**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**

**«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені Ігоря Сікорського»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

|  |  |
| --- | --- |
| «На правах рукопису»  УДК 57.033+004.046 | «До захисту допущено»  В.о. завідувача кафедри д.т.н., доц.  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Наталія ГОЛУБ  “\_\_\_”\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2021р. |

**Магістерська дисертація**

**на здобуття ступеня магістра**

**за освітньо-професійною програмою «Біотехнологіі»**

**зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**“Застосування нейронних мереж для оцінки кольорових та структурних змін у клітинах”**

Виконав: студент VI курсу, групи БМ-01мп

Калініченко Євгеній Олександрович \_\_\_\_\_\_\_\_

(підпис)

Науковий керівник проф. кафедри, д.б.н., професор Горго Ю.П. \_\_\_\_\_\_\_\_\_

(підпис)

Консультант к.б.н., ст. наук. співр. Грецький І.О.

(назва розділу) (науковий ступінь, вчене звання, , прізвище, ініціали) (підпис)

Консультант старт-ап к.е.н., доц. Ткаченко Т.П. \_\_\_\_\_\_\_\_\_

(назва розділу) (науковий ступінь, вчене звання, , прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент ст.н.сп. МННЦІТіС НАНУ, к.б.н., ст.н.сп. Гонтар Т.М.

(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2021 року

**Національний технічний університет України**

**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. завідувача кафедри

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Наталія ГОЛУБ

«\_\_\_ »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2021 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на магістерську дисертацію студенту**

**Прізвище, ім’я, по батькові**

1. Тема дисертації «Тема», науковий керівник дисертації Прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання, затверджені наказом по університету від «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ р. №\_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом дисертації

3. Об’єкт дослідження

4. Вихідні дані

5. Перелік завдань, які потрібно розробити

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу

7. Орієнтовний перелік публікацій

8. Консультанти розділів дисертації\*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Прізвище, ініціали та посада  консультанта | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
|  |  |  |  |

9. Дата видачі завдання

\* Якщо визначені консультанти. Консультантом не може бути зазначено наукового керівника магістерської дисертації

Календарний план

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № з/п | Назва етапів виконання  магістерської дисертації | Термін виконання етапів магістерської дисертації | Примітка |
| 1 | Формування літературного огляду. | 16.09.21 |  |
| 2 | Пошук методів оцінки кольорових і структурних змін і клітинах. | 29.09.21 |  |
| 3 | Створення моделі програми. | 11.10.21 |  |
| 4 | Перевірка навчання моделі. | 28.10.21 |  |
| 5 | Оформлення результатів досліду. | 10.11.21 |  |
| 6 | Розробка стартап-проекту. | 26.11.21 |  |
| 7 | Написання висновків, оформлення списку використаної літератури. | 5.12.21 |  |
|  |  |  |  |

Студент Власне ім’я, ПРІЗВИЩЕ

Науковий керівник Власне ім’я, ПРІЗВИЩЕ

**РЕФЕРАТ**

Магістерська дисертація містить 79 сторінок, 26 таблиць, 17 рисунків, 45 посилань.

В роботі була використана реакція метахромазії – специфічної форми агрегації барвника, яка характеризується утворенням нових міжмолекулярних зв’язків між сусідніми молекулами барвника. Характеристики метахромазії використовується в біологічних та медичних дослідженнях для вивчення структури та функціональної активності клітин та тканин, а також для виявлення патологічних процесів.

В роботі в якості біосистеми клітинного рівня організації використовувалась культура дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* – зручної моделі еукаріотичної клітини. Волютинові гранули дріжджів у відповідь на зміну рівня геомагнітної активності змінюють колір при фарбуванні клітин метиленовим синім від синього до червоного. На основі тривалого монітиронгу цієї реакції і впливу геомагнітного поля, був створений набір даних, який використовувався у цій роботі для навчання і тестування нейронних мереж.

Для виконання завдань і досягненню мети було протестовано створений датасет на архітектурі U-net та адаптованої архітектурі ResNet нейронних мереж і були визначені ефективність використання цих архітектур. Дослідженням встановлено, що архітектури U-net та ResNet ефективно справляються з завданнями сегментації та визначенням метахромазії на зображеннях реакції метахромазії волютинових гранул дріжджів. При цьому архітектура U-net мала достатню точність з похибкою в 3,85% при оцінці кількості клітин. Розроблена архітектура ResNet дозволяє реєструвати сегментацію клітин з похибкою на рівні 10,1%, що свідчить про достатній рівень навченості моделі.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** РЕАКЦІЯ МЕТАХРОМАЗІЇ, ЗГОРТКОВІ НЕЙРОННІ МЕРЕЖІ, МЕТАХРОМАЗІЯ, RESNET.

**ABSTRACT**

The master's dissertation contains 79 pages, 26 tables, 17 figures, 45 references.

The reaction used metachromasia – a specific form of dye aggregation, which is characterized by the formation of new intermolecular bonds between neighboring dye molecules. Characteristics of metachromasia is used in biological and medical research to study the structure and functional activity of cells and tissues, as well as to detect pathological processes.

The yeast culture Saccharomyces cerevisiae, a convenient model of a eukaryotic cell, was used as a biosystem at the cellular level of the organization. Yeast volutin granules change color when cells are stained with methylene blue from blue to red in response to changes in the level of geomagnetic activity. Based on long-term monitoring of this reaction and the influence of the geomagnetic field, a set of data was created, which was used in this work for training and testing of neural networks.

To perform the tasks and achieve the goal, the created dataset on the U-net architecture and the adapted ResNet architecture of neural networks was tested and the efficiency of using these architectures was determined. The study found that the U-net and ResNet architectures effectively cope with the tasks of segmentation and determination of metachromasia in images of the reaction of metachromasia of volute yeast granules. The U-net architecture had sufficient accuracy with an error of 3.85% when estimating the number of cells. The developed ResNet architecture allows to register the segmentation of cells with an error of 10.1%, which indicates a sufficient level of learning of the model.

**KEY WORDS:** METACHROMASIA REACTION, CONVOLUTION NEURAL NETWORKS, METACHROMASIA, RESNET.

# ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

poly Р – поліфосфати.

РМТХ – реакція метахромазії.

МТХ – метахромазія.

ЗНМ – згорткові нейронні мережі.

БМЗ – біомедичні зображення.

**ЗМІСТ**

[РЕФЕРАТ 2](#_Toc89611089)

[ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ 4](#_Toc89611090)

[ВСТУП 6](#_Toc89611091)

[1.1 Метахроматичні явища . 10](#_Toc89611092)

[1.2 Гранули поліфосфату 11](#_Toc89611093)

[1.3 Взаємодія гранул поліфосфату з барвниками 13](#_Toc89611094)

[1.4 Нейронні мережі та їх властивості 18](#_Toc89611095)

[1.5 Згорткові нейронні мережі 19](#_Toc89611096)

[2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 28](#_Toc89611097)

[2.1 Методи сегментації мікроскопічного зображення 28](#_Toc89611098)

[2.2 Методика реакції метахромазії 32](#_Toc89611099)

[2.3 Особливості застосування нейронних мереж при оцінці світлових змін в клітинах 33](#_Toc89611100)

[2.4 Метод підрахунку клітин 38](#_Toc89611101)

[3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ 42](#_Toc89611102)

[4 РОЗРОБКА ІНФОРМАЦІЙНОГО СТАРТАП-ПРОЕКТУ 51](#_Toc89611105)

[4.1 Резюме стартап-проекту 51](#_Toc89611106)

[4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу 54](#_Toc89611107)

[4.3 Визначення ключових факторів успіху проекту 56](#_Toc89611108)

[4.4 Визначення потенційних споживачів 58](#_Toc89611109)

[4.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку 61](#_Toc89611110)

[4.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту 64](#_Toc89611111)

[4.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними 66](#_Toc89611112)

[ВИСНОВКИ 72](#_Toc89611113)

[СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 73](#_Toc89611115)

ВСТУП

**Актуальність обраної теми.** В роботі була використана реакція метахромазії – специфічної форми агрегації барвника, яка характеризується утворенням нових міжмолекулярних зв’язків між сусідніми молекулами барвника. Характеристики метахромазії використовується в біологічних та медичних дослідженнях для вивчення структури та функціональної активності клітин та тканин, а також для виявлення патологічних процесів.

Вважаючи на важливість *Saccharomyces cerevisiae* як модельного організму, на цьому об`єкті відбуваються дослідження забарвлення волютинових гранул при реакції метахромазії та при дії факторів геліогеофізичного походження [1]. Однак, механізм оцінки проходження реакції метахромазії дріжджів досконало не вивчений.

Кількість клітин та їх характеристик є важливим показником у дослідженнях функцій клітин, таких як регуляція клітинного циклу, моніторинг росту та проліферації клітин. Однак встановлення цих параметрів трудомістке завдання, яке часто займає багато часу. Традиційно лабораторії покладаються на механічні (візуальні, ручні) методи. Така технологія візуалізації широко використовується в сучасних дослідженнях підрахунку клітин.

Ці технології візуалізації мають недоліки у вигляді, низької чутливості і специфічності, низької відтворюваності результатів і тривалий процес виявлення та перерахування клітин. Цей факт підкреслює нагальну потребу в розробці та вдосконаленні швидких і автоматизованих методів підрахунку клітин. Деякі автоматизовані робочі процеси та програмні інструменти для виконання завдання підрахунку клітин вже існують [1,2,6], але вони можуть бути дорогими, з закритим кодом і не можуть належним чином вирішувати проблеми з кількісною оцінкою помилок. Одним із простих підходів до визначення кількості клітин має бути розробка моделі на основі згорткової нейронної мережі для виявлення та сегментації об’єктів, яка включає ключові визначальні комбінації морфологічних ознак, таких як кількість клітин та значення кольору.

Наскільки відомо, не існує наборів даних золотого стандарту зображення та сегментації для дріжджів або нейронної мережі, навчених на таких наборах даних. Дані навчання у вигляді ручних анотацій клітинних масок є дорогим і трудомістким завданням, особливо якщо в них потрібно включати модифіковані організми, які важливі для багатьох лабораторій. Для точної сегментації людям-анотаторам потрібен досвід роботи зі зображеннями дріжджових клітин. Крім того, широко не відомо, яка з багатьох доступних архітектур штучних нейронних мереж найкраще підходить, які недоліки кожної з них і як їх можна компенсувати. *Актуальність* дослідження полягає в використанні нейронних мереж з різними архітектурами для оцінки кількісних характеристик реакції метахромазії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Останнім часом у машинному навчанні відбулися різкі зміни, які викликані проривами в штучних [нейронних мережах](https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/neural-networks) [2,10], які часто називають глибоким навчанням – набором методів і алгоритмів, які дозволяють комп’ютерам виявляти складні закономірності у великих масивах даних. Такий розвиток спрямований у напрямку автоматизації та створення програмних рішень для більшості біологічних задач, і дослідження різних типів змін в клітинах не виключення.

**Мета та завдання дослідження**

Метою дослідження була розробка моделі програми на основі архітектури згорткових нейронних мереж, аналіз її недоліків та переваг, визначення особливостей їх використання для вивчення явища метахромазії у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

Згідно з цим, представлено такі **завдання**:

1. Аналіз та порівняння використання різних архітектур нейронних мереж для оцінки кількості, структури і кольорового забарвлення клітин.
2. Створити програмне забезпечення на основі згорткової нейронної мережі для аналізу зображень клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.
3. За результатами отриманих експериментальних даних встановити ефективність використання програмних засобів на основі нейронних мереж для визначення кількісних характеристик прояву реакції метахромазії в волютинових гранулах дріжджів*.*
4. Розробити стартап-проєкт на основі отриманих даних.

**Об`єктом досліджень** є адаптація використаннятехнології нейронних мереж для кількісної і якісної оцінок змін в клітинах*.*

**Предметом дослідження** єефективність застосуваннянейронних мереж при використанні їх в якості засобу аналізу світлових і структурних змін в клітинах.

**Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше виявлено, що архітектури раніше досліджуваного програмного забезпечення моделі нейронних мереж U-net та створеної в цій роботі моделі ResNet є оптимальними для вирішення завдань сегментації клітин, оцінки структурних і кольорових змін.

Використання архітектури U-net має низьке значення відносної похибки в 3,85%, що вказує на високий рівень точності, а розроблена архітектура ResNet дозволяє реєструвати сегментацію клітин з відносною похибкою в 10,1%, що свідчить про достатній рівень навченості моделі.

**Практичне значення одержаних результатів**

Результати дослідження можна використовувати для більш ефективного вивчення структурних та оптичних змін у клітинах *Saccharomyces cerevisiae,* для визначеннявзаємозв`язку між впливом геомагнітного поля на реакцію метахромазії.

**Апробація результатів**

1. Калініченко Є.О., Грецький І.О., Горго Ю.П.ВИКОРИСТАННЯ МОДЕЛЕЙ НЕЙРОННИХ МЕРЕЖ У БІОТЕХНОЛОГІЇ. ХІV Всеукраїнська науково – практична конференція «Біотехнологія XXI століття» 24.04.2020, Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського, c.122.

2. Горго Ю.П., Грецький І.О., Калініченко Є.О.Особливості застосування нейронних мереж у біотехнології. Мат. XIV міжн. конф. по біоніці і прикладній біофізиці, 4-5 11 2021, Київ, 2021, с. 12-14.

Висловлюємо подяку співробітникам відділу промислової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за допомогу та цінні зауваження при виконанні роботи.

**1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

## 1.1 Метахроматичні явища

На сьогоднішній день існує значна кількість даних про вплив космічної погоди на біологічні процеси. Зв'язок між поведінкою мікроорганізмів і космофізичними факторами знайшов відображення в біоастрономічному ефекті Чижевського-Вельховера [2,3]. Цей ефект заснований на застосуванні метахроматичної реакції гранул волютина у фосфатах, забарвлених такими основними барвниками, як метиленовий і толуїдиновий синій [3]. В результаті тривалого моніторингу цього показника у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* було показано, що метахроматичне фарбування гранул має ритмічність і пов'язано з космічною погодою [1,4].

Реакцію метахромазії пояснюють здатністю молекул барвника, зв'язуючись з молекулами поліфосфатів, набувати збільшеної здатності до димеризації, що призводить до зміни спектру поглинання барвника. Ці взаємодії залежать від довжини ланцюга та конформації поліфосфатів. У лабораторних умовах зміна метахромазії досягається за допомогою різних факторів: анаеробіоз, низька температура, кислотність. Є дані, що активізація геомагнітного поля впливає на стан та структуру внутрішньоклітинної водної компоненти, на іонні взаємодії, що призводить до зміни конформації поліфосфатів і при фарбуванні реалізується у зміні забарвлення [3,5].

Моделювання метахроматичного фарбування *in vitro* з використанням розчинів неорганічного поліфосфату з іншими сполуками показало, що ця реакція можлива за низьких концентрацій цих полімерів. Вплив низьких концентрацій був більш вираженим зі збільшенням довжини ланцюга поліфосфату. Інгібування розчину метахромазії з додаванням білка та хлориду кальцію вказувало на те, що ця реакція пов’язана з наявністю протонованих ділянок у полімерах [5]. Передбачається, що метахроматичне фарбування гранул волютина *in vivo* може залежати від інших умов, включаючи конформаційну реструктуризацію полімеру або фазові переходи. Таким чином, питання, про метахроматичну реакцію внутрішньоклітинних поліфосфатних гранул на зміни космічної погоди обумовлена ​​відповіддю на пов’язаний стрес залишається не зрозумілим.

Метахромазія давно використовується в біологічних та медичних дослідженнях для вивчення структури та функціональної активності клітин та тканин, а також для виявлення патологічних процесів. Загадковими є періодичні та квазіперіодичні варіації метахромазії у часі. Причиною таких варіацій різні автори називали природні чинники, які контролюються космічною погодою. В останні десятиліття така думка знаходить експериментальне підтвердження, зокрема виявлено кореляцію індексів метахромазії з потоком космічних променів. Обговорюється чутливість цієї системи до електромагнітних дій. Однак зазначений феномен все ще далекий від розуміння його природи [5].

## 1.2 Гранули поліфосфату

Неорганічні поліфосфати – це найдавніші молекули, які супроводжували біологічні об’єкти на всіх етапах еволюції [4]. Гранули волютину є внутрішньоклітинними структурами, які широко поширені серед мікроорганізмів як прокаріотів, так і еукаріотів. Основним компонентом гранул є неорганічні поліфосфати. Відомо, що ці полімери виконують різні функції залежно від локалізації в клітині. Передбачається, що однією з цих функцій може бути прийом космофізичних сигналів [4].

Формування еволюційно-адаптивного сценарію функціонування давніх біосистем відбувалося, насамперед, під дією геліо- та геофізичних факторів. Можна припустити, що варіація цих умов брала участь у формуванні ритмічних біологічних процесів за участю поліфосфатів. Таким чином, дослідження неорганічних поліфосфатних особливостей гранул волютину, що виявляються за допомогою метахроматичного фарбування, може наблизити нас до розуміння механізмів біотропної дії космічної погоди.

Гранули волютина інтенсивно базофільні, кислотостійкі гранули, які забарвлюються метахроматично толуїдиновим або метиленовим синім, іноді їх називають метахроматичними гранулами або гранулами Бебса-Ернста. Було показано, що вони зустрічаються в найрізноманітніших бактеріях, грибах, дріжджах, водоростях і найпростіших [6].

Завдяки досягненню нових аналітичних методів вивчення неорганічного поліфосфату у прокаріотичних та еукаріотичних клітинах стало новою темою досліджень у біотехнології, біохімії та молекулярній біології. Серед функцій polyP у клітинному метаболізмі є його життєво важлива роль у реакції на стрес та адаптації до стаціонарної фази.

Гранули також можуть бути виявлені за допомогою електронної мікроскопії, оскільки вони мають високу електронну непрозорість, мають чіткі межі і мають тенденцію плавитися, "вибухати" або частково розпадатися під інтенсивним електронним бомбардуванням. Хімічна природа гранул волютина все ще відкрита для обговорення, оскільки не було проведено виділення і хімічної характеристики чистих гранул.

Був проведений дослід для дослідження ролі поліфосфатів в реакції метахромазії. В субкультурі клітин з дефіцитом фосфату на багатому фосфатами середовищі єдиною фракцією, яка йшла паралельно зі ступенем фарбування волютином, була нерозчинна в трихлороцтовій кислоті фракція поліметафосфату, на частку якої припадало до 8 % від загального вмісту фосфору в багатих волютином клітинах [6].

Крім того, це була єдина фракція, яка давала метахроматичну реакцію в розчині з толуїдиновим синім. Ці результати свідчать про те, що поліметафосфат відповідає за фарбування волютинових гранул і що він утворюється в умовах культивування, в яких в кінці періоду зростання присутній надлишок вуглецю і джерела енергії разом з достатньою кількістю іонів фосфату, калію і магнію. Волютин або відсутній, або присутній у невеликих кількостях під час експоненціальної фази росту. Таким чином, були отримані активно зростаючі клітини, які синтезували поліметафосфат набагато вище рівня, зазвичай одержуваного в старих культурах.

Неорганічний поліфосфат є полімером ортофосфату,який присутній у всіх живих організмах рolyP і описаний у трьох молекулярних структурах: лінійній, циклічній, також відомий як метафосфати, і розгалужений, також відомий як ультрафосфати (рис. 1.1).

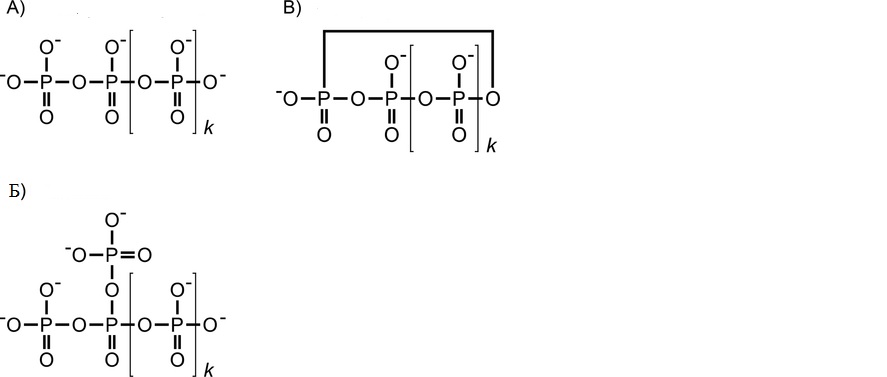


Рисунок 1.1 – Структура поліфосфату. Показані молекулярні структури лінійного поліфосфату (А), розгалуженого поліфосфату (Б) та  циклічного поліфосфату (В) [6].

## 1.3 Взаємодія гранул поліфосфату з барвниками

Метахромазія описує зсув спектру поглинання барвника, коли він зв’язується з певною речовиною. Метахромазія може бути використана для виявлення рolyP з, наприклад, метиленовим або толуїдиновим синім. PolyP викликає зсув у спектрі поглинання метиленового синього приблизно від 630 до 530 нм [6].

Оскільки рolyP зберігається в закритих мембраною відсіках у еукаріотів, барвники нейтральний червоний і тетрациклін можуть виявляти поліП неруйнівними методами, такими як світлова мікроскопія та проточна цитометрія. Нейтральний червоний існує у двох формах. При лужному та нейтральному рН молекула депротонована, незаряджена, проникна для мембрани та поглинає світло при 450 нм. При кислому рН барвник протонований, заряджений, мембранонепроникний і поглинає світло при 535 нм. Обидві форми випромінюють світло на 636 нм. Нейтральний червоний уловлюється у кислих poly P-вмісних відсіках. Інтенсивність флуоресценції тетрацикліну збільшується кальцієм і магнієм, які зазвичай використовуються клітинами як протиіони poly P в закритих мембраною відсіка [7]. Оскільки нейтральний червоний і тетрациклін виявляють поліР лише опосередковано, їхня специфічність щодо poly P низька.

Клітини з дефіцитом poly P демонструють безліч різних фенотипових ознак, подібних до плейотропних фенотипів, які демонструють клітини з дефіцитом шаперона. Бактерії або одноклітинні еукаріоти без poly P чутливі до ряду різних стресових умов, включаючи тепловий шок і вплив важких металів, і мають дефекти вірулентності, утворення біоплівок і рухливості [8]. Відомо, що у вищих еукаріотів poly P відіграє центральну роль у згортанні крові та бере участь в апоптозі, активації та передачі сигналів нейронами [8].

Основну фізіологічну роль поліфосфатів полягає у зберіганні фосфатів і енергії , хелатування металів, буферизацію pH та регуляторні взаємодії [6]. Однак не існує задовільного пояснення загального механізму, за допомогою якого polyP впливає на ці, здавалося б, не пов’язані процеси в клітині. Було показано [8], що бактерії у відповідь на окислювальний стрес, що розгортає білок, перенаправляють клітинну АТФ на poly P, що призводить до більш ніж 10 000-кратного збільшення стійкості до стрессу [8].

Для тіазинових сполук характерне явище метахромазії, яка проявляється у вигляді колірної та тональної варіабельності забарвлення клітин та біологічних тканин. Є численні експериментальні докази, що метахромазія обумовлена ​​утворенням полімерних комплексів цих молекул при взаємодії з поліаніонними полімерами. Метахромазія нерідко проявляється в популяції клітин, які знаходяться в одних і тих же постійних умовах і умовно в тому самому фізіологічному стані, але при фарбуванні все одно мають різні колірні і тональні особливості. Ще більш загадковими є періодичні та квазіперіодичні варіації метахромазії у часі, які пов'язують із впливом факторів, пов'язаних із космічною погодою [1] або які неможливо контролювати в експерименті [4].

Неорганічні поліфосфати, як полііонні полімери, є невід'ємним компонентом про- та еукаріотичних клітин, вони є лінійними полімерами ортофосфорної кислоти різної довжини і розгалуженості, в якій кислотні залишки пов'язані між собою ангідридними зв'язками. У зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення оптичних властивостей тіазинового барвника метиленового синього в розчинах неорганічних поліфосфатів з різною довжиною полімерного ланцюга та різної концентрації, а також моделювання асоціатів барвника в комплексі з поліфосфатами на основі квантово-механічних розрахунків спектрів адсорбційного даного барвника [9]. Результати дослідження показали, що основні параметри спектрів поглинання у видимій області для метиленового синього при його взаємодії з поліфосфат сильно варіюють залежно від концентрації полімеру. Вклад довжини поліфосфатного ланцюга у варіабельність спектрів поглинання проявляється меншою мірою [1,5].

Клітини дріжджів захищені клітинною стінкою, яка відіграє важливу роль в обміні речовин з навколишнім середовищем. Структура клітинної стінки динамічна і може адаптуватися до різних фізіологічних станів або умов навколишнього середовища. Для дослідження морфологічних змін цінним інструментом є селективне фарбування.

Толуїдиновий та метиленовий синій є основними тіазиновими метахроматичними барвниками з високою спорідненістю до кислих компонентів тканини, тим самим забарвлюючи тканини, які багаті ДНК і РНК. Він знайшов широке застосування як для життєво важливого фарбування живих тканин, так і як спеціальне фарбування завдяки його метахроматичній властивості.

Метахромазію пов’язують із накопиченням катіонів барвника в місцях високої щільності аніонних груп у тканині. Укладання вкорочує довжину хвилі максимального поглинання, в гіпохромний зсув, так що максимальна довжина хвилі в спектрі переданого світла робить спостережуваний колір червоним замість синього [10].

Хромотропи – речовини, які піддаються реакції метахромазії, несуть кислотні групи з мінімальною щільністю не більше 0,5 нм між сусідніми негативно зарядженими групами. Вони змінюють колір метахроматичних барвників. В основному, сили Ван-дер-Ваальса утримують барвник разом, утворюючи димери, тримери або полімери.  Барвник існує в звичайній мономерній (ортохроматичній) формі до потенційної полімерної (метахроматичної) форми. Негативні заряди на хромотропах притягують позитивно заряджені полярні групи на барвнику, що призводить до агрегації барвника до барвника в спеціалізованій упорядкованій формі, утворюючи полімерну форму. Існують три форми метахромазії альфа (α), бета (β) і гамма (g), що дають різноманітні кольори [10].

На рисунках 1.2, 1.3, 1.4, представлено основні типи прояву явища метахромазії в мікроорганізму S*accharomyces cerevisiae.*

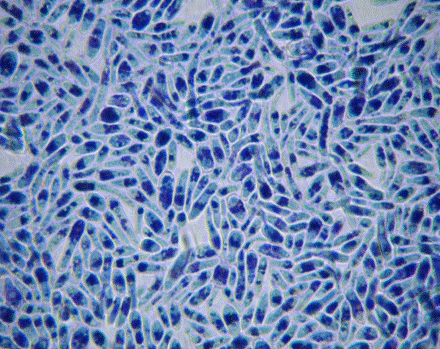


Рисунок 1.2 – 1 тип реакції метахромазії. Збільшення х1000

Можна спостерігати, що волютинові гранули забарвлені у синій колір, отже, реакція метахромазії відсутня.

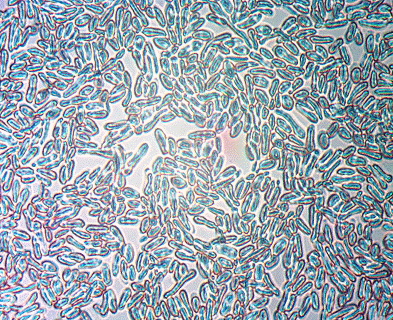


Рисунок 1.3 – 2 тип реакції метахромазії. Збільшення х1000

Волютинові гранули набувають фіолетового забарвлення, що властиво для слабкого прояву – другого типу реакції.

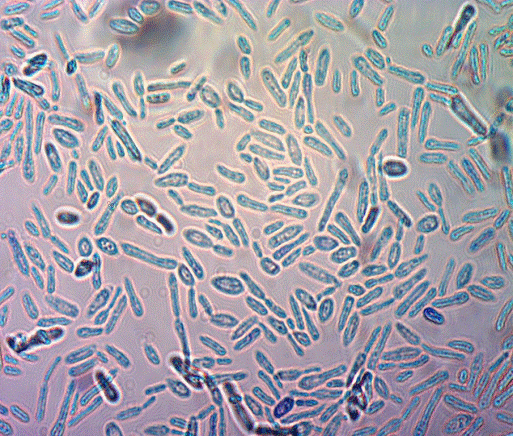
****

Рисунок 1.4 – 3 тип реакції метахромазії. Збільшення х1000

Зміна кольору завжди відбувається від синього або фіолетового барвника до жовтого або червоного кольору плями, що означає, що поглинання кольору зміщується до менших довжин хвиль, залишаючи видимими лише найдовші довжини хвилі. Вважається, що це представляє собою полімеризацію барвника. Чим більше ступінь полімеризації, тим сильніше метахромазія. Для реакції метахромазії потрібна вода між молекулами барвника для утворення полімеру [9].

Зміна кольору волютинових гранул, яку обумовлюють особливості фосфорного обміну, відіграє суттєву роль у чутливості дріжджових клітин *S. cerevisiae* до впливів збурень геомагнітного поля (ГМП). Це проявляється у варіативності забарвлення і рухливості поліфосфат вмістних волютинових гранул під дією ГМП [3]. Але суб’єктивне сприйняття в мікроскопі трьох форм метахромазії альфа (α), бета (β) і гама (g), що дають різноманітні кольори, вже не є достатнім для визначення і кількісної оцінки таких змін. Ми пропонуємо для такого сприйняття використовувати нейронні мережі та їх властивості.

## 1.4 Нейронні мережі та їх властивості

Дослідження з обробки медичних зображень стали центром уваги в області комп’ютерного зору. Зі стрімким розвитком штучного інтелекту, особливо глибокого навчання, методи сегментації зображень, засновані на глибокому навчанні, досягли хороших результатів у сфері сегментації зображень. У порівнянні з традиційними методами машинного навчання та комп’ютерного зору, глибоке навчання має певні переваги в точності та швидкості сегментації. Тому використання глибокого навчання для сегментації медичних зображень може ефективно допомогти вченим підтвердити або спростувати висунуті теорії, кількісно оцінити певні властивості та знайти нові закономірності.

При розробці нових і вдосконалених архітектур згорткових нейронних мереж ці компоненти поєднуються все більш складними та взаємопов’язаними способами або навіть замінюються іншими, більш зручними операціями. При розробці нейронних мереж для певної задачі необхідно враховувати кілька факторів, включаючи розуміння задачі, яку потрібно вирішити, і вимог, які необхідно виконати, з’ясувати, як найкраще передати дані в мережу, і оптимально використовувати свій бюджет на обчислювальні ресурси.

На початку сучасного глибокого навчання зазвичай використовували дуже прості комбінації будівельних блоків, як у Lenet і AlexNet [10]. Більш пізні архітектури мереж є набагато складнішими, кожне наступне покоління будується на основі ідей попередніх архітектур, що призводить до вдосконалення.

В останні роки згорткові нейронні мережі зарекомендували себе як ефективні та потужні обчислювальні моделі для задач сегментації. ЗНМ замінюють складні класичні алгоритми обробки зображень моделями на основі нейронних мереж, які навчаються на достатньо великому та різноманітному наборі прикладів. Ключова перевага ЗНМ перед підходами, які не базуються на навчанні, полягає в тому, що для покращення прогнозів для нових випадків або умов не потрібні принципово нові ідеї.

Глибоке навчання — це дослідницький напрямок розвитку машинного навчання та штучного інтелекту. Він використовує глибокі нейронні мережі для імітації процесу навчання людського мозку та вилучення функцій із великомасштабних даних. Нейронна мережа складається з багатьох нейронів. Кожен нейрон можна розглядати як невелику одиницю обробки інформації. Нейрони пов’язані один з одним певним чином, щоб утворити всю глибоку нейронну мережу. Поява нейронних мереж робить можливою наскрізну обробку зображень. Коли приховані шари мережі розвиваються до кількох шарів, це називається глибоким навчанням. Щоб вирішити складну проблему глибокого навчання мережі, потрібна пошарова ініціалізація та пакетування, що робить глибоке навчання головним драйвером наукового розвитку.

У сфері комп’ютерного зору глибоке навчання в основному використовується для зменшення розмірності даних, розпізнавання рукописних чисел, розпізнавання образів та пошук закономірностей. Розпізнавання зображень, відновлення зображень, сегментація зображень, відстеження об’єктів, показують дуже високу ефективність [11].

## 1.5 Згорткові нейронні мережі

Згорткова нейронна мереж — це класична модель, створена за допомогою поєднання глибокого навчання та технології обробки зображень. Як одна з найбільш репрезентативних нейронних мереж у сфері технологій глибокого навчання, вона зробила багато проривів у сфері аналізу та обробки зображень. Основна ідея полягає в тому, щоб розділити ваги відображення ознак у різних позиціях мережі попереднього рівня та зменшити кількість параметрів за допомогою просторових відносних зв’язків для підвищення ефективності навчання. Від згорткової нейронної мережі до поточного широкого застосування ця технологія пережила стадію теоретичного початку, експериментальної розробки, широкомасштабного застосування та поглибленого дослідження.

ЗНМ складається з вхідного шару, вихідного шару та кількох прихованих шарів. Кожен шар у прихованому шарі виконує певну операцію, таку як згортка, об’єднання та активація. Вхідний шар підключений до вхідного зображення, і кількість нейронів у цьому шарі є пікселем вхідного зображення. Середній згортковий шар виконує вилучення ознак на вхідних даних за допомогою операції згортки для отримання карти об’єктів. Результат операції згортки залежить від налаштування параметрів у ядрі згортки. Рівень об’єднання за згортковим шаром фільтрує та вибирає карти ознак, спрощуючи обчислювальну складність усієї мережі. Через повністю зв’язаний шар всі нейрони попереднього шару повністю пов’язані. Отримане вихідне значення передається в класифікатор, що дає результат класифікації [11].

Згортковий шар – складається з набору фільтрів, які можна вивчати. Під час прямого проходу ми пересуваємо кожен фільтр по ширині та висоті вхідного об’єму та обчислюємо точковий добуток між його ваговими показниками та картою активації з попереднього шару. Інтуїтивно, фільтри будуть навчені бути активними для певного типу візуальних елементів, таких як край певної орієнтації або пляма певного кольору на першому шарі.

Об’єднуючий шар – працює шляхом зменшення вибірки згорткових ознак за допомогою операцій максимальний пул або середнього об’єднання. Рівень пулу зазвичай вставляється між послідовними згортковими шарами, щоб зменшити кількість параметрів мережі, а також контролювати переобладнання [12].

Пакетний шар нормалізації – архітектурі ResNet нормалізація часто використовується як етап попередньої обробки, щоб зробити дані узгодженими. Коли вхідні дані проходять через глибоку мережу, ваги та параметри коригують значення вхідних даних, іноді знову роблячи дані занадто великими або занадто малими. Рівень пакетної нормалізації дозволяє нам нормалізувати дані в кожній міні-пакеті по мережі, а не просто виконувати нормалізацію один раз на початку, таким чином цієї проблеми значною мірою можна уникнути. Пакетна нормалізація допомагає підвищити швидкість навчання, а також підвищити загальну точність [12].

Повністю пов’язаний шар – як випливає з назви, кожен нейрон у шарі має повні зв’язки з усіма нейронами в попередньому шарі. Після збору всіх відповідей попередніх шарів у кожен із своїх нейронів, повністю підключений шар відповідає за обчислення специфічних для класу векторів довіри, де кожен нейрон виводить оцінку для певного класу. Наприклад, ResNet закінчується 1000-стороннім повністю підключеним шаром, на якому в якості остаточної передбачуваної мітки вибирається класс [12].

Останнім шаром є шар активації: цей рівень використовує функцію активації, яка необхідна для отримання розподілу ймовірностей набору чисел у вхідному векторі. Результатом функції активації є вектор, у якому її набір значень представляє ймовірність виникнення класу або події. Усі значення у векторі дорівнюють 1 [12].

Мережа сегментації також змінена в загальній структурі ЗНМ. Перша мережа сегментації повинна була змінити останні два повністю пов’язані шари для мережі класифікації на згортковий рівень. Основа мережі сегментації медичних зображень базуються на глибокій структурі, як-от VGG і ResNet, а також на структурі кодер-декодер. LeNet і AlexNet є ранніми мережевими моделями. Обидві мережеві структури відносно схожі і належать до неглибоких мереж. AlexNet має набагато більше параметрів, ніж мережа LeNet. Його ідея додати шар об’єднання після згорткового шару все ще популярна зараз. Покращення VGG над AlexNet полягає в поглибленні кількості мережевих рівнів. Він використовував кілька послідовних 3× 3 ядра згортки для заміни більшого ядра згортки в AlexNet. За умови забезпечення однакового рецептивного поля глибина мережі та ефект вилучення ознак розширюються. Структура VGG проста і акуратна. Уся мережа використовує ядро згортки однакового розміру та максимальний розмір пулу, перевіряючи, що продуктивність можна покращити шляхом постійного поглиблення структури мережі [11].

Усі згадані вище мережі отримують кращі навчальні ефекти за рахунок збільшення кількості мережевих рівнів. Але це також може викликати проблеми, такі як перенавчання та зникнення градієнтів. У відповідь на ці проблеми GoogleNet [11] покращено з іншої точки зору, розділивши структуру мережі на модулі. Початковій структурі пропонується збільшити глибину та ширину мережі при зменшенні параметрів мережі. Inception використовує кілька ядер згортки різних розмірів і додає об’єднання. Тоді результат згортки об’єднаний разом у ряд. Глибина всієї мережі досягала 22 шарів. Мережа ЗНМ розвинулась із семи рівнів AlexNet до 19 шарів VGG, за якими йдуть 22 шари GoogleNet. Коли глибина досягає певної кількості шарів, подальше збільшення не може покращити ефективність класифікації. Щоб навчити більш глибоку мережу з хорошими результатами, у джерелі [11] запропонувано нову 152-шарову структуру мережі — ResNet.

ResNet вирішує цю проблему, використовуючи ярлик, який складається з багатьох залишкових блоків. Кожен модуль складається з ряду послідовних шарів і ярлика. Цей ярлик з’єднує вхід і вихід модуля разом, додаючи їх перед активацією ReLU (випрямлений лінійний блок). Отриманий результат потім надсилається до функції активації ReLU, щоб створити вихід цього блоку. Крім того, існують структурні одиниці мережі, такі як блоки стиснення та збудження, які покращують виразну здатність моделі мережі з точки зору нової моделі мережі, зв'язку каналів, до проектування. Поєднуючи в собі інтерфейсний кодер ЗНМ і внутрішній декодер, це архітектура кодер-декодер. Це також основна структура мережі семантичної сегментації.

Структура кодера в задачі сегментації схожа, і більшість із них є ЗНМ для завдань класифікації. Він витягує об’єкти зображення з вхідного зображення та ущільнює об’єкти шляхом кодування для створення карти об’єктів з низькою роздільною здатністю. Декодер відображає дискримінаційну карту ознак низької роздільної здатності, засвоєну кодером, у простір пікселів високої роздільної здатності, щоб реалізувати позначення категорії кожного пікселя.

ResNet — це класична структура кодування-декодування [11]. Його кодер і декодер відповідають один до одного, обидва мають однаковий просторовий розмір і кількість каналів. Інновація мережі семантичної сегментації в основному походить від постійної оптимізації структури кодера та декодера та підвищення її ефективності. Зокрема, ефект і складність декодера дуже значні для результату всієї мережі сегментації.

Архітектура ResNet ввела залишкові з’єднання — подібні до з’єднань пропуску в U-Net — що дозволило навчати архітектури з більшою кількістю згорткових шарів. Залишкові зв’язки додали особливості попередніх шарів до більш пізніх, так що згорткові шари мали лише засвоїти різницю. Це можна побачити в рівнянні нижче, де x — вхід, y — вихід, а f — залишковий шар [13].

y=f(x)+x⟹f(x)=y−xy=f(x)+x⟹f(x)=y−x

Ця зміна допомогла вирішити давню проблему отримання зворотнього поширення для оновлення ваги ранніх шарів у дуже глибоких нейронних мережах. ResNet спочатку була запропонована для завдань класифікації, і, таким чином, представляла собою просту архітектуру, що складається із залишкових блоків і об’єднаних шарів для зниження дискретизації вхідних даних до вихідного вектора, сформованого відповідно до кількості цільових класів. Зменшення дискретизації та відсутність шарів підвищення дискретизації роблять цю архітектуру не відразу перенесеною на сегментацію, але архітектуру можна змінити для цього [14].

При збільшенні глибини нейромережі, одна з найчастіших проблем - це згасання градієнта при зворотному проході і як наслідок, погіршення роботи нейронної мережі. Зокрема згасання градієнта та втрата інформації найчастіше трапляється через використання блочного шару relu з функцією активації: f=max(x,0). У багатьох випадках при відсіюванні непотрібних ознак, якраз і виходить значення 0, що сприяє загасанню градієнта. В основі даної архітектури мережі лежать блоки (рис.1.5) [14].

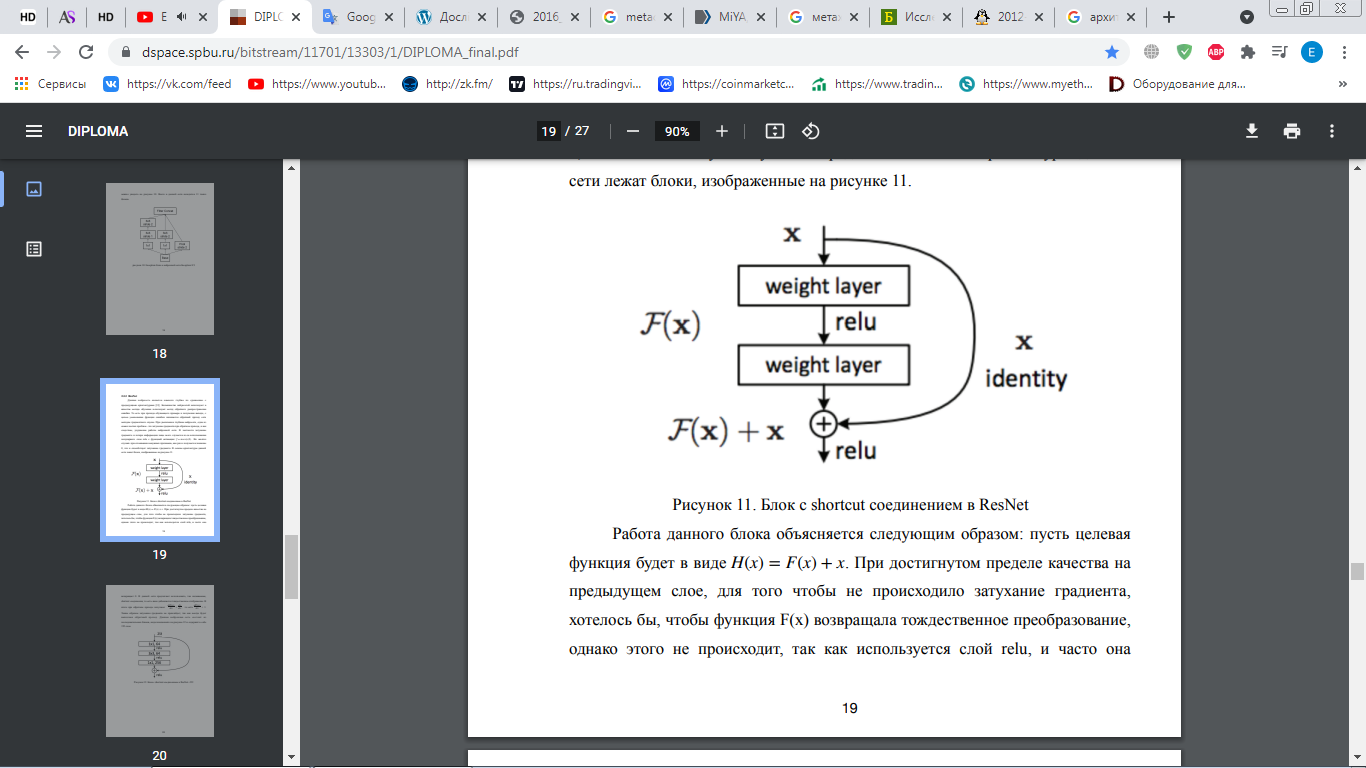
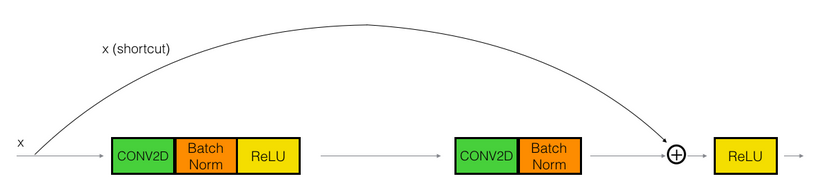


Рисунок 1.5 – Принцип роботи блоків архітектури ResNet [14]

Робота цього блоку пояснюється так: нехай цільова функція буде у вигляді H(x)=F(x)+х. При досягненні показника якості на попередньому шарі, для того щоб не відбувалося спадання градієнта, потрібно, щоб функція F(x) повертала тотожнє перетворення, однак цього не відбувається, тому що використовується шар relu, і часто вона повертає значення 0. У цій мережі пропонують використовувати так звані, shortcut-з'єднання, щоб додати тотожне відображення. У результаті при зворотньому проході отримуємо: +, тобто +1. Таким чином згасання градієнта не відбудеться, оскільки завжди буде виконано зворотній прохід [15].

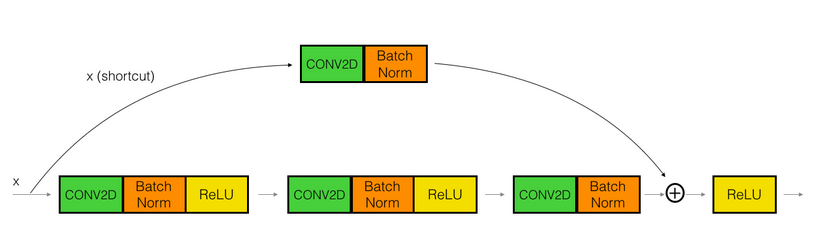
Ця архітектура була створена, щоб подолати труднощі у вигляді значних часових ресурсів і обмеженої кількості шарів. Перевага моделі ResNets порівняно з іншими архітектурними моделями полягає в тому, що продуктивність цієї моделі не знижується, навіть якщо архітектура стає глибшою. Крім того, обчислення розрахунки зроблені легше, а можливість навчання мереж краще. Модель ResNet працює краще в класифікації зображень, ніж інші моделі, що вказує на те, що зображення функції були добре вилучені ResNet [15,16].

Два початкових шари архітектури ResNet схожі GoogleNet шляхом виконання згортки 7 × 7 і максимального об’єднання розміром 3 × 3 з числом кроку 227. Дані шари представлені на рисунках 1.6 та 1.7. У цьому дослідженні було використано модель ResNet-50. Розмір зображення була змінено для маски нейронної мережі розміром 224 x 224 [14,17].



#### **Рисунок 1.6 – Схема блоку іжентифікації**

Блок ідентифікації є стандартним блоком, який використовується в ResNet і відповідає випадку, коли вхідна активація має той же розмір, що і вихідна активація.



**Рисунок 1.7 – Схема згорткового блоку**

Ми можемо використовувати цей тип блоку, коли вхідні та вихідні розміри не збігаються. Відмінність від блоку ідентифікації полягає в тому, що в шляху швидкого доступу є шар CONV2D.

GoogLeNet – це 22-шарова глибока згорткова нейронна мережа, яка є варіантом нейронної мережі родини Inception, розробленої дослідниками Google. Завдяки збільшення кількості шарів і одиниць у мережі, значно зросла продуктивність і ефективність мережі. Але збільшення шарів для створення більш розгалужених мереж вимагає значного зростання ресурсів для обчислення. Масивні нейронні мережі схильні до явища перенавчання і страждають від проблеми зникнення градієнта [18].

Архітектура GoogLeNet вирішила більшість проблем, з якими стикалися великі мережі, в основному завдяки використанню модуля Inception. Модуль Inception — це архітектура нейронної мережі, яка використовує виявлення функцій у різних масштабах за допомогою згорток із різними фільтрами та знижує обчислювальні витрати на навчання розгалуженої мережі за рахунок зменшення розмірів [19].

Одним із методів досягнення ефективності GoogLeNet є зменшення вхідного зображення, водночас зберігаючи важливу просторову інформацію. Перший шар конверсії використовує фільтр (патч) розміром 7x7, що є відносно великим порівняно з іншими розмірами патчів у мережі. Основна мета цього шару — негайно зменшити вхідне зображення, але не втратити просторову інформацію за допомогою великих розмірів фільтрів. Розмір вхідного зображення (висота і ширина) зменшується в чотири рази на другому шарі конверсії і у вісім до досягнення першого початкового модуля, але створюється більша кількість карт об’єктів [19]. Другий шар має глибину два і використовує блок 1x1, який є ефектом зменшення розмірності. Зменшення розмірності за допомогою блоку 1x1 дозволяє зменшити обчислювальне навантаження за рахунок зменшення кількості операцій шарів [19].

Архітектура GoogLeNet складається з дев’яти початкових модулів. Примітно, що між деякими початковими модулями є два шари максимального об’єднання. Мета шарів максимального об’єднання – зменшити дискретизацію вхідного сигналу, коли він подається через мережу [20]. Це досягається за рахунок зменшення висоти та ширини вхідних даних. Зменшення розміру вхідних даних між початковим модулем є ще одним ефективним методом зменшення обчислювального навантаження мережі. Середній шар об’єднання приймає середнє значення для всіх карт об’єктів, створених останнім початковим модулем, і зменшує вхідну висоту та ширину до 1x1 [20].

Рівень випадіння — це техніка регуляризації, яка використовується під час навчання, щоб запобігти переобладнанню мережі. Техніка випадання працює шляхом випадкового зменшення кількості взаємозв’язаних нейронів у нейронній мережі. На кожному кроці навчання кожен нейрон має шанс залишитися поза увагою або, точніше, вийти з зібраного пулу від підключених нейронів [21].

Перш ніж завершити вивчення архітектури GoogLeNet, є ще один компонент, який був реалізований розробниками мережі для упорядкування та запобігання переобладнанню. Цей додатковий компонент відомий як допоміжний класифікатор [22].

Однією з основних проблем розгалуженої мережі є те, що вони страждають від зникаючого градієнтного переходу. Зникаючий градієнтний спуск відбувається, коли оновлення ваг, яке виникає внаслідок зворотнього поширення, є незначним у нижніх шарах через відносно невелике значення градієнта [23]. Просте збереження зумовлює припинення процесу навчання в мережі, чим і запобігається перенавчання. Завдяки описаним властивостям дана технологія булла обрана для мого дослідження.

# 2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

## 2.1 Методи сегментації мікроскопічного зображення

Точна сегментація мікроскопічного зображення на окремі клітинки є важливим етапом попередньої обробки для багатьох типів аналізу біологічних зображень. Для дослідника широкий вибір і складність методів сегментації можуть призвести до ручної кількісної оцінки, якщо зусилля, необхідні для автоматизації, виявляться непропорційними масштабу їх експериментів.

Оскільки морфологічні характеристики можуть не враховувати ціле зображення, а деякі з них, наприклад, форма, сильно відрізняються в одних і тих самих клітинках, може бути важко точно виявити та сегментувати за допомогою традиційних методів машинного навчання.

Виявлення та сегментація об’єктів були предметом дослідження в області комп’ютерного зору, і в останні роки було запропоновано багато популярних алгоритмів, таких як Inception-V3, ResNet та U-Net. Хоча аналіз біологічних зображень увійшов в еру штучного інтелекту з використанням таких підходів, як методи комп’ютерного зору та глибокі згорткові мережі, сегментація малих об’єктів залишається надзвичайно складною проблемою [11].

Легкість отримання зображень завдяки передовій технології призвела до створення величезної кількості зображень з високою роздільною здатністю за дуже низьких витрат. Це призвело до значного вдосконалення розробки алгоритмів обробки біомедичних зображень. Це, у свою чергу, дозволило розробити автоматизований аналіз або алгоритми оцінки зображень для отримання корисної інформації. Основним етапом такого автоматизованого аналізу є сегментація, яка розбиває зображення на частини на візуально відмінні області, які мають семантичне значення для даної проблеми. Кожен з цих регіонів, як правило, має однакові характеристики за рівнем сірості, текстурою або кольором [24]. Чітка сегментація та помітні області є суттєвими для подальшого аналізу, який може включати визначення рівнів однорідності текстури або товщини шару [24]. Іноді зображення може містити кілька об’єктів одного класу. І процес сегментації може відокремлювати регіони, що містять об’єкти одного класу, ігноруючи інші класи, і в цьому випадку він відомий як сегментація екземплярів, на відміну від семантичної сегментації, в якій об’єкти одного класу не відокремлюються, але відокремлюються різні класи.

Усі методи сегментації зображень можна згрупувати в три категорії:

1) ручна сегментація,

2) напівавтоматична сегментація;

3) повністю автоматична методика сегментації [25].

Методи ручної сегментації вимагають від експертів спочатку визначити область інтересу, а потім провести точні межі навколо цієї зони, щоб правильно анотувати кожен з пікселів зображення. Ручна сегментація необхідна, оскільки вона забезпечує зображення, яке є основою для подальшого розвитку напівавтоматичних і повністю автоматичних методів сегментації. Ручна сегентація вимагає багато часу і можлива лише для невеликих наборів даних зображень. У випадку зображень з високою роздільною здатністю висока роздільна здатність може призвести до того, що зображення більше не мають чітких меж – слабкий контраст, внаслідок чого незначні відхилення у виборі пікселів межі цільової зони можуть призвести до великої помилки. Інша проблема з ручною сегментацією полягає в тому, що вона суб’єктивна, оскільки підхід залежить від знань та досвіду експерта, і в результаті часто зустрічається зі значною між- та внутрішньоекспертною мінливістю [26].

Напівавтоматичні методи сегментації передбачають невеликий рівень взаємодії користувача з автоматизованими алгоритмами для отримання точних результатів сегментації [27]. Взаємодія з користувачем може включати вибір приблизних значень початкової зони інтересу, який згодом використовується для сегментації всього зображення. Це може включати ручну перевірку та редагування меж цієї зони, щоб зменшити помилку сегментації.

Повністю автоматичні методи сегментації не вимагають взаємодії з користувачем. Однак більшість таких методів засновані на підходах до навчання з наглядом. Як навчальні дані, так і підходи до навчання без нагляду, дані перевірки вимагають позначених зображень, які отримують шляхом ручної сегментації, таким чином, накладаючи подібні обмеження, як згадувалося раніше. Додатковими проблемами з автоматизованою сегментацією біологічних зображень є великі варіації форми, розміру, текстури та в деяких випадках кольору між зображеннями та поганий контраст між регіонами [25].

Шум або відсутність узгодженості в отриманні вихідних даних також можуть призвести до великих варіацій вихідних даних зображення, що часто має місце в реальних програмах.  Крім того, створені функції, які часто використовуються з підходами машинного навчання, засновані на машиннах опорних векторах або нейронних мережах, займають багато часу і не можуть обробляти природні дані в їх сирому вигляді і зазвичай не адаптується до нової інформації. З іншого боку, підходи глибокого навчання здатні обробляти природні дані в їх необробленому вигляді, таким чином усуваючи потребу в ручних функціях [25]. Ці підходи були ефективно використані для семантичної сегментації на зображеннях природи, а також знайшли застосування в біомедичній сегментації зображень [26[].](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235291481930214X#bib12)

Сегментація зображень поділяється на семантичну сегментацію, сегментацію екземплярів і панорамну сегментацію відповідно до різної грубої та тонкої зернистості сегментації. Сегментація БМЗ розглядається як завдання семантичної сегментації. З великим збільшенням запропонованої структури мережі метод сегментації зображення вдосконалюється крок за кроком для отримання все більш точних результатів сегментації. Однак для різних прикладів сегментації не існує універсального алгоритму сегментації, який підходить для всіх зображень. Традиційні методи сегментації зображень більше не можна порівнювати з методами сегментації, заснованими на глибокому навчанні, але ідеї все ще варті вивчення [26].

В даний час методи, засновані на глибокому навчанні, досягли значних досягнень у сфері сегментації зображень. Їх точність сегментації перевершила традиційні методи сегментації. Згорткова нейронна мережа була першою технологією, хто успішно використав глибоке навчання з метою семантичної сегментації зображень. Це була робота з використання згорткових нейронних мереж для сегментації зображень. Автори запропонували концепцію повних згорткових мереж. Крім того, є видатні мережі для сегментації, такі як U-Net, Resnet, які мають значну перевагу в обробці даних.

Хоча дослідження сегментації медичних зображень досягли значного прогресу, ефект сегментації все ще не може задовольнити потреби практичного застосування. Основна причина полягає в тому, що нинішнє дослідження сегментації біомедичних зображень все ще має такі труднощі та проблеми:

1. Медичні зображення відрізняються від природних зображень. Існують відмінності між різними медичними зображеннями. Ця відмінність також впливає на адаптивність моделі глибокого навчання під час сегментації. Шум і артефакти медичних зображень також є основною проблемою під час попередньої обробки даних.

2. Обмеження наявних наборів даних біомедичних зображень. Існуючі набори даних медичних зображень невеликі за масштабом. Навчання алгоритмів глибокого навчання потребує великої кількості даних, що призводить до проблеми переналаштування в процесі навчання моделей глибокого навчання. Одним із способів вирішення проблеми недостатньої кількості навчальних даних є покращення даних, наприклад геометричне перетворення, покращення колірного простору [17, 25].

3. Модель глибокого навчання має свої недоліки. В основному він зосереджується на трьох аспектах: проектуванні структури мережі, проектуванні моделі сегментації даних та розробці функції втрат. Варто вивчити дизайн мережевої структури. Ефект від зміни структури мережі є значним і його можна легко перенести на інші завдання. Все більше і більше нових методів використовуються для постійного підвищення точності та надійності сегментації. Але це все ще відкрита проблема, тому ми можемо очікувати низку інновацій та результатів досліджень у найближчі кілька років [17, 25].

**2.2 Методика реакції метахромазії**

На сьогоднішній день вироблена методика для дослідження реакції метахромазії з використанням тіазинових барвників.

Метиленовий синій, лазурний А і толуїдиновий синій — це планарні катіонні барвники, які зазвичай фарбують тканини в синій колір. Метахроматично ці барвники фарбують компоненти тканин у фіолетово-червоний колір.

Наприклад, якщо препарат гіалінового суглобового хряща забарвлюється толуїдиновим синім, забарвленням будуть сині клітинні ядра, світло-блакитна цитоплазма та рожевий або фіолетовий позаклітинний матрикс [27].

Метахромазія – це явище, при якому аніонні полімеризовані міжмолекулярні зв’язки з високою щільністю заряду сприяють катіонним взаємодіям барвник-барвник, що призводить до великих спектральних зсувів.

Ступінь метахроматичного забарвлення залежить від збільшення аніонних радикалів у порядку карбоксилату, фосфату та сульфату, а також від зближення відстані міжмолекулярного зв’язку. Навпаки, ортохроматичність є протилежним явищем, коли відносна зміна кольору не спостерігається при зв’язуванні з тканинними речовинами.

Метахромазія — це специфічна форма агрегації барвника, яка характеризується утворенням нових міжмолекулярних зв’язків між сусідніми молекулами барвника. Зв’язки між молекулами барвника виникають лише тоді, коли молекули знаходяться в безпосередній близькості одна від одної, наприклад. з кислими муцинами або протеогліканами аніонні групи вуглеводів орієнтують молекули катіонного барвника [5, 27]. Простіше кажучи, аніонна вуглеводна структура служить шаблоном для індукування утворення полімерної структури барвника, в якій молекули барвника зв’язуються одна з одною за допомогою водневих зв’язків або сил Ван-дер-Ваальса. Інтеграція молекул води між сусідніми молекулами барвника є суттєвою для метахроматичних явищ. Для метахромазії необхідна певна закономірність розподілу та щільності повторюваних аніонних структур. Високоаніонні протеоглікани з чергуванням сульфатів і карбоксилатів відповідають цим критеріям і виробляють метахроматичні плями такими барвниками, як толуїдиновий синій, метиленовий синій і лазур А. Як правило, сильнокислі або високосульфатовані протеоглікани викликають найсильнішу і стабільну метахромазію [28].

Для дослідження реакції метахромазії у дріжджів необхідно:

1) Нанести культуру дріжджів на предметне скло в краплю дистильованої води, потім висушити мазок та зафіксувати його жаром, провівши два-три рази над полум`ям.

2) Нанести на мазок краплю розчину метиленового синього та фарбувати протягом трьох хвилин.

3) Промити мазок дистильованою водою.

4) Нанести краплю 0.1% розчину сірчаної кислоти.

5) Покрити мазок покривним склом та мікроскопувати при необхідному збільшенні.

Така методика дозволяє побачити фарбування волютинових гранул,особливо перехід від синього забарвлення до фіолетового або червоного, завдяки наявності розчину сірчаної кислоти, яка є донором аніонних груп і обумовлює появу метахроматичного забарвлення.

**2.3 Особливості застосування нейронних мереж при оцінці світлових змін в клітинах**

Автоматизований аналіз біозображення зазвичай вимагає виконання складної серії операцій, які можуть включати відновлення зображення, виявлення об’єктів, сегментація, відстеження, а також класифікація зображень або об’єктів, кількісна оцінка та візуалізація.

Ще більш фундаментальним для нашого розуміння процесів захворювання та гомеостатичних механізмів, що підтримують життя на клітинному та молекулярному рівнях, є біологічна мікроскопія. Революційні наукові відкриття та технологічні інновації за останні десятиліття спонукали до розробки широкого спектру передових світлових мікроскопії, зокрема флуоресцентної мікроскопії, а також електронної мікроскопії та скануючої зондової мікроскопі,які виявилися ключовими для більшої частини прогресу в сучасних біологічних дослідженнях [29].

У наш час комп`ютерні системи медичної візуалізації зазвичай генерують набори даних у тисячі і десятки тисяч мегабайт, завдяки чому, технологія глибокого навчання все більше використовується для покращення якості даних і вилучення з них детальної додаткової інформації.Основні завдання аналізу біомедичних зображень представлені на рисунку 2.1.

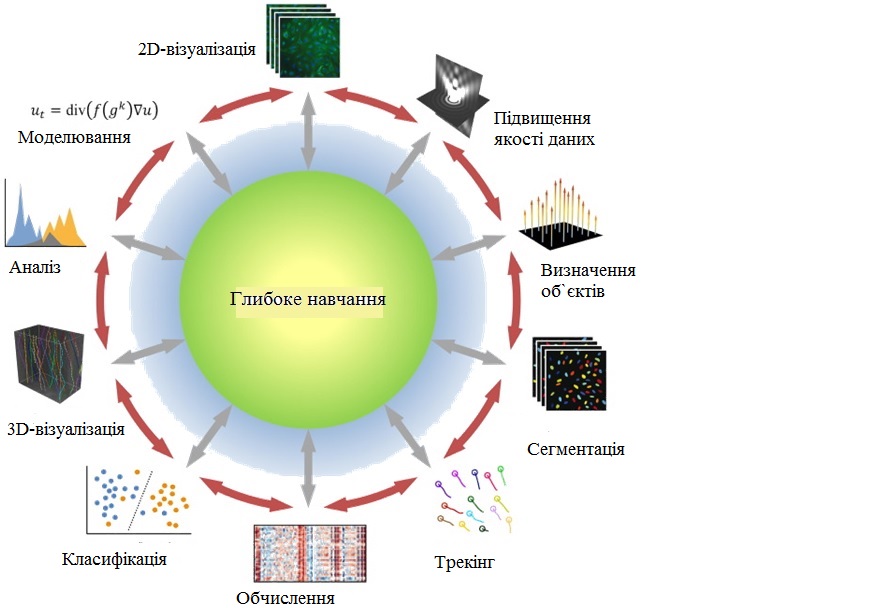


Рисунок 2.1 – Загальні завдання аналізу біомедичних зображень.

Кінцева мета – отримати знання про біологічні процеси шляхом вилучення відповідної інформації з мікроскопічного зображення або відеозаписів цих процесів. Залежно від конкретного застосування, вилучення інформації може включати покращення зображення, виявлення об’єктів, сегментацію зображення, відстеження об’єктів, кількісне визначення та класифікацію, візуалізацію та аналітику даних, а також математичне чи статистичне моделювання. Глибоке навчання все частіше використовується в багатьох із цих завдань. На діаграмі показано типовий порядок виконання завдань із двосторонніми стрілками, які вказують на можливий взаємозв’язок і зворотный зв’язок між завданнями, а також той факт, що будь-яка з них самостійно може також внести свій внесок у знання на цьому шляху, впливаючи на інші завдання.

Багато завдань аналізу БМЗ значно полегшуються, якщо спочатку покращити необроблені мікроскопічні зображення шляхом видалення артефактів і максимально можливого відновлення важливої ​​інформації. Залежно від типу використовуваного мікроскопа та умов отримання зображення можуть застосовуватися різні види операцій покращення зображення, і глибоке навчання виявилося потужною методологією для цього. Наприклад, використовуючи добре зареєстровані пари низькоякісних і високоякісних зображень, ЗНМ можна навчити виконувати шумозаглушення та відновлювати роздільну здатність [30].

Як правило, нейронна мережа використовується, коли точне співвідношення між входами та виходами невідоме. Якби це було відомо, то посилання можна було б змоделювати безпосередньо. Іншою важливою особливістю нейронних мереж є те, що зв'язок між входом і виходом визначається в процесі їх навчання. Для цього навчання використовуються два типи алгоритмів (різні типи мереж використовують різні типи навчання):

1) контрольовані – «навчання з учителем»;

2) некеровані – «без учителя» [13].

Найчастіше використовується тренування з учителем, і саме цей метод буде використовуватись в подальшій роботі. Для управління мережею користувач повинен підготувати набір навчальних даних. Ці дані є прикладами вхідних даних і відповідних вихідних даних. Мережа вчиться встановлювати зв'язки між першим та другим типом даних.

Потім нейронну мережу навчають за допомогою одного з алгоритмів керованого навчання (найбільш відомим з них є алгоритм зворотного поширення) [31], в якому наявні дані використовуються для налаштування ваг і порогових значень мережі, щоб мінімізувати помилку прогнозу на навчальний набір. Якщо мережа добре навчена, вона зможе моделювати невідому функцію, яка зв’язує вхідні та вихідні змінні. Згодом цю мережу можна використовувати для прогнозування

Згорткова нейронна мережа розроблена для обробки кількох типів масивів даних, особливо двовимірних зображень. Основна структура ЗНМ складається з шарів згортки, нелінійних шарів та шарів об’єднання, як показано на риcунку 2.2. Щоб використовувати висококорельовані набори даних, на кожному шарі згортки групи локальної зваженої суми, які називаються картами ознак, отримують шляхом обчислення згорток між локальними частинами зображення та вагові вектори, які називаються фільтрами [32].

Крім того, так як можуть з'явитися ідентичні зображення незалежно від розташування в даних, фільтри застосовуються незалежно від розташування в даних, фільтри застосовуються багаторазово до всіх даних, що також дає перевагу в ефективності навчання за рахунок зменшення кількості параметрів для навчання. Тоді нелінійні шари збільшують нелінійні властивості карт об’єктів. На кожному шарі об’єднання виконується максимальна або середня підвибірка областей, що не перекриваються, на картах об’єктів. Підвибірка, що не перекривається, дозволяє ЗНМ обробляти дещо інші, але семантично подібні функції та об’єднувати локальні ознаки для виявлення більш складних функцій [32].

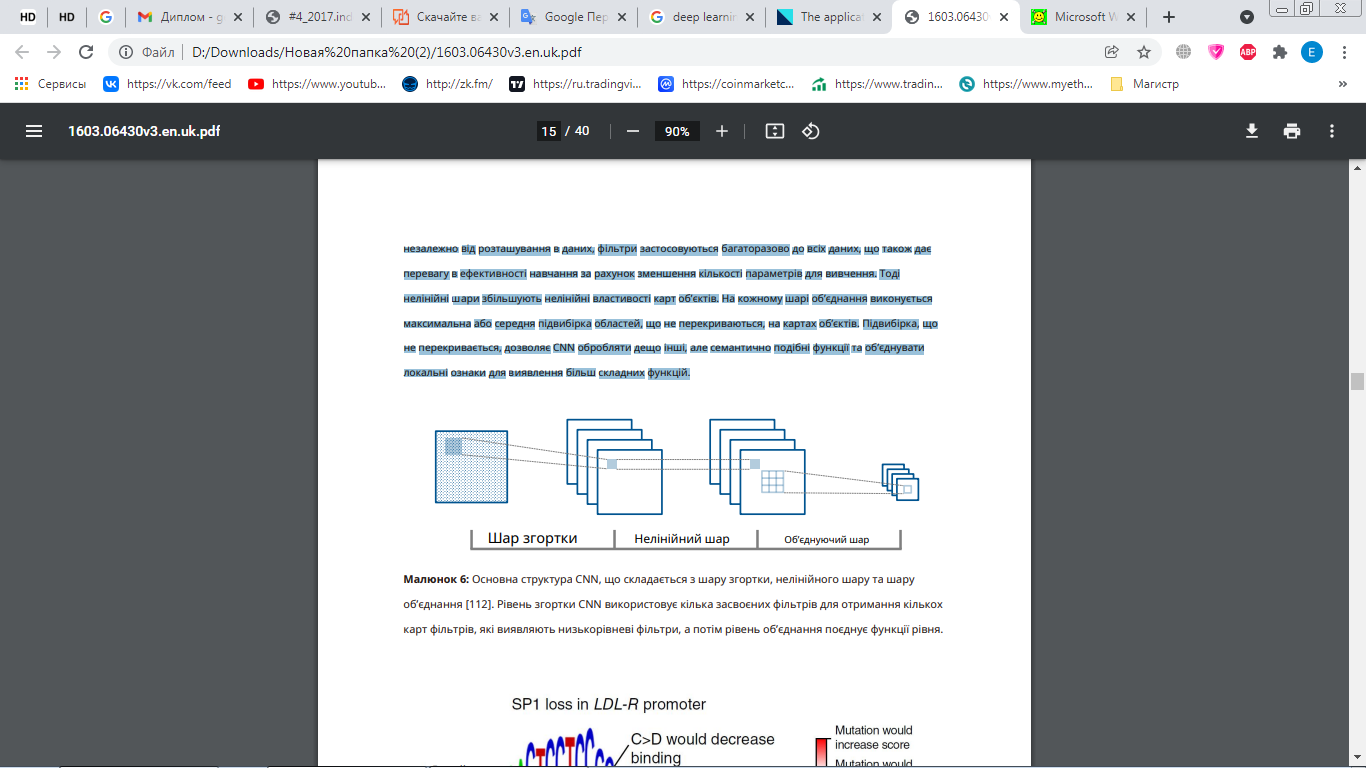


Рис. 2.2 – Основна структура ЗНМ, що складається з шару згортки, нелінійного шару та шару об’єднання [33].

Рівень згортки ЗНМ використовує кілька засвоєних фільтрів для отримання кількох карт фільтрів, які виявляють низькорівневі фільтри, а потім рівень об’єднання поєднує функції рівня.

На додаток до медичної науки, глибоке навчання також використовується для аналізу великих даних у сфері молекулярної біології. Мікроскопічне спостереження культивованих клітин є важливим у клітинній біології. Конкретні типи клітин або стани розпізнаються флуоресцентно міченими антитілами. Кожна клітина демонструє характерну модель експресії генів, у тому числі для структурних білків, специфічних для типу та стану клітини; тому кожен тип клітин має унікальні морфологічні особливості. Хоча люди не можуть візуально ідентифікувати диференційовані клітини, машинне навчання має таку здатність [34].

Навчаючись на великих обсягах анотованих даних, глибоке навчання може виконати кілька завдань аналізу біозображень, які раніше не вирішувалися. Однак до останніх кількох років більшість робочих процесів глибокого навчання вимагали значних обчислювальних знань.

Мікроскопія розкриває унікальні аспекти біологічних зразків, що дозволяє вченим досліджувати взаємозв’язок між структурою та функціями. Зображення біологічних зразків багаті на дані, і їх часто важко отримати, що змушує біологів витягувати з них якомога більше високоякісної інформації. Обчислювальний аналіз зображень може зменшити упередження, застосовуючи послідовний метод, мінімізуючи суб’єктивність і час використання. Крім того, ці методи є потужними для виявлення тонких і непередбачуваних фенотипів. Програмні програми з відкритим вихідним кодом дозволяють біологам без профільної обчислювальної підготовки застосовувати обчислення до зображень для виконання багатьох різних завдань, включаючи визначення окремих біологічних структур — процес, який відомий як сегментація. Однак, коли біологічні структури слабо забарвлені, неправильної форми або відрізняються одна від одної переважно зміною текстури, а не зміною значення інтенсивності, класичні методи сегментації часто виявляються невдалими [35].

Хоча донедавна більшість підходів глибокого навчання вимагали значного технічного досвіду, за останні кілька років було випущено все більше засобів глибокого навчання, які спеціально націлені на користувачів без комп’ютерного навчання. Мета таких інструментів — зробити глибоке навчання доступним і ефективним для вчених, які проводять більшу частину свого часу, проводячи експерименти [36].

Інновації в нейронних мережах часто відбуваються через архітектурні зміни. Якщо архітектурі приділяється значна роль, то необхідно відповісти на питання яка з архітектур найкраще відповідає вирішенню поставлених задач.

U-Net — це проста у реалізації архітектура , яка була надзвичайно успішною в медичній візуалізації. Але почати необхідно з архітектур ResNet та GoogleNet, тепер уже класичних архітектур, так як застосування саме цих архітектур для аналізу біомедичних зображень постійно зростає.

## 2.4 Метод підрахунку клітин

Процес підрахунку клітин на мікроскопічних зображеннях є часто довготривалим заняттям і представляє значний інтерес у галузі медичних досліджень, але зазвичай все ще виконується вченими вручну, що призводить до трудомісткого завдання, тривалого та схильного до людських помилок. Більше того, ручний підрахунок клітин є суб’єктивним через значну мінливість між думками спостерігачів [37]. Отже, автоматизація цього процесу є бажаним інструментом серед медичної спільноти, і протягом останніх років до нього підходили з використанням різних методів.

Підрахунок клітин можна застосувати до величезної кількості сфер у науках про життя, зокрема:

1. у біології та медицині підрахунок клітин, наприклад, еритроцитів у крові, дає змогу робити висновки щодо здоров’я пацієнта;

2. у клінічній патології кількісна оцінка клітин може бути використана для дослідження гіпотез патологічних процесів та для оцінки реакції імунної системи пацієнта на інфекцію.

3. під час дослідження та діагностики раку підрахунок клітин дозволяє оцінити швидкість проліферації пухлини та оцінити відповідь на терапію [38-39].

Найдавніші підходи до підрахунку клітин ґрунтувалися на класичних техніках обробки зображень із використанням таких методів, як порогове значення інтенсивності, виявлення ознак, морфологічна фільтрація, накопичення області та підгонка деформованої моделі [40]. З появою глибокого навчання і ЗНМ кілька авторів запропонували різні методи, які могли б перевершити найбільш традиційні підходи. У джерелі [32] автори застосовують архітектури глибокого навчання для сегментації та підрахунку клітин на мікроскопічних зображеннях, але, як згадувалося, їхня система виходить з ладу в ситуаціях високого перекриття клітин і неправильної форми клітини. Проблема, пов’язана з цим останнім підходом, полягає в тому, що при роботі з об’єктами, що перекриваються, загальне охоплення пікселів іноді буде значно меншим, ніж фактичне покриття, що призведе до помилкових результатів. У роботі [41] автори намагаються автоматизувати процес, застосовуючи повністю згортові регресійні мережі, щоб регресувати просторову щільність осередку на зображенні, досягаючи хороших результатів щодо точності моделі. Проте запропонований підхід був протестований на зображеннях, які не зазнали високої щільності накладання.

При роботі з плитками зображень, що перекриваються, деякі останні дослідження намагаються застосувати різні процедури, щоб мати можливість підрахувати кожну клітинку окремо. Знову ж таки, це може вирішити ситуації перекриття плиток, але в ситуаціях, які вважаються простими для вирішення. Таким чином, завдання підрахунку клітин можна вирішити в переважній більшості випадків, використовуючи підходи, згадані вище. Однак у ситуаціях, коли відбувається велике перекриття клітин, низька якість зображення, неоднорідні клітини з різними формами або текстурами, серед інших аспектів завдання стає складнішим, якщо взагалі неможливим. 3 іншою умовою, яку слід враховувати, є тип наявних даних маркування. Залежно від міток можуть і повинні використовуватися різні підходи, і в більшості підходів, представлених у згаданих статтях, основна істина була позначена на піксельному рівні, що дозволяє застосувати сегментацію, один з найпоширеніших підходів у подібних ситуаціях. Подібні середовища можна враховувати при пошуку найкращого підходу для виявлення та підрахунку клітин. Запропонована стратегія полягає у створенні моделі виявлення об'єктів, яка є достатньо надійною для вирішення цієї проблеми. Таким чином, необхідно доповнити процедуру завданням класифікації, яке може точно класифікувати об’єкти, які цікавлять. Наскільки відомо, не існує найбільш ефективної архітектури детектора об’єктів для підрахунку клітин, що перекриваються на зображенні.

Здатність точного кількісного визначення конкретних популяцій клітин є важливою для точної діагностики в лабораторній медицині. Щоб ще більше зменшити помилку передбачення підрахунку, я протестую архітектуру ЗНМ, наприклад, глибоку залишкову мережу, на модель регресії. Саме цей метод був взятий за основу, для кінцевого підрахунку кількості клітин у створеному програмному забезпеченні.

Автоматичний підрахунок клітин полягає в тому, щоб отримати кількість певних типів клітин на зображенні, як-от мікроскопічні зображення. У цьому підрозділі описано сутність запропонованого підходу, деталі кожної частини надані в наступних розділах.

На етапі навчання ЗНМ використовується для побудови моделі регресії між фрагментом зображення та кількістю клітин. Щоб підготувати навчальні дані, було згенеровано багато квадратних плиток з кожного навчального зображення. Після цього для зібраних навчальних патчів виконується поворот патчів з метою зробити систему більш стійкою до дисперсії обертання та збільшення кількості даних.

На етапі тестування одне тестове зображення перетворюється на кілька менших зображень, такого ж розміру, що перекриваються, як і навчальні зображення. Кожен з цих тестових патчів передається в модель регресії на основі ЗНМ, а потім з останнього шару моделі ЗНМ виводиться розрахункова кількість комірок вхідного тестового патча.

Отже, досить важко вручну підрахувати клітини одну за одною. Враховуючи природу біомедичних зображень, які потребують автоматичного підрахунку клітин, підготовка та обробка даних це дуже важливі етапи, які впливають на кінцевий результат. У цій роботі ми обрізаємо зображення на послідовні фрагменти, а потім виконуємо навчання та прогнозування на основі цих фрагментів, щоб зробити підхід більш надійним до дисперсії масштабу, уникнути зміни розміру вихідного зображення мікроскопа, що може призвести до втрати інформації [40].

У порівнянні зі звичайними методами виявлення клітин, глибокі нейронні мережі нещодавно були застосовані для вирішення різноманітних проблем комп’ютерного зору і досягли кращої продуктивності на кількох еталонних наборах даних зору [42]. Найпереконливіша перевага глибокого навчання полягає в тому, що воно еволюціонує від стратегій проектування фіксованих функцій до автоматичного вивчення проблемних особливостей безпосередньо з даних навчання [43].

# 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТУ

## При виконанні роботи попередньо були проведені моніторингові експериментальні дослідженння по визначенню забарвлення волютинових гранул дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* привикористанні реакції метахромазії, які реєструвались паралельно із характеристиками геомагнітного поля. Ці дані були представлені у вигляді датасету з 57-ми зображень. Спочатку було проведено розподіл набору отриманих даних із реакцією метахромазії волютинових гранул в клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* нанавчальний набір та набір для перевірки. Також було проведено попередню обробку та розширення зображення, яка включала стандартизацію та масштабування вхідного зображення, щоб підвищити якість подачі набору даних. Для сегментації зображень було використано методи сегментації, створені на основі архітектури U–net та мови програмування Python. Такий підхід був описаний нами в бакалаврському дипломі. Для нейромережі на основі моделі Unet були створенні навчальні маски сегментованих клітин, при цьому використовували фоторедактор «Corel PHOTOPAINT X6».

Для створення моделі на основі нейронної мережі ResNet використовувалась мова програмування Python 3.7. Код створеної програми наведений нижче.

***Імпорт необхідних бібліотек:***

import numpy as np

import ImageDataGenerator from keras

import backend as K

import cv2

import os from keras.preprocessing.image

import keras from keras.models

import Sequential, Model,load\_model from keras.optimizers

import SGD from keras.callbacks

При використанні машинного навчання для обробки зображень набір даних часто поділяють на три частини. Серед них навчальний набір використовується для навчання моделі мережі, верифікаційний набір використовується для налаштування гіперпараметрів моделі, а тестовий набір використовується для перевірки кінцевої ефективності моделі.

Було створено модель на основі архітектури ResNet для навчання нейромережі, для аналізу зображень клітин дріжджів, при цьому зображення перетворили до менших розмірів, адаптованих для маски моделі:

***Створення нейромережі:***

def ResNet50(input\_shape=(224, 224, 3)):

X\_input = Input(input\_shape)

X = ZeroPadding2D((3, 3))(X\_input)

X = Conv2D(64, (7, 7), strides=(2, 2), name='conv1', kernel\_initializer=glorot\_uniform(seed=0))(X)

X = BatchNormalization(axis=3, name='bn\_conv1')(X)

X = Activation('relu')(X)

X = MaxPooling2D((3, 3), strides=(2, 2))(X)

X = convolutional\_block(X, f=3, filters=[64, 64, 256], stage=2, block='a', s=1)

X = identity\_block(X, 3, [64, 64, 256], stage=2, block='b')

X = identity\_block(X, 3, [64, 64, 256], stage=2, block='c')

X = convolutional\_block(X, f=3, filters=[128, 128, 512], stage=3, block='a', s=2)

X = identity\_block(X, 3, [128, 128, 512], stage=3, block='b')

X = identity\_block(X, 3, [128, 128, 512], stage=3, block='c')

X = identity\_block(X, 3, [128, 128, 512], stage=3, block='d')

X = convolutional\_block(X, f=3, filters=[256, 256, 1024], stage=4, block='a', s=2)

X = identity\_block(X, 3, [256, 256, 1024], stage=4, block='b')

X = identity\_block(X, 3, [256, 256, 1024], stage=4, block='d') X = identity\_block(X, 3, [256, 256, 1024], stage=4, block='e')

X = identity\_block(X, 3, [256, 256, 1024], stage=4, block='f')

X = convolutional\_block(X, f=3, filters=[512, 512, 2048], stage=5, block='a', s=2)

X = identity\_block(X, 3, [512, 512, 2048], stage=5, block='b')

X = identity\_block(X, 3, [512, 512, 2048], stage=5, block='c')

X = AveragePooling2D(pool\_size=(2, 2))(X)

model = Model(inputs=X\_input, outputs=X, name='ResNet50')

return model

В даній роботі було використано два типи набору даних: навчальний набір та набір для перевірки. Роль верифікаційного набору для налаштування гіперпараметрів моделі виконає набір даних для навчання, так як розмір датасету не досить значний, щоб сформувати три набори даних.

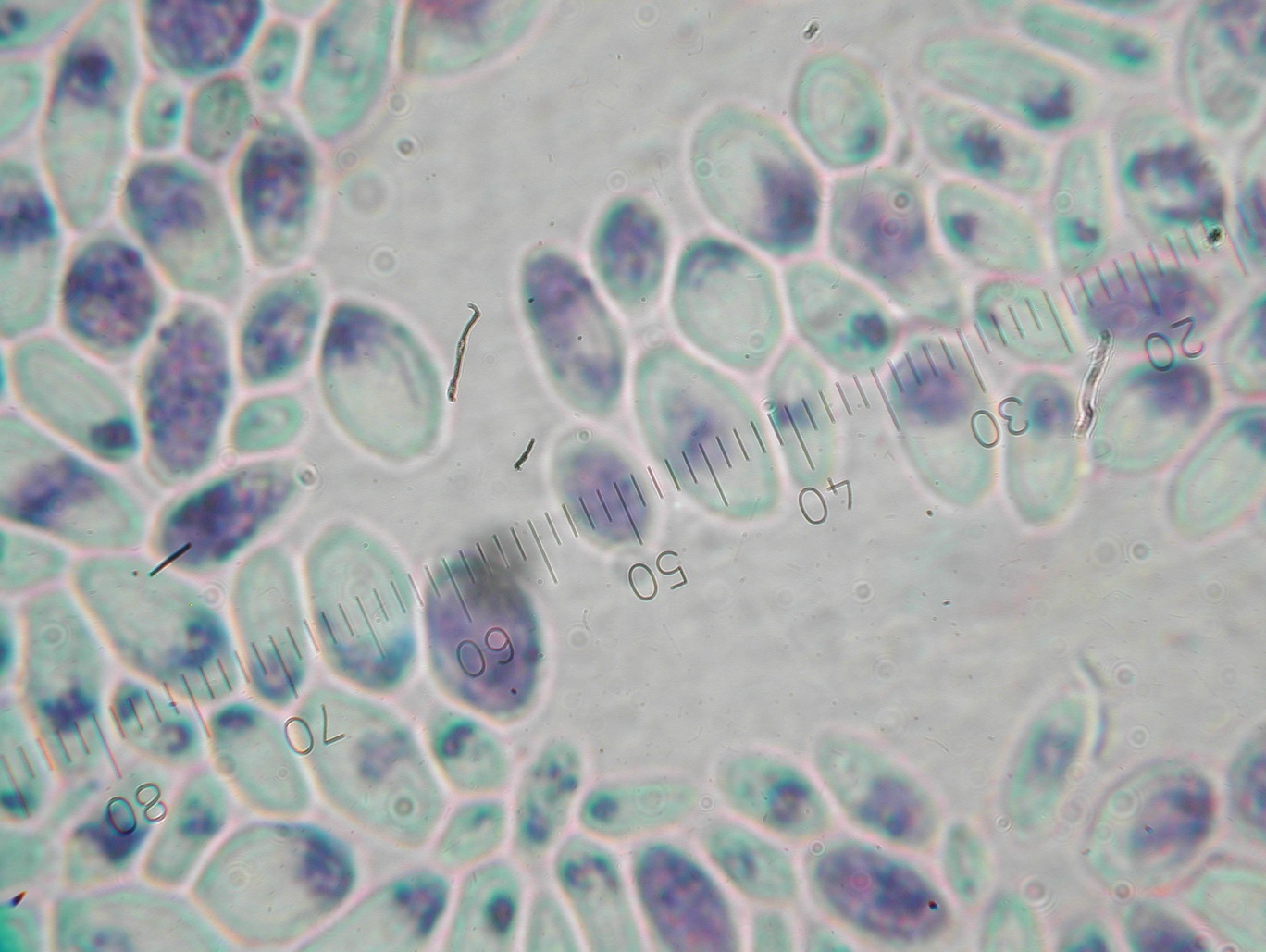
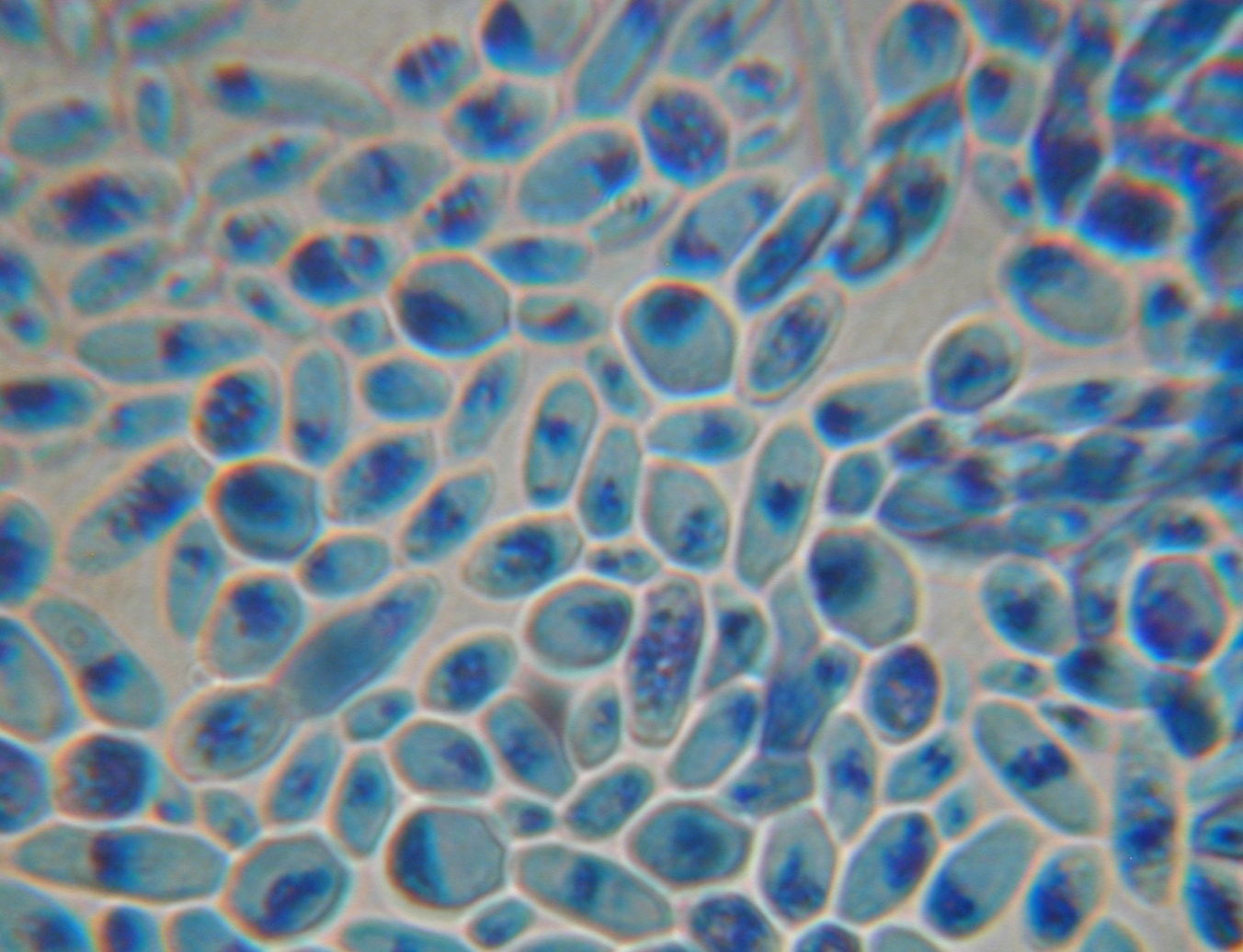
****

Рисунок 3.1 – Приклад зображень з датасетів

На рис. 3.1, зліва представлено зображення з датасету при наявності реакції метахромазії волютинових гранул дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, а справа, відповідно, в клітинах ця реакція відсутня.

Як видно з цих зображень даного датасету необхідно провести додаткову підготовку даних, щоб нівелювати головні недоліки, до яких відносяться:

- розмиті контури і межі клітин;

- наявність плям барвника на фоні;

- відсутність чіткої кольорової градації залежно від типу реакції МТХ;

- розбіжність між розмірами клітин;

- завеликий розмір зображень, який вимагає значних обчислювальних потужностей.

## *Проводилась попередня підготовка та обробка даних.* Перш за все зображення були адаптовані безпосередньо під розмір маски моделі нейронної мережі. З зображеннь розміром 1200х1600 пікселів були створені фрагменти розміром 224х224 пікселі. Це операція була зроблена з метою розширення датасету і зниження вимог до обчислювальних потужностей.

Були додані до датасету зображення окремих клітин, для того, щоб підвищити рівень точності моделі, шляхом переходу від загального формату оцінки до конкретного. Приклад таких зображень представлений на рис.3.2.

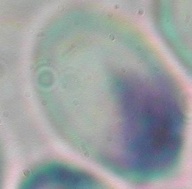
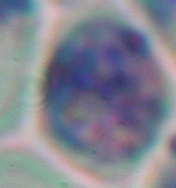
 

Рис. 3.2 – Зображення клітин, використаних для навчання моделі нейронної мережі.

Була використана нейронної мережа для проведення сегментації зображень.Сегментація зображень є важливою і складною частиною обробки зображень. Сегментація зображення дозволяє ділити все зображення на кілька областей, які мають схожі властивості. Для нейронної мережі – це відокремлення цілі від фону на зображенні.

Для сегментації зображень було використано метод автоматичної семантичної сегментації, при якій модель працює з множиною об`єктів, в якій кожному пікселю присвоюється мітка, на основі якої в подальшому зійснюється аналіз (рис.3.3).

****

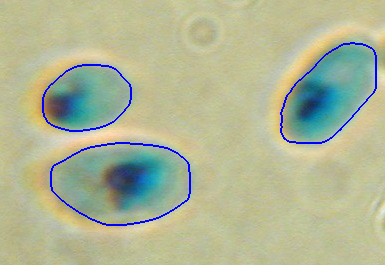
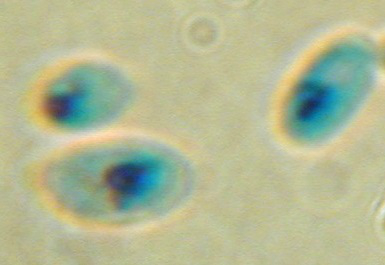


Рисунок 3.3 – Приклади зображень з експериментальних датасетів до (зліва) та після (справа) автоматичної семантичної сегментації.

Для оцінки *ефективності роботи нейронної мережі* була створена модель на основі технології згорткових нейронних мереж за допомогою мови програмування Python. В якості основної архітектури було обрано архітектуру ResNet. Після аналізу датасету, мережа здатна сегментувати окремі клітини дріжджів, визначати зону інтересу, в якій може бути виявлена реакція метахромазії, а також, підрахунок клітин з наявною реакцією МТХ. Перевірка ефективності роботи нейронної мережі проводилась на 3-х тестових зображеннях, приклад зображення на рисунку 3.4.

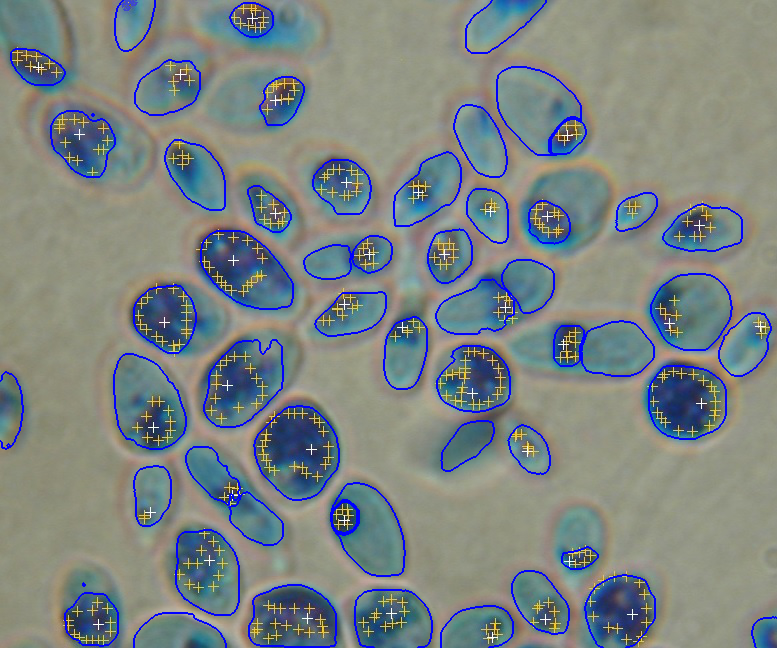
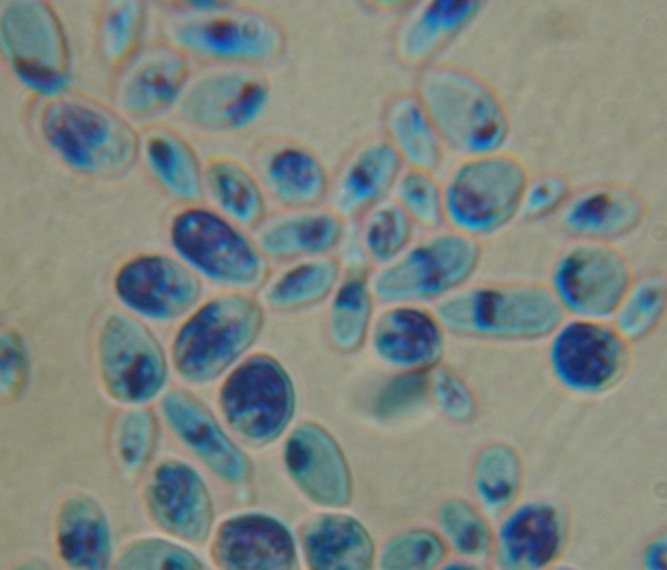
****

Рис. 3.4 – Порівняння вхідного тестового зображення з вихідним зображенням, яке отримали після роботи нейронної мережі

Аналіз відбувається шляхом порівняння кольорового фону, при цьому кожному пікселю присвоюється номер, за яким потім виділяється область, в якій виявлено явище метахромазії. Такі зони виділяються жовтими мітками, значно звужуючи діапазон пошуку реакції за кольором. Білі мітки визначають найбільш контрастний піксель всередині діапазону з жовтих міток, який необхідний для подальшого підрахунку кількості клітин з МТХ. Для перевірки роботоспроможності програм було обрано три групи тестових зображення, по одному зображенню на кожен тип реакції метахромазії волютинових гранул дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Перша група представлена у вигляді зображення з відсутністю реакції метахромазії. Друга група складалась з зображення з наявністю середнього ступеня реакції метахромазії. Третя група складалась зображення з наявністю повного ступеня реакції метахромазії.

Прикріплення міток у вигляді крапок або хрестів дозволяє уникнути розмічення даних прямокутною рамкою, так як при аналізі даних обмежувальні рамки можуть накладатись одна на одну, цим самим знижуючи точність результату.

За допомогою нейронної мережі проводився автоматичний підрахунок кількості клітин різних типів з використанням нерекурсивного алгоритму розмітки: загальну кількість клітин та кількість клітин по класам (рис.3.5). Отримані результати підрахунку кількості клітин в автоматизованому режимі порівнювалась із результатами підрахунку кількості клітин в ручному режимі

РЕЗУЛЬТАТ 1

МТХ_2 РЕЗУЛЬТАТ

**RESULT**

Рис. 3.5 – Приклад результату, який видає програма при автоматичному підрахунку клітин.

Нижче представлена таблиця оцінки результатів та порівняння різниці між автоматичною і ручною оцінкою даних. Для 3-х груп тестових зображень були отримані оновлені результати загальної кількості типів клітини з відсутністю та наявністю метахромазії та похибки отриманих результатів табл.3.1.

Таблиця 3.1 – Результати похибок при підрахунку клітин

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №  груп | Загальна кількість підрахованих клітин | | Клітини з «наявністю метахромазії» | | Клітини з «відсутністю метахромазії» | | Похибка отриманих результатів | |
| Ручний | Автомат | Ручний | Автомат | Ручний | Автомат | Абсолютна (од.) | Відносна (%) |
| 1 | 363 | 374 | 16 | 20 | 347 | 354 | 374±10 | 3,08 |
| 2 | 474 | 496 | 26 | 23 | 48 | 473 | 496±23 | 4.56 |
| 3 | 324 | 337 | 34 | 41 | 290 | 296 | 337±14 | 4.03 |

Середнє значення відносної похибки при цьому складало 3.85%, а максимальна відносна похибка дорівнювала 4.53%. З розпізнаванням контурів клітин нейронна мережа справилась, але з розпізнаванням клітин з та без явища метахромазії виникли труднощі. На мою думку, на це вплинула недостатня якість зображень, недостатній рівень їх обробки та кількість даних в датасетах.

Навчання моделі нейронної мережі дозволило визначити кількість сегментованих клітин з наявності в сегментах "реакції метахромазії" та кількість сегментованих клітин з відсутністю в сегментах такої реакції (табл. 3.2). В таблиці 3.3 приведені результати оцінок похибок цих отриманих результатів рис. (3.4).

Таблиця 3.2 – оцінка результатів роботи нейронної мережі по виявленню сегментованих клітин

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № типу зображень  в клітинах | Кількість розпізнаних клітин з наявною реакцією метахромазії різних типів | | Кількість розпізнаних сегментованих клітин | |
| Ручний  підрахунок | Автоматичний підрахунок | Ручний підрахунок | Автоматичний підрахунок |
| 1 | 0 | 0 | 30 | 27 |
| 2 | 5 | 4 | 18 | 16 |
| 3 | 39 | 36 | 43 | 47 |

Таблиця 3.3 – оцінка похибки отриманих результатів

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № типу зображень  в клітинах | Кількість розпізнаних клітин з наявною реакцією метахромазії різних типів | | Кількість розпізнаних сегментованих клітин | |
| Абсолютна похибка | Відносна похибка | Абсолютна похибка | Відносна похибка |
| 1 | - | - | 3 | 10% |
| 2 | 1 | 20% | 2 | 11% |
| 3 | 3 | 7,6% | 4 | 9,3% |

Для перевірки роботоспроможності програми було узято 3 зображення:зображення з першим, другим і третім типом реакції метахромазії. На зображенні першого типу реакції програма не виявила метахромазію, але чітко сегментувала клітини дріжджів. На зображенні другого типу реакції було знайдено осередки реакції метахромазії в сегментованих клітинах, також було виділено клітини без реакції МТХ. На зображенні третього типу реакції було сегментовано та визначено клітини з наявною метахромазією

З цих таблиц видно, що визначені сегментовані клітини можуть не мати в складі сегментів результатів "реакції метахромазії" і це підвищує точність визначення таких клітин. Середнє значення відносної похибки при цьому складає 10,1% для сегментованих клітин та 13,6% при визначенні наявності метахромазії. Відповідно, ефективність роботи нейронної мережі складає 89,9% при виявленні сегментації клітин та 86,4% при виявленні реакції метахромазії. Нейронна мережа працює достатньо точно, тому що показник на рівні ефективності >80% свідчить про достатній рівень навченості моделі нейронних мереж [44].

# 4 РОЗРОБКА ІНФОРМАЦІЙНОГО СТАРТАП-ПРОЕКТУ

**4.1 Резюме стартап-проекту**

**Назва проекту:** «Застосування нейронних мереж для оцінки кольорових та структурних змін у клітинах».

**Мета стартапу:** задовольнити потребу науково-дослідних установ у автоматизованих засобах аналізу та підрахунку клітин з метою отримання прибутку.

**Предмет стартапу**: розробка програмного забезпечення на основі нейронних мереж, яке б ефективно визначало наявність структурних та світлових змін у клітинах.

**Об’єкт стартапу**: моніторингові дані *Saccharomyces cerevisiae*, які використовувались для навчання нейронної мережі.

Результат роботи стартапу – це розроблене програмне забезпечення на основі нейронних мереж, яке швидко та ефективно здійснює підрахунок клітин, і визначає нормальні та видозмінені клітини. Даний продукт належить до 42 класу товарів та послуг – проєктування та розробляння комп'ютерного апаратного і програмного забезпечення.

Запорука успішності даного стартапу полягає в ефективності роботі нейронної мережі, а саме в показниках точного розпізнавання клітин, швидкості роботи програмного забезпечення та досвід роботи з клітинами, для розуміння видів змін.

Споживачами виступають науково-дослідні організації та лабораторно-діагностичні центри, які безпосередньо працюють з культурою клітин.

Головними перевагами даної технології є значна оптимізація людських, фінансових та часових ресурсів, зменшення впливу людського фактору.

Таблиця 4.1 – Резюме стартап-проекту

|  |  |
| --- | --- |
| **Показник** | **Характеристика** |
| 1. Сутність ідеї | Створення програмного забезпечення на основі нейронних мереж для ідентифікації світлових і структруних змін у клітинах |
| 1. Наявність аналогів або прототипів ідеї | Аналог: проєкт YeaZ, який досліджує мікроскопічні фотознімки клітин. |
| 1. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап | Відсутність ресурсозатратних процесів підрахунку та перерахуванню клітин, виключення фактору суб`єктивізму у визначенні змін у культурі клітин. |
| 1. Ступінь розробленості технології реалізації | Розроблено програмне забезпечення з показником ефективності більше 83% точності у визначенні клітин і їх структурних змін. |
| 5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів | 1. клас - проєктування та розробляння комп'ютерного апаратного і програмного забезпечення |
| 6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво | [62.0.](https://kved.biz.ua/01.13_%D0%92%D0%B8%D1%80%D0%BE%D1%89%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F_%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D1%87%D1%96%D0%B2_%D1%96_%D0%B1%D0%B0%D1%88%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D1%85_%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%83%D1%80,_%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D1%96%D0%B2_%D1%96_%D0%B1%D1%83%D0%BB%D1%8C%D0%B1%D0%BE%D0%BF%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D1%96%D0%B2) Комп'ютерне програмування, консультування та пов'язана з ними діяльність |
| 7. Очікувана потужність стартапу | Мале підприємство |
| 8. За масштабом виробництва | Масове |
| 9. За рівнем спеціалізації | Вузькопрофільне |
| 10. За ресурсами, що споживатимуться | Інформаційномістке, працемістке |
| 11. За чисельністю персоналу (мале, середнє, велике) | Мале |
| 12. Органи управління при реалізації стартапу | Національні, міжнародні |
| 13. Бажане географічне розташування  - потужностей стартапу,  -офісу стартапу,  -збутової мережі  - постачальників комплектуючих | Офіс в місті Київ, для розміщення комп`ютерних потужностей.  Збутова мережа – науково-дослідні установи, лабораторно-діагностичні центри, які працюють з культурою клітин.  Постачальником комплектуючих будуть іноземні компанії – комп`ютерні потужності, а інформаційні дані поставлятимуть наукові інститути. |
| 14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу | Розвиток технологій |
| 15. Гранична корисність ідеї стартапу | Позитивна, так як нейронна мережа постійно навчається, і, відповідно, кожне наступне використання покращує результат. |
| 16. Бізнес-модель стартапу | В2B (бізнес для бізнесу) |
| 17. Конкуренти вітчизняні | Не було знайдено конкурентів на вітчизняному ринку |
| 18. Конкуренти іноземні | YeaZ, у проєкта ведеться активна робота з дослідження клітин за допомогою нейронних мереж, є спеціалізовані архітектури для аналізу. |
| 19. Ключові фактори успіху стартапу | Компетентна команда, наявність датасетів |
| 20. Споживачі | Юридичні особи - державні та приватні науково-дослідні установи або лабораторно-діагностичні центри |
| 21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації | Одна версія програмного забезпечення |
| 22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості | Так як це програмне забезпечення, то це дозволяє масштабувати одну версію для багатьох користувачів, не витрачаючи додаткових ресурсів. |
| 23. Споживачі на етапі розвитку | Науково-дослідні установи |
| 24. Споживачі на етапі зрілості | Науково-дослідні установи, лабораторні та діагностичні центри |
| 25. Конкурентна ціна на продукт стартапу | 150 $/місяць |
| 26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту | 61 % |
| 27. Капіталовкладення в проект | 6760 $ |
| 28. Період повернення капіталовкладень у проект | 36 місяців |
| 29. Джерела фінансування | Власні фонди, кредитування |
| 30. Основні компоненти продукції стартапу | Програмне забезпечення на основі нейронної мережі для аналізу змін в клітинах. |
| 31. Потенційні постачальники складових  компонентів розробки | Іноземні - Lenovo |
| 32. Планове місце реалізації результату розробки | Науково-дослідні центри та лабораторно-діагностичні установи по всій Україні, СНД та країнах Європи. |
| 33. Наявність посередників при реалізації | Без посередників |
| 34. Методи просування результатів розробки на ринок | Просування через періодичні видавництва, наукові журнали та книги. |

**4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу**

Таблиця 4.2 – Аналіз факторів зовнішнього середовища

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фактор** | **Загрози** | **Можливості** |
| **Політика** | Зміни в податковому кодексі можуть вплинути збілшити витрати. | Можливість розповсюдження ідеї нейромережі закордон. |
| **Економіка** | Зростання цін на матеріальні ресурси.  Ріст конкуренції, при успішній реалізації стартапу | Вибір альтернативних постачальників матерільних ресурсів. |
| **Демографія** | Зменшення кількості населення призведе до спаду попиту | Збільшення попиту при зростанні кількості населення |
| **Географія** | Велика кількість потенційних конкурентів, так як велика кількість ІТ-спеціалістів знаходиться в столиці. | Значна кількість кваліфікованих кадрів, які можуть допомгти реалізувати проєкт. |
| **Соціально-культурний** | Низький рівень освіченості у питаннях автоматизованих технологій і їх застосуванні у наукових і медичних цілях. | Підвищити рівень обізнаності у сферах застосування комп`ютерних технологій у біологічних цілях. |
| **Науково-технічний прогрес** | Відсутність інтересу до даної розробки, через нестачу кваліфікації при роботі з нейронними мережами та культурою клітин.  Відсутність готових датасетів для навчання. | Створення власних наборів даних, з необхідними параметрами.  Більша кількість використань нейронних мереж, призводить до покращення результату. |

Таблиця 4.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фактор** | **Переваги** | **Недоліки** |
| **Конкуренти**   1. проєкт YeaZ | Відсутність подібної технології.  Можливість вдосконалити технологію.  Адаптація технології під власні датасети. | Відсутність чіткого розуміння про попит та ринок.  Поява схожих технологій. |
| **Постачальники**   1. Обладнання -Lenovo, ThinkPad Y-500 2. Інтернет-провайдер – ТеремкиЛан. | Обладнання підлягає ремонту, існують комплектуючі на вітчизняному ринку, присутні сервісні центри для обслуговування. | Низька швидкість інтернету. Перебої в роботі обладнання. |
| **Споживачі**   1. Юридичні особи 2. Фізичні особи | Інтерес до технології, так як відсутні готові подібні рішення.  Значне підвищення ефективності праці.  Оптимізація ресурсів. | Неактуальність технології через відсутність попиту.  Відсутність розуміння цінності технології для наукових і медичних цілей. |

Таблиця 4.4 – Аналіз зацікавлених сторін

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Зацікавлена сторона** | **Вплив її на реалізацію проекту** | **Цікавість її до проекту** | **Загальний коефіцієнт впливу на проект** |
| **Суб’єкти внутрішнього середовища** | | | |
| *Виробник:* |  |  |  |
| ТМ «YeastsMeta» | 0,8 | 0.95 | 0,875 |
| *Постачальник* |  |  |  |
| Lenovo | 0,5 | 0,1 | 0,3 |
| ТеремкиЛан | 0,5 | 0,2 | 0,35 |
| *Споживачі* |  |  |  |
| Інститут мікробіології та вірусології | 0,7 | 0,9 | 0,8 |
| Інститут клітинної терапії | 0,3 | 0,5 | 0,4 |
| Фіз. особи | 0,2 | 0,3 | 0,25 |
| **Зовнішнє середовище** | | | |
| Політичні структури | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Суб’єкти економічного середовища | 0,2 | 0,3 | 0,25 |
| Власники географічних об’єктів | 0,4 | 0,1 | 0,25 |
| Власник місця оренди | 0,4 | 0,2 | 0,3 |
| Суб’єкти демографії | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Суб’єкти культурного середовища | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Суб’єкти НТП | 0,6 | 0,8 | 0,7 |

Таблиця 4.5 – SWOT- аналіз

|  |  |
| --- | --- |
| **Сильні сторони** | **Слабкі сторони** |
| 1.Зростаня ефективності аналізу мікроскопічних фотографій.  2.Автоматизація процесів підрахунку клітин. | 1.Відсутність чітко сформованого ринку та попиту.  2.Ефективність роботи програмного забезпечення різниться з кожним дослідом. |
| **Можливості** | **Загрози** |
| 1.Відсутність конкурентів.  2.Створення нової технології і нових датасетів. | 1.Підвищенний ріст конкуренції.  2.Не якісне навчання нейронної мережі.  3.Зростання цін на електроенергію і обладнання. |

## 4.3 Визначення ключових факторів успіху проекту

Таблиця 4.6 – Визначення ключових факторів успіху проекту методом Шонфільда\*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Характерис-тики** | **Вагомість х-тики** | YeaZ  **конку-рент 1** | Інститут мікробіоло-гії та вірусології **конкурент 2** | **Мій стартап** |
| Ціна, грн | 0,5 | 5 | 4 | 4 |
| Доступ до даних | 0,4 | 3 | 5 | 5 |
| Дотримання вимог НТД | 0,1 | 2 | 4 | 5 |

\*оцінка від 1 (крайнє негативна оцінка) до 5 (крайнє позитивна оцінка)

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначається бальна оцінка кожної характеристики для нашої продукції і для конкурентів:

Рисунок 4.1 – Аналіз ключових факторів успіху проекту за Шонфільдом

Основний конкурент за підсумками аналізу виявився конкурент №2 Інститут мікробіології та вірусології. Доступ до даних має ключове значення в даній розробці. Але крім доступу до даних, необхідна правильна інтерпретація результатів, та обробка отриманих даних, саме це дозволить отримати перевагу.

Таблиця 4.7– Варіанти розвитку ідеї стартапу

|  |  |
| --- | --- |
| **Варіант** | **Стислий опис можливого розвитку** |
| А. Найкращий | Розвиток стартапу проходить вдало, кількість користувачів зростає, при цьому зростає ефектиність роботи програмного забезпечення. Точка беззбитковості досягається за 18 місяців. Широкий попит серед іноземних наукових установ дозволяє розширити географію співпраці. |
| Б. Реалістичний | Технологія пройшла успішну апробацію в науково-дослідних центрах, але в ролі користувачів таких центрів одиниці. Це в свою чергу збільшує час настання точки беззбитковості. Основна увага приділяється розширенню бази користувачів. |
| В. Песимістичний | Відсутність попиту на створене програмне забезпечення. І як варіант вирішення цієї проблеми – продаж ідеї і напрацювань або зміна вектору навчання нейромережі для інших задач. |

**4.4 Визначення потенційних споживачів**

Таблиця 4.8 – Класифікація потенційних споживачів

|  |  |
| --- | --- |
| **Критерій** | **Значення** |
| **Юридична особа** | |
| 1. Форма власності | Приватна, державна |
| 2. КВЕД | 86.10 Діяльність лікарняних закладів.  86.90 Інша діяльність у сфері охорони здоров'я |
| 3. За потужністю | Малі, середні |
| 4. За масштабом виробництва | Одиничні |
| 5. За рівнем спеціалізації | Вузькопрофільні, багатопрофільні |
| 6. За ресурсами, що споживаються | Матеріаломісткі, капіталомісткі, працемісткі,інформаційномісткі |
| 7. За чисельністю персоналу | Малі, середні |
| 8. За сферою діяльності | Посередницькі |
| 9. За приналежністю капіталу і контролю | Національні, іноземні, спільні |
| 10. За географічним розташуванням | Країни СНД та Європи |
| 11. За віддаленістю органів управління | Національні, міжнародні |
| 12. За характером господарської діяльності | Медичні, комп`ютерні |
| 13. За рівнем технологічної цілісності | Провідні, філії |
| 14. За долею іноземного капіталу | З іноземними інвестиціями (більше 10 %) |
| 15. За формуванням статутного капіталу | Унітарні |
| 16. За організацією виробничих процесів | Періодичні |
| 17. За роботою протягом року | Позасезонні |
| 18. За географічним розташуванням на території України | У обласних центрах |
| 19. За наявністю вільних ОбЗ (коштів) | Наявні |
| 20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи:  - регіон  - чисельність населення  - динаміка росту регіону  - структура регіону  - правові обмеження торгівлі | Регіон: місто Київ  Чисельність населення: 2,88 млн (2021 р.)  Динаміка росту регіону: з кожним роком населення зростає на 10-40 тисяч осіб.  Структура регіону: територія міста поділена на 10 адміністративних районів.  Правові обмеження торгівлі: відсутні |
| **Фізична особа** | |
| 1. Вік | Не має значення |
| 2. За платоспроможністю | 50$/рік |
| 3. За соціальним рівнем споживачів | ЗП від 700 $/місяць |
| 4. За способом життя (звички, традицій, стереотипи поведінки) | Фізично, психологічно, емоційно та духовно зрілі особистості. |
| 5. Тип особистості споживачів | Реаліст |
| 6. За ставленням до товару | Мотивація придбання: інтерес до вивчення клітин  Пошук вигоди: знаходження нових закономірностей для монетизації результатів.  Ставлення до товару: позитивне.  Інформованість про товар: цільова аудиторія проінформована через статі в журналах і виданнях.  Інтенсивність споживання товару: коливається від одного місяця до кількох років. |
| 7. За сімейними цінностями (склад сім’ї, рівень сімейного доходу, етап життєвого циклу сім’ї, традиції) | Рівень сімейного доходу достатній для використання програмного забезпечення. |
| 8. За співвідношенням бажання придбати і цінової межі | Місячний дохід (від 700$/місяць) – вартість одиниці товару (50 $/місяць)  14 : 1 |
| 9. За інтенсивністю споживання товару | Разове або періодичне придбання |
| 10. За інформованістю | Самоосвіта, спеціальні джерела |

Таблиця 4.9 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

|  |  |
| --- | --- |
| **Категорія (група) клієнтів** | **Потреби, які задовольняються за допомогою продукту** |
| 1. Науково-дослідні установи та лабораторно-діагностичні центри | Оптимізація людських ресурсів з підвищенням ефективності роботи, більш точні визначення змін у клітинах. |
| 2. Фізичні особи | Підвищення рівня освіченості, пошук нових закономірностей в наборах даних. |

Таблиця 4.10 – Паспорт потенційного клієнта

|  |  |
| --- | --- |
| **Характеристика** | **Значення** |
| Організаційно-правова форма | ТОВ |
| Класифікація | За потужністю: мале  За чисельністю персоналу: мале  За обсягом виробництва: одиничне  За сезонністю виробництва: позасезонне |
| Розташування | Не залежно від розташування |
| Вид продукту, який потрібен даному споживачеві | Програмне забезпечення на основі нейронних мереж |
| Призначення придбаної розробки | Придбана розробка застосовується для підрахунку клітин і визначення структурних і світлових змін. |
| Кваліфікація персоналу підприємства | Кваліфікований і компетентний персонал |
| Потенційний обсяг споживання розробки | 3-5 років. |
| Хто приймає рішення про придбання розробки | Директор науково-дослідного інституту або лабораторно-діагностичного центру |

Таблиця 4.11– Запланований обсяг реалізації стартап-продукту (товарів, послуг)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Січень, 2022** | **Лютий, 2022** | **Березень,**  **2022** | **Квітень**  **2022** | **Травень, 2022** | **Червень,**  **2022** | **Липень, 2022** | **Серпень, 2022** | **Вересень,2022** | **Жовтень, 2022** | **Листопад, 2022** | **Грудень,**  **2022** |
| Кількість користувачів | 3 | 5 | 7 | 10 | 10 | 10 | 13 | 13 | 15 | 25 | 20 | 20 |

За перший місяць плануєтьсч запустити платформу з програмним забезпеченням, перевірити роботоспроможність і залучити перших 3-х постійних користувачів. Завдки першим користувачам, вдасться ліквідувати наявні помилки в програмному забезпеченні, покращити ефективність роботи.

Далі планується поступове залучення людей з наукового кола завдяки описаних в статтях дослідах з використанням створеного програмного забезпечення.

До кінця року необхідно залучити 20 постійних користувачів, при цьому постійно покращувати нейронну мережу, вирішуючи виникаючі задачі.

## 4.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Таблиця 4.12 – Витрати, передбачені для створення програмного забезпечення на основі нейронних мереж

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Стаття витрат** | **Витрати на місяць, дол.** | **Витрати за рік, дол.** | **Разові витрати** | **Разом за рік** |
| Купівля або оренда приміщення | 200 | 2400 |  | 2400 |
| Купівля обладнання |  |  | 1500 | 15 00 |
| Витратні матеріали | 5 | 60 |  | 60 |
| Створення та обслуговування сайту, хостингу, покупка необхідних скриптів |  |  | 300 | 300 |
| Зарплата | 200 | 2400 |  | 2400 |
| Сплата податків | 100 | 1200 |  | 1200 |
| Непередбачені витрати |  |  | 1 00 | 1 000 |
| Разом | 405 | 4860 | 2800 | 6760 |

Таблиця 4.13– Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Найменування**  **товару** | **Планові обсяги продажу** | | **Аналоги, прототипи** | |
| **Кількість користувачів на рік** | **Ціна, дол/рік** | **Кількість користувачів на рік** | **Ціна, дол/рік.** |
| ПЗ на основі нейронних мереж для розпізнавання змін в клітинах | 36 | 150 | YeaZ,  20 | 250 |

Основні методи ціноутворення:

1. *Витратний метод.*

Ц = С + %П = + 20 % = 225 дол, (5.1)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку.

1. *Агрегатний метод.*

Не застосовуємо цей метод для даної технології.

1. *Параметричний метод.*

Цн = Цб = = 187,5 дол/рік, (5.2)

де Цн – ціна нового продукту, грн., Цб – ціна базового продукту (була взята ціна на технологію проєкту YeaZ, дол., Бб – бали за властивості базового продукту, Бн – бали за властивості нового продукту (для нашого продукту: спосіб обробки даних та архітектура нейромережі).

1. *Метод точки беззбитковості.*

Ц = С = = = 187,7 дол/корист., (5.3)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн.

1. *Метод конкурентних цін.*

Ц = = = 200 дол/рік, (5.4)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., Цx1,x2,x3 – ціни конкурентів, грн., N – кількість використаних цін конкурентів.

Був знайдений лише 1 конкурент, але технології неоднакові і можуть дотикатись лише в певних областях.

Таблиця 4.14– Забезпеченість проєкту основними засобами

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Місце ОЗ у технологічному процесі** | **Назва ОЗ** | **Повна початкова вартість ОЗ, дол** | **Плановий період експлуатації ОЗ, років** | **Очікуваний постачальник** | **Джерело фінансування придбання** |
| Стадія росту продукту | Комп`ютерне обладнання | 1500 | 5 | Lenovo | Власні фонди |
| Стадія росту продукту | Платформа з нейромережею | 500 | 5 | Розроблено самостійно | Власні фонди |
| Увесь процес | Будівля | 2400 | 15 | ------------- | Власні фонди |

Таблиця 4.15 **–** Забезпеченість проекту оборотними фондами

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Група ОбФ** | **Назва** | **Норма витрат на рік** | **Ціна, дол/од** | **Очікуваний постачальник** | **Джерело фінансування** |
| Паливо, електроенергія | Електроенергія | 18800 кВт | 0,063 | Київтеплоенерго | Власні фонди |
| Інші витрати | Податки | - | 100 | ДПС |
| Аренда сервера та домена | Сервер, домен | - | 100 | Weebly |

Таблиця 4.16 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Категорія кадрів** | **Назва посади** | **Чис.** | **Кваліфікаційні вимоги** | **Плановий рівень**  **Зароб.**  **плати, дол** | **Джерела фінансування**  **ФОП** |
| Спеціалісти | Інженер-програміст | 1 | Наявне портфоліо з реалізації проєктів на основі нейронних мереж. | 400 | Прибуток |
| Спеціаліст | Незалежний науковий консультант | 1 | Досвід роботи за спеціальністю від 2 років. Профільна вища освіта, досвід роботи з культурою клітин. | 200 | Прибуток |

Таблиця 4.17– Техніко-економічні показники проекту

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Показники** | **Одиниця виміру** | **Умовне позначення, формула розрахунку** |
| 1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики | користувачів | В = 36 |
| 2. Середньорічна чисельність персоналу за списком | Осіб | О = 2 |
| 4.Середньорічний виробіток робітника | Корист./особу | 18 |
| 5. Капіталовкладення у проект: |  | К = 4860  135 |
| - всього | Дол. |
| - на одиницю продукції | Дол./од. |
| 6. Повна собівартість: |  | К = 6760  187,7 |
| - всього  - на одиницю продукції | Дол.  Дол./од. |
| 7. Відносний прибуток | Дол./корист. | П = 138,03 |
| 8. Рентабельність | % | Р= (П/С ) ×100 = 61 % |
| 9. Період повернення капіталовкладень | Місяців | Тпов= К/П =  36 місяців |
| 10. Фондовіддача виробничих фондів | Дол./дол. | ФВ=(Ц×В)/ОФ = 0,79 |
| 11. Фондоємкість | Дол./дол. | ФЄ = 1/ФВ=1,26 |
| 12. Продуктивність праці | Дол./особу | ПП= В/(Чсп× Т)= 6 |
| 13. Коефіцієнт економічної ефективності |  | Е=П/К=0,02 |

**4.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту**

Таблиця 4.18 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Стадія реалізації стартап-**  **проекту** | **Бізнес-процеси** | **Характеристики** | | |
| **Задіяні ресурси** | **Орієнтовна тривалість процесу**  **(у днях)** | **Верхня межа фінансових витрат, дол** |
| **Розробка ідеї стартапу** | 1. Пошук ідеї | Людський, інтернет | 14 | 70 |
| 2. Аналіз інформації | Людський, інтернет, | 7 | 50 |
| 3. Формулювання процесу монетизації проєкту | Людський | 21 | 40 |
| **Реалізація ідеї** | 4. Аналіз ринку нерухомості для пошуку офісного приміщення | Людський, приміщення,  засоби зв’язку та передачі інформації | 21 | 100 |
| 5. Підготовка приміщення | Людський | 14 | 250 |
| 6. Придбання та установка апаратури | Людський,  обладнання приміщення, | 7 | 1500 |
| 7. Розробка технології програмного забезпечення | Людський,  комп’ютер | 90 | 100 |
| 8. Пошук персоналу | Людський, інструкції та навчальні матеріали, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації,  приміщення | 30 | 300 |
| **Впровадження у виробництво** | 9. Доопрацювання технології, виправлення помилок | Людський,  обладнання,  комунікації, | 14 | 100 |
| **Випуск готового продукту** | 10. Організація наукової діяльності в періодичних виданнях | Людський,  інтернет | 30 | 150 дол / місяць |
| **Закриття або продаж проекту** | 11. Пошук покупців технології | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації,  презентації | 30 | 30 |
| 12. Переговори з покупцями | Людський,  засоби зв’язку та передачі інформації,  приміщення | 7 | 50 |
| 13. Продаж технології | Людський | 3 | - |

Таблиця 4.19 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Функції** | **Елементи** | |
| **Інженер-програміст** | **Незалежний науковий консультант** |
| 1. Пошук ідеї | + |  |
| 2. Аналіз інформації | + | + |
| 3. Формулювання процесу монетизації проєкту | + |  |
| 4. Аналіз ринку нерухомості для пошуку офісного приміщення | + |  |
| 5. Підготовка приміщення | + |  |
| 6. Придбання та установка апаратури | + |  |
| 7. Розробка технології програмного забезпечення | + | + |
| 8. Пошук персоналу | + | + |
| 9. Доопрацювання технології, виправлення помилок | + | + |
| 10. Організація наукової діяльності в періодичних виданнях | + | + |
| 11. Пошук покупців технології | + |  |
| 12. Переговори з покупцями | + |  |
| 13. Продаж технології | + |  |

**4.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними**

Таблиця 4.20 – Ризики інноваційної розробки

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Назва стадії реалізації проекту** | **Бізнес- процеси** | **Зовнішні ризики** | **Внутрішні ризики** |
| **Розробка ідеї стартапу** | 1. Пошук ідеї |  | Нестача знань у певних областях |
| 2. Аналіз інформації |  | Невміння шукати інформацію, відсутність доступу до якісної інформації. |
| 3.Формулювання процесу монетизації проєкту | Відсутність можливості монетизувати проєкт | Відсутність ідей монетизації проєкту, |
| **Реалізація ідеї** | 4. Аналіз ринку нерухомості для пошуку офісного приміщення | Недоброчестність рієлторів, низька якість приміщень, відсутність необхідних комунікацій | Висока орендна плата |
| 5. Підготовка приміщення |  | Збільшення орендної плати через витрати на облаштування приміщення |
| 6. Придбання та установка апаратури | Пошкодження обладнання в процесі доставки | Неправильно обране обладнання та апаратура |
| 7. Розробка технології програмного забезпечення | Відсутність готового обладнання, необхідність ручного збирання обладнання. | Невірно підібрані комплектуючі для обладнання, невірно обрані дані для створення програмного забезечення. |
| 8. Пошук персоналу | Незначний відгук серед найманих робітників | Міжособистісні конфлікти |
| **Впровадження у виробництво** | 9.Доопрацювання технології, виправлення помилок | Відсутність готових рішень | Неможливість самотужки виправити помилки, необхідність звертатись до сторонньої допомоги. |
| **Випуск готового продукту** | 10. Організація наукової діяльності в періодичних виданнях | Відсутність зростання інтересу до технології | Вибір не правильних каналів для поширення діяльності. |
| **Продаж проекту** | Продаж технології |  | Незадовільні умови продажу. |

Таблиця 4.21 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Види ризиків** | **Назва ризику** | **Ймовірність настання** | **Вплив на очікуваний результат** |
| **Зовнішні ризики** | | | |
| Науково-технічний ризик | Відсутність доступу до якісної інформації | 1 | 1 |
| Політико-законодавчий ризик | Зміни в законодавстві, стосовно оформлення юридичної особи, оподаткування бізнесу. | 2 | 2 |
| Макроекономічний, інвестиційний ризик | Відсутність джерел фінансування | 2 | 3 |
| Науково-технічний ризик | Неправильно підібрані комплектуючі при самостійному формуванні обладнання | 1 | 2 |
| Товарний ризик | Відсутність готового обладнання на ринку. | 1 | 2 |
| Ринковий ризик | Відсутність сформованого ринку та попиту | 2 | 2 |
| **Внутрішні ризики** | | | |
| Інформаційний ризик | Невміння шукати актуальну інформацію | 1 | 2 |
| Техніко-технологічний ризик | Присутність помилок через людський фактор і нестачу знань | 2 | 3 |
| Майновий ризик | Не вигідні умови оренди | 2 | 1 |
| Фінансовий ризик | Неправильний підрахунок фінансових ресурсів для реалізації проєкту | 1 | 3 |
| Інформаційний, організаційний ризик | Не вірно обраний канал який спрямований не на цільову аудиторію | 3 | 1 |

Таблиця 4.22 – Матриця оцінки ризиків

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **За впливом ризиків на очікуваний результат** | | **За ймовірністю настання ризиків** | | |
| **Критерій ризику** | **Числове значення** | Низька ймовірність | Середня ймовірність | Висока ймовірність |
| **1** | **2** | **3** |
| Високий рівень впливу | **3** | 1 (1 х 3) | 2 (2 х 3) | 1(3 х 3) |
| Середній рівень впливу | **2** | 4 (1 х 2) | 2 (2 х 2) | 0 (3 х 2) |
| Низький рівень впливу | **1** | 0 (1 х 1) | 1 (2 х 1) | 0 (1 х 1) |

Таблиця 4.23 – План заходів з управління ризиками

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Назва ризику** | **Назва методу управління ризиком** | **Відповідальні виконавці** | **Період виконання / застосування методу** | **Очікувані результати від впровадження методів управління** |
| Науково-технічний ризик | Пошук інформації лише з перевірених джерел | Незалежний науковий консультант | Увесь час | Фунламентальна інформація для надійних дослідів |
| Політико-законодавчий ризик | Завчасно моніторити усі зміни в законодавстві | Інженер-програміст | Увесь час | Відсутність довгого процесу оформленню документів |
| Макроекономічний, інвестиційний ризик | Правильне планування ресурсів, які доступні на даний час | Інженер-програміст | Увесь час | Відсутність боргів чи розбіжностей в планах |
| Науково-технічний ризик  Товарний ризик | Звернення до сторонньої допомоги кваліфікованих кадрів | Інженер-програміст | За необхідності | Розробка нової технології |
| Ринковий ризик | Контактувати з виробниками, можливо вони можуть створити обладнання за спецзамовленням | Інженер-програміст | За необхідності | Якісне виготовлення комплектуючих обладнання |
| Інформаційний ризик | Активне дослідження ринку, виялення прихованого попиту | Інженер-програміст | За необхідності | Виявлення попиту і тенденцій на ринку |
| Техніко-технологічний ризик | Активна перевірка проробленої роботи незалежним науковим консультантом | Незалежний науковий консультант | Увесь час | Усунення помилок через неуважність |
| Майновий ризик | Пошук альтернативних варіантів | Інженер-програміст | Увесь час | Пошук оптимальних варіантів офісу |
| Інформаційний, організаційний ризик | Тестування різних каналів впливу на аудиторії | Інженер-програміст | За необхідності | Ефективне просування продукту в маси |

# ВИСНОВКИ

# За результатами виконаного дослідження зроблено наступні висновки:

1. Для дослідження світлових і структурних змін було створено програмний засіб на основі нейронних мереж на мові Python та визначено, що модель на основі архітектури ResNet ефективно справляється з задачами розпізнавання сегментації та реакції метахромазії в клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae.*
2. Для автоматичного підрахунку клітин була створена модель регресії, яка визначає залежність між клітинами з ознаками наявності та відсутності реакції метахромазії, з точністю визначення в задачах сегментації на рівні 89,9%, а в задачі виявлення метахроматичної реакції – 86,7%.
3. Модель на основі архітектури U-net показує результат у вигляді числа підрахованих клітин з визначеними світловими змінами із середнім значенням відносної похибки, що складає 3.85%. Зважаючи на результат робот обох архітектур, U-net має нижче значення похибки при визначенні клітин.

4. Архітектура згорткової нейронної мережі ResNet всеодно є оптимальною для створення програмного засобу для аналізу структурних і світлових змін в клітинах із показником ефективності >80%, що свідчить про достатній рівень навченості нейронної мережі.

5. На основі отриманих даних був розроблений стартап-проєкт. Для його реалізації необхідний стартовий капітал у розмірі 6760$, рівень рентабельності при реалізації продукту становить 61%.

# СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Gromozova E.N. [и др.]. Research of Metachromatic Reaction of Saccharomyces cerevisiae // Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993). 2016.

2. Rogacheva S.M. / IOP Conf. Ser.: Earth Environ//. Sci. 853, 2021.

3. M. S. Kharchuk, E. N. Gromozova / Wastewater components effect on metachromasia reaction of volutin granules in vitro // [Biotechnologia Acta](http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?Z21ID=&I21DBN=UJRN&P21DBN=UJRN&S21STN=1&S21REF=10&S21FMT=JUU_all&C21COM=S&S21CNR=20&S21P01=0&S21P02=0&S21P03=IJ=&S21COLORTERMS=1&S21STR=%D0%96100178). – 2017. - Vol. 10, № 6. - С. 28-34.

4. Gromozova E.N. / The reaction of phosphorus containing intracellular inclusions on the change of space weather // Kachur T.L., Voychuk S.I., Kharchuk M.S.  - Odessa Astronomical Publications, 2015.

5. Вариабельность оптических свойств метиленового синего в растворах неорганического полифосфата натрия как одна из причин метахромазии / В. С. Мартынюк, Е. Н. Громозова, И. В. Лукьяненко и др. // Физика живого. - Т. 18. - № 2. - 2010. - С. 41-46.

# 6. Christ J.J/ Methods for the Analysis of Polyphosphate in the Life Sciences// Willbold S., Blank L.M. - Anal Chem. 2020 Mar 17;92(6):4167-4176.

7. Christ J.J./ Novel polyphosphate analytics for the development of biotechnological polyphosphate production//- Applied microbiology ; 19, 2020.

8. Gray, M. J., Wholey, W. Y., Wagner, N. O., Cremers, C. M., Mueller-Schickert, A., Hock, N. T., Krieger, A. G., Smith, E. M., Bender, R. A., Bardwell, J. C., & Jakob. Polyphosphate is a primordial chaperone. Molecular cell, 53(5), 689–699, – 2014.

9. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. J Oral Maxillofac Pathol. 2012 May;16(2):251-255.

10. Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G. E. Imagenet classification with deep convolutional neural networks //Advances in neural information processing systems. – 2012. – Т. 25. – С. 1097-1105.

11. Liu, X.; Song, L.; Liu, S.; Zhang, Y. A Review of Deep-Learning-Based Medical Image Segmentation Methods // Sustainability 2021, 13, 1224.

12. Xue, Yao & Ray, Nilanjan & Hugh, Judith & Bigras, Gilbert.. Cell Counting by Regression Using Convolutional Neural Network. 9913. 274-290 –2016.

13. Mohit Sewak, Md Rezaul Karim, and Pradeep Pujari. Practical Convolutional Neural Networks: Implement advanced deep learning models using Python. Packt Publishing Ltd, – 2018.

14. Shanmugamani R. Deep Learning for Computer Vision: Expert techniques to train advanced neural networks using Tensorflow and Keras. Packt Publishing Ltd, – 2018.

15. Szegedy, Christian & Liu, Wei & Jia, Yangqing & Sermanet, Pierre & Reed, Scott & Anguelov, Dragomir & Erhan, Dumitru & Vanhoucke, Vincent & Rabinovich, Andrew. (2015). Going deeper with convolutions. The IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). 1-9. 10.1109/CVPR.2015.7298594.

16. Tongfan Guan and Hao Zhu. Atrous faster r-cnn for small scale object detection. In 2017 2nd International Conference on Multimedia and Image Processing (ICMIP), pages 16–21. IEEE, – 2017.

17. Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Delving deep into rectifiers: Surpassing human-level performance on imagenet classification. In Proceedings of the IEEE international conference on computer vision, pages 1026–1034, – 2015.

18. Kaiming He, Xiangyu Zhang, Shaoqing Ren, and Jian Sun. Deep residual learning for image recognition. In Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition, pages 770–778, – 2016.

19. Carlos X Hernández, Mohammad M Sultan, and 31Vijay S Pande. Using deep learning for segmentation and counting within microscopy data. arXiv preprint arXiv:1802.10548, – 2018.

20.Yao Xue and Nilanjan Ray. Cell detection in microscopy images with deep convolutional neural network and compressed sensing, – 2018.

21. Ruder, S. An overview of gradient descent optimization algorithms. ArXiv, abs/1609.0474, – 2016.

22. A. Shrestha and A. Mahmood, "Review of Deep Learning Algorithms and Architectures," in IEEE Access, vol. 7, pp. 53040-53065, 2019, doi: 10.1109/ACCESS.2019.2912200.

23. Arnaud Joly. Exploiting random projections and sparsity with random forests and gradient boosting methods. arXiv:1704.08067, 2016.

24. Ibtehaz N, Rahman MS. MultiResUNet : Rethinking the U-Net architecture for multimodal biomedical image segmentation. Neural Netw. 2020 Jan;121:74-87.

25. Rizwan-i-Haque, Intisar & Neubert, Jeremiah. Deep learning approaches to biomedical image segmentation. 2020, Informatics in Medicine Unlocked. 18.

26. Yan Kong, Hui Li, Yongyong Ren, Georgi Z. Genchev, Xiaolei Wang, Hongyu Zhao, Zhiping Xie, and Hui Lu, "Automated yeast cells segmentation and counting using a parallel U-Net based two-stage framework," OSA Continuum 3, 982-992 (2020).

27. Bergholt N., Lysdahl H., Lind M., Foldager C. Standardized Method of Applying Toluidine Blue Metachromatic Staining for Assessment of Chondrogenesis. Cartilage. 2019;10(3):370-374.

28. S. Kim Suvarna, Christopher Layton, John D. Bancroft, Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition),p.178-192, – 2019.

29. Erik Meijering / A bird’s-eye view of deep learning in bioimage analysis.Computational and Structural Biotechnology Journal,Volume 18, Pages 2312-2325, – 2020.

30. Y. Wu, Y./Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning// Rivenson, H. Wang, Y. Luo, E. Ben-David, L.A. Bentolila Nat Methods, 16, pp. 1323-1331 – 2019.

31. E. Meijering/Imagining the future of bioimage analysis// A.E. Carpenter, H. Peng, F.A. Hamprecht, J.C. Olivo-Marin. Nat Biotechnol, 34, pp. 1250-1255 – 2016.

32. Min Seonwoo. Deep Learning in Bioinformatics. Briefings in Bioinformatics. 2016

33. Bergstra J, Bengio Y. Random search for hyper-parameter optimization. The Journal of Machine Learning Research 2012;13(1):281-305.

34. Kusumoto, D., Yuasa, S. The application of convolutional neural network to stem cell biology. Inflamm Regener 39, 14, – 2019.

35. Klyuchko, Olena. Application of artificial neural networks method in biotechnology. Biotechnologia Acta. – 2017.

36. Nguyen SP, Shang Y, Xu D. DL-PRO: A novel deep learning method for protein model quality assessment. In: Neural Networks (IJCNN), 2014 International Joint Conference on. 2014. p. 2071-2078.

37. Alice M. Lucas,  / [Open-source deep-learning software for bioimage segmentation](https://www.molbiolcell.org/doi/abs/10.1091/mbc.E20-10-0660)// Pearl V. Ryder, Bin Li, Beth A. Cimini, Kevin W. Eliceiri, and Anne E. Carpenter Molecular Biology of the Cell pp.823-829 – 2021.

38. Y.W Tsang I.A. Cree D.R.J. Snead K. Sirinukunwattana, S.E.A. Raza and N.M. Rajpoot. Locality sensitive deep learning for detection and classification of nuclei in routine colon cancer histology images. IEEE Transactions on Medical Imaging., 2016.

39 Roux L., Daniel Racoceanu, N. Lom´enie, Maria S. Kulikova, Humayun Irshad, J. Klossa, Fr´ed´erique Capron, Catherine Genestie, Gilles Le Naour, and Metin N. Gurcan. Mitosis detection in breast cancer histological images, an icpr 2012 contest. Journal of Pathology Informatics, 4, 05/2013 2013.

40 Xue, Yao & Ray, Nilanjan. Cell Detection with Deep Convolutional Neural Network and Compressed Sensing. (2017).

41Weidi X., Alison N., and Zisserman A. Microscopy cell counting and detection with fully convolutional regression networks. Computer methods in biomechanics and biomedical engineering: Imaging & Visualization, 6(3):283–292, 2018.

42. Ross Girshick, Jeff Donahue, Trevor Darrell, and Jitendra Malik. Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation. Computer Vision and Pattern Recognition, 2014.

43. Yann LeCun, Yoshua Bengio, and Geoffrey Hinton. Deep learning. Nature, 521:436–444, 2015.

44. Livathinos, N.S., Berrospi, C., Lysak, M., Kuropiatnyk, V., Nassar, A., Carvalho, A.C., Dolfi, M., Auer, C., Dinkla, K., & Staar, P.W.. Robust PDF Document Conversion Using Recurrent Neural Networks. AAAI, – 2021.