlea for intercellular signalling and metabolic communications [interaktyvus] [žiūrėta 2024-04-15]. Prieiga per internetą: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2548270/>
9. „Mask-RCNN“ modelio architektūra [interaktyvus] [žiūrėta 2024-04-30]. Prieiga per internetą: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fdevelopers.arcgis.com%2Fpython%2Fguide%2Fhow-maskrcnn-works%2F&psig=AOvVaw0ouI1XkgUj44IR2mTtxPkP&ust=1716291949150000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjhXqFwoTCMDVtfGTnIYDFQAAAAAdA AAAABAE>
10. FPN architektūra [interaktyvus] [žiūrėta 2024-04-30]. Prieiga per internetą: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fpaperswithcode.com%2Fmethod%2Ffpn&psig=AOvVaw0TKK1DOYbDZ19kgp3PTBaD&ust=1716293183398000&source>

=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjhxqFwoTCNiGkr6YnIYDFQAAAAAdA
AAAABAE

11. ResNet50 architektūra [interaktyvus] [žiūrėta 2024-04-30]. Prieiga per internetą: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Ftowardsdatascience.com%2Fthe-annotated-resnet-50-a6c536034758&psig=AOvVaw0DvDa7sTxxGWfODCAA7cXg&ust=1716293248100000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBQQjhxqFwoTCKim1uuYnIYDFQAAAAAdAAAAABAE>
12. S. Dimopoulos, C. E. Mayer, F. Rudolf, J. Stelling. Accurate cell segmentation in microscopy images using membrane patterns. [interaktyvus] [žiūrėta 2024-05-15]. Prieiga per internetą: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/18/2644/2475348>
13. O. Ronneberger, P. Fischer, T. Brox. U-NET: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-02-05]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/abs/1505.04597>
14. R. Azad, E. Khodapanah Aghdam, A. Rauland, Y. Jia, A. Haddadi Avval, A. Bozorgpour, S. Karimijafarbigloo, J. Paul Cohen, E. Adeli, D. Merhof. Medical Image Segmentation Review. The success of U-NET. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-02-20]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/abs/2211.14830>
15. G. Kim, W. Song, L. Zheng. Deep learning for cell segmentation. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-02]. Prieiga per internetą: <https://cs231n.stanford.edu/reports/2022/pdfs/144.pdf>
16. Y. Amitay, Y. Bussi, B. Feinstein, S. Bagon, I. Milo, L. Keren. CellSighter: a neural network to classify cells in highly multiplexed images. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-02]. Prieiga per internetą: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-40066-7>
17. R. Wang, D. Wang, D. Kang, X. Guo, C. Guo, M. Dongye, Y. Zhu, C. Chen, X. Zhang, E. Long, X. Wu, Z. Liu, D. Lin, J. Wang, K. Huang, H. Lin. An artificial intelligent platform for live cell identification and the detection of cross-contamination. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-02]. Prieiga per internetą: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7327366/>
18. C. Hu, S. He, Y. Jae Lee, Y. He, E. M. Kong, H. Li, M. A. Anastasio, G. Popescu. Live-dead assay on unlabeled cells using phase imaging with computational specificity. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-10]. Prieiga per internetą: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28214-x>
19. V. K. Verselis. Connexin hemichannels and cochlear function. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-11]. Prieiga per internetą: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5851822/>
20. N. Siddique, S. Paheding, C. P. Elkin, V. Devabhaktuni. U-Net and Its Variants for Medical Image Segmentation: A Review of Theory and Applications. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-12]. Prieiga per internetą: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/9446143>
21. M. Bortolozzi. What's the Function of Connexin 32 in the Peripheral Nervous System? [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per internetą:

- <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2018.00227/full>
22. S. Paunikar, L. Tamagnone. Connexin-43 in Cancer: Above and Beyond Gap Junctions! [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-17]. Prieiga per internetą: <https://www.mdpi.com/2072-6694/16/24/4191>
 23. A. Kirillov, E. Mintun, N. Ravi, H. Mao, C. Rolland, L. Gustafson, T. Xiao, S. Whitehead, A. C. Berg, W. Lo, P. Dollár, R. Girshick. Segment Anything. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-21]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/abs/2304.02643>
 24. L. Yang, C. You. Instance-U-Net and watershed: Improved segmentations for breast cancer cells. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-21]. Prieiga per internetą: https://cs230.stanford.edu/projects_fall_2018/reports/12353505.pdf
 25. O. Ali, H. Ali, S. A. A. Ayaz, A. Shahzad. Implementation of a Modified U-Net for Medical Image Segmentation on Edge Devices. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-21]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/abs/2206.02358>
 26. S. D. Deb, R. K. Jha. Modified Double U-Net Architecture for Medical Image Segmentation. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-21]. Prieiga per internetą: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9946418>
 27. R. Yilmaz, Z. Chen, Y. Wu, J. Stegmaier. Cellstyle: Improved Zero-Shot Cell Segmentation via Style Transfer. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-21]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/2503.08603>
 28. J. R. Terven, D. M. Cordova-Esparza. A Comprehensive Review of YOLO Architectures in Computer Vision: From YOLOv1 to YOLOv8 and YOLO-NAS. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-25]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/2304.00501>
 29. D. Müller, I. Soto-Rey, F. Kramer. Towards a Guideline for Evaluation Metrics in Medical Image Segmentation. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-25]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/2202.05273>
 30. A. O. Vuola, S. U. Akram, J. Kannala. Mask-RCNN and U-NET Ensembled for Nuclei Segmentation. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-25]. Prieiga per internetą: <https://arxiv.org/pdf/1901.10170>
 31. „Makense AI“ Segmentacijų žymėjimo įrankis COCO formatui. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-30]. Prieiga per internetą: <https://www.makesense.ai>
 32. „Detectron2“ modelių baziniai rezultatai. [interaktyvus] [žiūrėta 2025-03-30]. Prieiga per internetą: https://github.com/ethanweber/detectron2/blob/master/MODEL_ZOO.md

Priedai

1 priedas. „4th Baltics Biophysics Conference“ dalyvavimas, plakato pristatymas tema: „AI-Driven Analysis of Cell Imaging“



2 priedas. ICIST 2025 straipsnio priėmimas

ICIST 2025 notification for paper 5016

----- REVIEW 1 -----

SUBMISSION: 5016

TITLE: Modern AI methods comparison for HeLa cell segmentation

AUTHORS: Lukas Keršys, Andrius Kriščiūnas and Tadas Kraujalis

----- Overall evaluation -----

SCORE: 2 (accept)

----- TEXT:

This study provides a valuable comparative analysis of modern AI methods for HeLa cell segmentation, addressing a critical need for identifying optimal techniques tailored to specific applications. The research effectively evaluates U-NET, Detectron2 Mask-RCNN50, and YOLOv11 in the context of segmenting HeLa cells, which are extensively used in cell morphology studies, time-lapse imaging, and cell tracking. By employing pixel-based and object-based accuracy metrics, the study offers a comprehensive assessment of each method's performance, revealing the strengths and weaknesses of each approach.

The finding that Detectron2 Mask-RCNN50 demonstrates the highest accuracy on the test dataset, while YOLOv11 shows moderate performance and U-NET exhibits a significant decline, provides valuable insights for researchers seeking to optimize cell segmentation in their work. The study's detailed methodology, including the annotation process, cell imaging techniques, and model segmentation strategies, strengthens the reliability of the results. This research makes a significant contribution by offering practical guidance for selecting the most suitable AI method for HeLa cell segmentation, with implications for high-throughput drug screening, time-lapse imaging analyses, and tissue engineering strategies. This article meets the requirements for this type of article, therefore I recommend it for publication in the proceedings of the ICIST 2025 conference.

Kaunas University of Technology

Faculty of Informatics

IFM-3/1 gr.

Master study programme: **Artificial Intelligence Informatics**

stud.: **Lukas Keršys**

Topic of the final MA thesis: **Biological cell detection and their functionality evaluation using artificial intelligence methods**

Schedule for the work year 2023 - 2025

No.	Stage	Period of action		Expected result and the form of its presentation
		from	to	
1 st semester				
1.	Literature research	2023-09-30	2024-01-01	AI methods for cell detection, what is transfection, gap junctions
2.	Calculate Cell count from an image	2023-09-30	2024-01-01	The count of cells in an image
3.	Cell classification, segmentation: dead/alive/trash/bacteria	2023-09-30	2024-01-01	Classified cells in an image – contour
2 nd semester				
4.	System parameters/requirements definition	2024-01-16	2023-05-15	Accurate end requirements of system
5.	Cell luminance, paint propagation evaluation	2024-01-16	2023-06-10	The luminosity intensity number in 0-255 grayscale pixel intensity of a cell in an image
6.	Cell parameters gathering, presentation	2024-01-16	2023-06-10	Model is able to gather and export cell segmentation additional parameters
7.	Classification accuracy improvement	2024-01-16	2023-06-10	Alive cells accuracy at least 70%
8.	Additional literature research	2024-01-16	2023-06-10	Expanded literature research and added literature about cell pain propagation
9.	First stage model testing in practical environment	2024-05-15	2023-06-20	Model is able to segment images, export usable and accurate data to experts
3 rd semester				
10.	Cell transfection prediction, classification transfected/not	2024-06-20	2025-01-01	Model can predict the possible quality of transfection for given cells image
11.	Paint propagation coefficient calculation	2024-06-20	2024-08-31	Luminance already exists, just need C(t) table for each cell/paint to calculate the coefficient
12.	Model accuracy improvement	2024-06-20	2025-11-01	“Alive cells” reach at least 80% of accuracy

13.	Beautify this report, finalize it, and expand literature research	2024-11-30	2025-01-20	This report qualifies for most requirements, leftover micro-adjustments finished
4 th semester				
14.	Final results analysis	2024-01-01	2025-03-01	Analysis of correlations, hypothesis from the seen results
15.	Beautify this report	2025-01-01	2025-05-14	This report qualifies for all requirements