

UNIVERZITET U BEOGRADU
MAŠINSKI FAKULTET

Aleksandra Lj. Dragičević

**Biomehanička i optička karakterizacija
epidermalnog tkiva**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

Aleksandra Lj. Dragicevic

**Biomechanical and optical characterization of
epidermal tissue**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentor doktorske disertacije

dr Lidija Matija, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

dr Zoran Krivokapić, akademik, redovni profesor (komentor)
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

dr Aleksandra Vasić-Milovanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

dr Branislava Jeftić, docent
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

dr Goran Lazović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

Datum odbrane:

*Doktorsku disertaciju posvećujem Mojim roditeljima
za sve što su mi pružili i naučili, mom sinu Stefanu i
bratu Marku na ljubavi, razumevanju, podršci i snazi
koju su mi pružali.*

PREDGOVOR

Doktorska disertacija na temu „ Biomehanička i optička karakterizacija epidermalnog tkiva“ proistekla je iz rada na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III41006, pod nazivom „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“. Eksperimentalni deo doktorske disertacije, primenom Optomagnetne imidžing spektroskopije i biomehanike tkiva za ranu dijagnostiku kolorektalnog carcinoma, rađen je na Prvoj Hirurškoj klinici Medicinskog fakulteta u Beogradu i u laboratoriji Nanolab Mašinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Tokom trajanja projekta, a i tokom izrade doktorske disertacije imala sam čast i zadovoljstvo da saradujem i diskutujem sa stručnjacima iz oblasti biomedicinskog inženjerstva, medicine, veštačke inteligencije, matematike i fizike kojima dugujem zahvalnost.

Ovom prilikom želim neizmerno da se zahvalim Prof. dr Lidiji Matiji, mom mentoru i rukovodiocu projekta i Prof. dr Đuri Korugi, koji je začetnik i idejni tvorac primenjene metode Optomagnetne imidžing spektroskopije, na inicijalnoj ideji i ukazanoj šansi da radim na Katedri za Biomedicinsko inženjerstvo Mašinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i usavršavam se u polju biomedicinskog inženjerstva kroz laboratorijski rad, brojna stručna usavršavanja u zemlji i inostranstvu koja su mi pomogla da na što bolji način realizujem ideju, i naravno ne manje važan aspekt rada sa studentima. Hvala Vam na podršci, ohrabrenjima, kritikama i “vetru u leđa” da savladam kako rad na disertaciji, tako i važnim životnim lekcijama.

Posebnu zahvalnost želim da iskažem akademiku, Prof. dr Zoranu Krivokapiću, mom komentoru za savete, komentare, za omogućen pristup eksperimentalnom radu, načinu organizovanja prikupljanja uzoraka na Prvoj Hirurškoj klinici Kliničkog centra Srbije i podršku tokom celokupnog rada. Veliko hvala timu Prof. Krivokapića na vremenu, volji i želji, koje su izdvojili da mi pomognu i olakšaju rad kako stručnim savetima i objašnjenjima, tako i u praktičnom pogledu prilikom snimanja uzoraka.

Takođe se zahvaljujem i Prof. dr Aleksandri Vasić-Milovanović, doc. dr Branislavi Jeftić i Prof. dr Goranu Lazoviću na savetima i stručnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije. Prof. Dr Draganu Aleksendriću hvala na savetima, literaturi i objašnjenjima u oblasti veštačke inteligencije. Prof. dr Aleksandru Tomiću se zahvaljujem na objašnjenjima i saradnji tokom dugog niza godina. Kolegama Borisu Kosiću i Ivanu Đuričiću dugujem veliku zahvalnost na pomoći oko akvizicije podataka i podrške prilikom obuke i rada na uređaju JR-6A. Kolegi Marku Barošu želim da se zahvalim na pomoći oko klasifikacije podataka.

Na kraju, beskrajno hvala mom sinu i mojoj divnoj porodici, mojim prijateljima i kolegama na podršci i razumevanju bez kojih ovaj rad ne bi imao ovoliki značaj za mene.

BIOMEHANIČKA I OPTIČKA KARAKTERIZACIJA EPIDERMALNOG TKIVA

Sažetak

Kolorektalni karcinom je jedan od glavnih zdravstvenih problema u razvijenim zemljama. Optomagnetna imidžing spektroskopija (OMIS) kao nova metoda za karakterizaciju različitih vrsta materijala, uključujući i ljudska tkiva, se u ovoj Disertaciji po prvi put koristi za rano otkrivanje raka debelog creva. OMIS metoda zasniva se na interakciji svetlosti i materije i daje biofizičke parametre za karakterizaciju tkiva zdravo/bolesno. Da bi se izmerila razlika zaostalog magnetizma između zdravog tkiva i tkiva karcinoma debelog creva, primenjen je dvobrzinski spinner magnetometar JR-6A, sa tačnošću $\pm 2,4 \mu\text{A/m}$ (3pT). Kako su ove dve metode komplementarne, JR-6A je korišćen da karakteriše ukupnu zapreminu tkiva i potvrdi da optomagnetna imidžing spektroskopija koja meri paramagnetna/dijamagnetna svojstva tkiva u tankim površinskim slojevima daje relevantne podatke za klasifikaciju zdravo/bolesno. OMIS spektri daju tačnost do 92.5% korišćenjem višeslojne neuronske mreže kao klasifikatora, dok podaci magnetometra na bazi parametarskog frakcionog računa daju tačnost 86.1%. Ovim je pokazano da obe metode jasno razlikuju zdravo tkivo od kancerogenog. Dobijeni rezultati pokazuju da bi se ova nova neinvazivna metoda mogla koristiti za karakterizaciju tkiva *ex vivo*. Međutim, kao takva OMIS metoda otvara mogućnost korišćenja u *in vivo* uslovima u kombinaciji sa modifikovanom kolonoskopijom što bi lekarima pomoglo u ranijem otkrivanju kancera debelog creva.

Ključne reči: Optomagnetna imidžing spektroskopija, kolorektalni karcinom, neuronske mreže, skrining, klasifikacija, diferencijacija tkiva

Naučna oblast: Oblast tehničkih nauka, Mašinstvo

Uža naučna oblast: Biomedicinsko inženjerstvo

UDK broj:

BIOMECHANICAL AND OPTICAL CHARACTERIZATION OF EPIDERMAL TISSUE

Abstract

Colorectal carcinoma is one of the major health problems in industrialized countries. Opto-magnetic imaging spectroscopy (OMIS) as a new imaging method for the characterization of various materials, including human tissues, is used in this Dissertation for the first time for early detection of colon cancer. The OMIS method is based on light-matter interaction and allows biophysical criteria in tissue characterization, healthy/cancer. To measure the difference of the remanent magnetism between healthy and colon cancer tissue, a dual-speed spinner magnetometer JR-6A, with accuracy $\pm 2.4 \mu\text{A/m}$ (3pT) was applied. As both of these methods are complementary to each other, JR-6A was used to characterize the total tissue volume and to confirm that opto-magnetic imaging spectroscopy measuring the paramagnetic/diamagnetic properties of tissue in thin surface layers providing relevant data for the healthy/cancer classification. OMIS spectra give an accuracy of up to 92.5% using the Perceptron multilayer neural network as a classifier, while magnetometer data give an accuracy of 86.1%. This shows that both methods clearly distinguish healthy tissue from cancer tissue. The obtained results indicate that this new non-invasive method could be used for *ex vivo* characterization. However, the OMIS method opens up the possibility of using the same method in *in vivo* studies in combination with modified colonoscopy to assist physicians in targeting biopsies of colorectal tissue.

Key words: opto-magnetic imaging spectroscopy, colorectal cancer, neural networks, screening, classification, tissue differentiation

Scientific field: Mechanical Engineering

Scientific subfield: Biomedical Engineering

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREDMET ISTRAŽIVANJA	4
2.1 Testovi za ispitivanje stolice	5
2.1.1 Gvajak test na okultno krvarenje (gFOBT).....	5
2.1.2 Fekalni imunohemijski test - (FIT).....	5
2.1.3 Pregled stolice na DNK.....	6
2.2 Pregledi-debelog-creva.....	7
2.2.1 Kompjuterizovana tomografska kolonografija (CTC, CT-kolonografija „virtuelna kolonoskopija”).....	7
2.2.2 Endoskopsko ispitivanje kapsulom (kapsula endoskopija).....	8
2.2.3 Sigmoidoskopija.....	9
2.2.4 Kolonoskopija.....	9
3. UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	12
4. MATERIJAL	16
4.1 Anatomija debelog creva.....	16
4.2 Histologija debelog creva.....	17
4.3 Funkcionalne karakteristike debelog creva.....	19
4.4 Metode prikupljanja uzoraka za ispitivanje.....	20
5. METODE, TEHNIKE I PROCEDURE	21
5.1 Opto-magnetna imidžing spektroskopija.....	21
5.1.1 Osnovni principi Opto-magnetne imidžing spektroskopije	21
5.1.2 Fizičke karakteristike OMIS-a.....	21
5.1.3 Uređaj.....	22
5.2 Spinner magnetometar JR-6A	24
5.2.1 Principi rada	25
5.3 Mašinsko učenje i veštačka inteligencija	29
5.3.1 Naïve Bayes klasifikator	30
5.3.2 Klasifikaciona stabla i „Random forest“.....	31
5.3.3 „Random forest“ i Skupovi stabala (bagged trees – bag of trees)	31
5.3.4 „DEEP LEARNING“ – Duboko učenje – Neuronske mreže	32
5.3.5 Algoritam sa povratim prostiranjem greške – „backpropagation“.....	33
5.3.6 ROC – kriva (Receiver operating characteristic).....	33
6. PROTOKOL ISTRAŽIVANJA.....	35

7. REZULTATI	38
7.1 Rezultati snimanja uzoraka metodom OMIS	38
7.1.1 Rezultati snimanje uzoraka odmah nakon resekcije tkiva, tumorski tip - adenocarcinom	38
7.1.2 Rezultati snimanje uzoraka odmah nakon resekcije tkiva, različite vrste kolorektalnog karcinoma	40
7.1.3 Rezultati snimanje histopatoloških pločica uzoraka kolorektalnog karcinoma, adenokarcinoma	43
7.1.5 Rezultati snimanje histopatoloških pločica različitih vrsta kolorektalnih karcinoma..	45
7.2 Primenjeni algoritmi za klasifikaciju podataka	46
7.2.1 Opis strukture podataka	47
7.2.2 Opis algoritma.....	47
7.2.3 Novi algoritam za predobradu podataka	54
7.3 JR-6A Spinner Magnetometar.....	57
8. DISKUSIJA	60
9. ZAKLJUČAK.....	64
10. LITERATURA.....	67
11. BIOGRAFIJA	74
12. PRILOG	75
12.1 PRILOG 1 – Osnovni pojmovi statistike i mašinskog učenja.....	75
12.1.1 Centriranje i skaliranje podataka.....	75
12.1.2 Krosvalidacija	75
12.1.3 Mašinsko učenje i veštačka inteligencija	76
12.1.4 Višeslojna perceptronska neuralna mreža (MLP).....	77
12.1.5 Arhitektura neuronskih mreža.....	79
12.1.6 Algoritam sa povratnim prostiranjem greške.....	81
12.1.7 Podešavanje težinskih koeficijenata.....	82
12.1.8 Naive Bayes klasifikator	84
12.1.9 Klasifikaciona stabla	86
12.1.10 Skupovi stabala (bagged trees – bag of trees).....	87
12.2 PRILOG 2.....	87

INDEKS SKRAĆENICA I OZNAKA

SZO – svetska zdravstvena organizacija
EU – Evropska unija
SAD – Sjedinjene Američke države
BDP – bruto domaći proizvod
FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija
CSH – cross-species hibridizacija
PCR – lančana reakcija polimeraze (polymerase chain reaction)
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
mRNK – mitohondrijalna ribonukleinska kiselina
AI – artificial intelligence, veštačka inteligencija
IVD – *in vitro* dijagnostika
gFOBT – gvajak test na okultno krvarenje
FOBT – faecal occult blood (test na okultno krvarenje)
FIT – Imunohemijski test
CTC – kompjuterizovana tomografska kolonografija
KRK – kolorektalni karcinom
USPSTF - američka radna grupa za preventivne usluge (United States Preventive Services Task Force)
LED – (*eng. light-emitting diode*) svetleća diode
EAR – evropska agencija za rekonstrukciju
ADR – adenoma detection rate (stopa detekcije adenoma)
GALT – (*eng. gut-associated lymphoid tissue*) limfno tkivo creva
OMIS – Otpo-magnetna imidžinog spektroskopija
RM – remanentna magnetizacija
ANN – veštačke neuronske mreže
MLP – višeslojna perceptronska mreža
TNM – klasifikacija tumora, limfnih čvorova i metastaza
WLD – wavelength difference (razlika talasnih dužina)
ROC - receiver operating characteristic (ROC kriva)
AUC – površina ispod ROC krive (Area under curve)
AI – veštačka inteligencija
ANN- veštačke neuronske mreže
 D_t^α - parametarski frakcioni izvod
 α - frakcioni izvod ($0 < \alpha < 1$)
 $\sigma(t)$ – napon u zavisnosti od vremena
 E - modul elastičnosti
 $\varepsilon(t)$ - prostorna dilatacija u vremenu
 η - koeficijent viskoznosti fluida
 Δ - promena remanentne magnetizacije (A/m)
 ϕ - vrednost Fibonačijevog niza 0.61803 (a/b , $b > a$)
 Φ - vrednost Fibonačijevog niza 1.61803 (a/b , $a > b$)

SPISAK ILUSTRACIJA

Slika 1.1. Statistika kolorektalnog karcinoma u svetu u 2018. godini, A – broj novoobolelih slučajeva, B – broj smrtnih slučajeva

Slika 2.1. Predloženi algoritam populacionog skrininga u Srbiji

Slika 2.2. Virtuelna kolonoskopija, prikaz dobijenog rezultata

Slika 2.3. Endskopska kapsula,

Slika 2.4. Prikaz kolonskopskog uređaja i načina rada istog

Slika 4.1. Delovi debelog creva

Slika 4.2.(levo) slojevi zida digestivne cevi i (desno) histološki prikaz zida debelog creva

Slika 4.3. Sluzokoža debelog creva

Slika 4.4.(levo) histološki prikaz zida appendix vermiformis-a; (desno) histološki prikaz analnog kanala

Slika 5.1 Prikaz relativnih pozicija izvora svetlosti za belu difuznu (levo) i reflektovanu polarizovanu svetlost (desno). Step en polarizacije svetlosti je 95.4%, dok je razlika između uglova θ i $\theta_1 \pm 1:6^\circ$ (dvanaest belih LED dioda postavljeno je u dva kruga: šest-izvor difuzne svetlosti i šest izvor svetlosti pod Brusterovim uglom)

Slika 5.2. NL-B53 sa Canon digitalnom kamerom, model IXUS 105, 12.1 MPix. (levo), i položaj ispitivanog uzorka tkiva i OMIS aparata (desno)

Slika 5.3. Konvolucionni algoritam obrade digitalne slike i dobijanje opto-magnetnog spektra uzorka

Slika 5.4. Spinner magnetometar JR – 6A (proizvođač: AGICO, Češka Republika)

Slika 5.5. Položaji automatskog držača za cilindrični uzorak [

Slika 5.6. Model biomehanike tkiva na bazi ocene parametarskog frakcionog dinamičkog modela i remanentne magnetizacije, odnosno smanjenja ($-\Delta$) i povećanja ($+\Delta$) remanentne magnetizacije. Kako je remanentna magnetizacija vode (viskoznog stanja) $-\Delta = -4.35 \pm 0.24$, a cvrstog (elastičnog) $+\Delta = +8.34$, to kada kod tkiva imamo smanjenje remanentne magnetizacije (ide ka povećanom viskoznom stanju, višak vode) tada takav poremećaj vodi kancerogenom stanju, jer karcinom ima više vode za oko 21%

Slika 5.7. Odnos veštačke inteligencije, mašinskog učenja i dubokog učenja.

Slika 5.8. ROC kriva – na slici su prikazane dve granice razdvajanja (0,5 i 0,3) kao i vrednosti specifičnosti i senzitivnosti za obe granice.

Slika 6.1. Uzorak tkiva debelog creva nakon hirurške resekcije i označena mesta korišćena za snimanje uzorka OMIS metodom.

Slika 7.1. Optomagnetni spektar slike istog uzorka, koji je obuhvatao najveću površinu slike („Fig. 7.1c“) koja se može iseći (cela slika), veličina kropovanja 1700x1700 piksela: „Sl. 7.1a“- normalna sluznica i „ Fig. 7.1b ”- kolorektalni karcinom.

Slika 7.2. Optomagnetni spektar slike istog uzorka iz tri različita područja sa istim centralnim isecanjem (Slika 7.2d - 1418 piksela): Sl.7.2a - normalna sluznica, Sl. 7.2b - kolorektalni karcinom I Sl. 7.2c - tkivo u blizini tumora

Slika 7.3. Optomagnetni spektar slike istog uzorka iz tri različita područja sa istim kropom (Slika 7.3d - 710 piksela): Sl. 7.3a - normalna sluznica, Sl. 7.3b - kolorektalni karcinom i Sl. 7.3c - tkivo blizu normalnog tkiva

Slika 7.4. Uzorak 1, 2 i 3 – adenokarcinoma (a, b, c), snimci dobijeni belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagrami za tri uzorka adenokarcinoma

Slika 7.5. Snimak MALT limfoma dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram za uzorak MALT limfoma

Slika 7.6. Snimak melanoma, dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram melanoma koji pokazuje malu paramagnetno/dijamagnetu aktivnost, pa je zbog karakterističnog izgleda krive nemoguće precizno odrediti vrednosti intenziteta pikova i razlika talasnih dužina

Slika 7.7. Snimak planocelularnog karcinoma, dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram planocelularnog karcinoma koji pokazuje malu paramagnetno/dijamagnetu aktivnost, pa je zbog karakterističnog izgleda krive nemoguće precizno odrediti vrednosti intenziteta pikova i razlika talasnih dužina [86].

Slika 7.8. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 1.

Slika 7.9. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 2.

Slika 7.10. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 3.

Slika 7.11. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 1, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami histopatoloških pločica za uzorak 1, levo – zdravo tkivo, desno - adenokarcinom

Slika 7.12. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 2, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 2.

Slika 7.13. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 3, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 3.

Slika 7.14. i Slika 7.15. Opto-magnetni dijagram uzorka GIST i LIMFOM kolorektalnog karcinoma

Slika 7.16. i Slika 7.17. Opto-magnetni dijagram uzorka MELANOM i NEC kolorektalnog carcinoma

Slika 7.18. Povratna informacija „rfe()“ funkcije za eliminaciju promenljivih.

Slika 7.19. ROC kriva za tri vrste klasifikacije pomoću Naive Bayes klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1700x1700 piksela (Sl. 7.1a), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1418x1418 piksela (Sl. 7.2a), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličine isecanja 710x710 piksela (Sl. 7.3a).

Slika 7.20. ROC kriva za dve vrste klasifikacije pomoću Naive Bayes klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i tkiva u blizini tumora, Sl. 7.2c - veličina isecanja od 1418x1418 piksela i Sl. 7.3c - veličina isecanja od 710x710 piksela

Slika 7.21. ROC kriva za tri vrste klasifikacije pomoću Random Forest klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1700x1700 piksela (Sl. 7.1c), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1418x1418 piksela (Sl. 7.2c), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličine isecanja 710x710 piksela

Slika 7.22. ROC kriva za dve vrste klasifikacije pomoću Random Forest klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i tkiva u blizini tumora, Sl. 7.2 - veličina isecanja od 1418x1418 piksela i Fig. 7.3 - veličina isecanja od 710x710 piksela.

Slika 7.23. Skica primenjene višeslojne perceptronske neuronske mreže, prilagođena Kolmogorovom Mapirajućom neuronskom mrežom prema referenci [35]. Intenzitet WLD (256) je ulazni sloj (x_1, x_2, \dots, x_n), prvi skriveni sloj ima 513 veštačkih neurona ($2 \times 256 + 1$), dok drugi i treći skriveni sloj imaju 32 veštačka neurona. Izlazni sloj ima dve vrednosti y_1 (ne-rizično ili zdravo) i y_2 (rizično ili karcinom)

Slika 7.24. Korelacioni koeficijenti između WLD. Međusobna korelacija je predstavljena „matrično“ gde je intenzitet korelacije prikazan pomoću intenziteta boje.

Slika 7.25. Važnost promenljivih, nakon primene filterVarImp().

Slika 7.26. Korelacioni koeficijent nakon primene novog algoritma za maksimalnu vrednost koeficijenta korelacije od 0,75. WLD = 136.797 predstavlja dominantnu promenljivu dobijenu tokom primene algoritma na svim tipovima uzoraka.

Slika 7.27. Rezultati biomehanike tkiva na bazi parametarske ocene frakcionog dinamičkog modela. Većina kancerogenog tkiva (preko 85% slučajeva) ima frakcioni izvod manji od 0.38 ($0.22 < D_t^\alpha < 0.38$) i oko 15% ima frakcioni izvod $0.75 < D_t^\alpha < 0.88$, dok zdravo tkivo ima frakcioni izvod $0.50 < D_t^\alpha < 0.75$, a inflamatorno $0.38 < D_t^\alpha < 0.05$).

SPISAK TABELA

Tabela 3.1. Tipovi KRK skrining testova i njihova efikasnost u kliničkim studijama

Tabela 5.1. Prosečna vrednost remanentnog maganetizama vode (česmovače) na bazi 10 merenja, meren kao razlika $[A/m]$ pre i posle tretmana magnetnim poljem jačine $0.25 [mT]$ u trajanju od 10 minuta.

Tabela 5.2. Prosečna vrednost remanentnog maganetizama čvrstog materijala (polimera PMMA) na bazi 5 merenja, meren kao razlika $[A/m]$ pre i posle tretmana magnetnim poljem jačine $0.25 [mT]$ u trajanju od 10 minuta.

Tabela 6.1. TNM klasifikacija i grupisanje po stadijumima kolorektalnog karcinoma; T - odnosi se na veličinu i opseg glavnog tumora. Glavni tumor se obično naziva primarnim tumorom; N - odnosi se na broj obližnjih limfnih čvorova zahvaćenim karcinomom; M - odnosi se na to da li je tumor metastazirao - proširio se sa primarnog mesta na druge delove tela.

Tabela 7.1. Upoređivanje mera performansi klasifikacije OMIS podataka korišćenjem Naïve Bayes klasifikatora za normalnu mukozu i karcinom (veličina kropovane regije: 1700×1700 piksela, 1418×1418 piksela i 710×710 piksela)

Tabela 7.2. Upoređivanje mera performansi OMIS klasifikacije podataka korišćenjem Naïve Bayes klasifikatora za zdravo tkivo i tkivo u blizini tumora (veličina isečene regije: 1418×1418 piksela i 710×710 piksela)

Tabela 7.3. Dobijeni rezultati Random forest klasifikatora za tip tkiva: zdravo i tumorsko tkivo. Veličine isecanja: 1700×1700 piksela, 1418×1418 piksela i 710×710 piksela.

Tabela 7.4. Dobijeni rezultati Random forest klasifikatora za tip tkiva: zdravo i zdravo pored tumora. Veličine isecanja: 1418×1418 piksela i 710×710 piksela.

Tabela 7.5. Dobijeni rezultati višeslojne perceptron neuronske mreže za tip tkiva: zdravo i tumorsko tkivo. Veličine isecanja: 1700×1700 piksela, 1418×1418 piksela i 710×710 piksela

Tabela 7.6. Dobijeni rezultati višeslojne perceptron neuronske mreže za tip tkiva: zdravo i zdravo pored tumora. Veličine isecanja: 1418×1418 piksela i 710×710 piksela

Tabela 7.7. Tačnost klasifikatora u slučaju primene Naive bayes-a sa prethodnom obradom podataka pomoću $rfe()$ i novog algoritma za različite vrednosti maksimalno dopuštenog korelacionog koeficijenta. Kao dodatna informacija u efikasnosti novog algoritma za predobradu podataka u zgradama su navedeni i broj promenljivih koje su učestvovala u klasifikaciji.

Tabela 7.8. Tačnost klasifikatora u slučaju primene Random Forest-a sa prethodnom obradom podataka pomoću $rfe()$ i novog algoritma za različite vrednosti maksimalno dopuštenog korelacionog koeficijenta. Kao dodatna informacija u efikasnosti novog algoritma za predobradu podataka u zgradama su navedeni i broj promenljivih koje su učestvovala u klasifikaciji.

Tabela 7.9. Rezultati izmerenih uzoraka normalne mukoze i CRC koristeći JR-6A, i klasifikovani su prema TNM klasifikaciji i klasifikaciji faza.

Tabela 8.1. Rezultati uzoraka zdravog tkiva i tkiva karcinoma isključeni iz analize merenja JR-6A. u tabeli 7.9.

1 UVOD

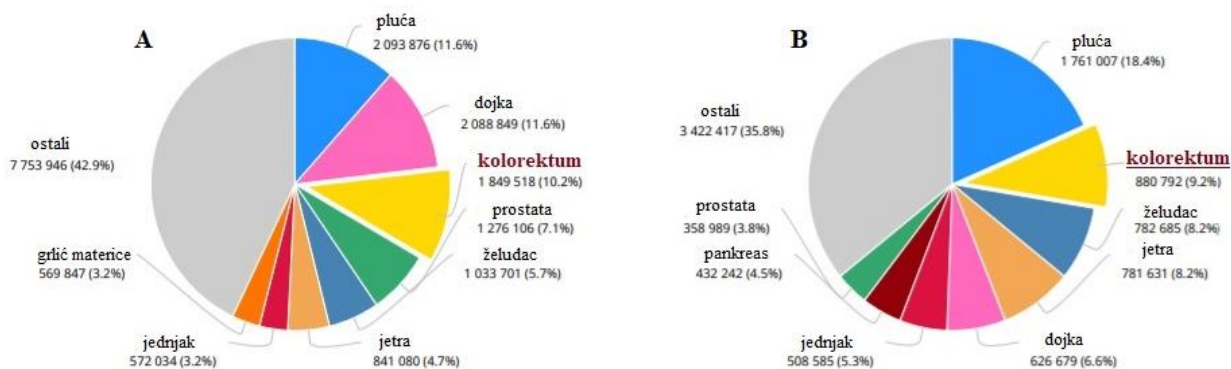
Karcinom je drugi vodeći uzrok smrti na globalnom nivou i kao posledicu ima 9,6 miliona smrtnih slučajeva u 2018. godini. Globalno, otprilike 1 od 6 smrtnih slučajeva je posledica karcinoma, dok se skoro 70% smrti od karcinoma događa u zemljama sa niskim i srednjim prihodima. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (SZO), od karcinoma u 2018. godini obolelo je 18,07 miliona i preminulo 9,55 miliona, dok su podaci za Evropu za isti period, 4,22 miliona novoobolelih i 1,94 miliona preminulih. Evropu naseljava 9% svetske populacije, sa stopom od 25% ukupnog broja obolelih od ove bolesti, a kao osnovu za dalju borbu Evropa vidi u ažiranoj statistici koja je ključna za planiranje borbe protiv karcinoma. Procene incidence i mortaliteta za 25 glavnih karcinoma predstavljene su za 40 zemalja u četiri evropska područja koje su definisale Ujedinjene nacije i za Evropu i Evropsku uniju (EU-28) za 2018. godinu. S obzirom na trend enormnog rasta broja obolelih od karcinoma posebno se ističe GLOBOCAN-ova predikcija za period 2018.-2040. godina gde se predviđa porast broja novoobolelih sa 18,1 milion na 29,6 miliona slučajeva [1-6].

Globalno ekonomsko opterećenje usled karcinoma je nepoznato, iako su podaci dostupni u nekim zemljama. Ekonomsko opterećenje u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) iznosi približno 1,8% bruto domaćeg proizvoda (BDP), procenjena potrošnja u sektoru zdravstva za 2017. godinu iznosila je 161,2 milijarde američkih dolara; gubitak produktivnosti zbog morbiditeta 30,3 milijarde američkih dolara, a prevremena smrtnost 150,7 milijardi američkih dolara. U Evropskoj uniji potrošnja je iznosila 57,3 milijarde evra, a gubici produktivnosti usled morbiditeta i prevremene smrti 10,6 milijardi evra i 47,9 milijardi evra. Sa troškovima neformalne nege od 26,1 milijarde evra, ukupan teret porastao je na 141,8 milijardi evra, ili 1,07% BDP-a. Ekonomsko opterećenje gubitka produktivnosti usled morbiditeta i prevremene smrti od karcinoma iznosi skoro 60% ukupnog ekonomskog opterećenja povezanog sa karcinomom u zemljama Evropske unije, gde troškovi produktivnosti usled prevremene smrtnosti iznose 42,6 milijardi evra godišnje, dok gubici radnih dana iznose 9,43 miliona evra godišnje. Iz prethodno navedenog može se videti da troškovi lečenja karcinoma rastu širom sveta, ukazujući sve više na značaj i isplativost prevencije i skrininga, a ponekad i velikom uštedom na državnom nivou. Na primer, prema dostupnim podacima kada su razmatrane skuplje hemoterapije u poređenju sa skriningom raka debelog creva i bez skrininga, ušteda lečenja od sprečavanja uznapredovalog karcinoma i smrti se više nego udvostručila u SAD-u [7-9]. Trenutno se može sprečiti između 30-50% karcinoma izbegavanjem faktora rizika i primenom postojećih strategija prevencije zasnovanih na dokazima. Teret karcinoma se takođe može smanjiti ranim otkrivanjem raka i lečenjem pacijenata koji imaju preduslove za razvoj ove bolesti. Mnogi karcinomi imaju velike šanse za izlečenje ako se rano dijagnostikuju i adekvatno leče. Zbog svih pomenutih činjenica, maja 2017. godine, svetske vlade su se obavezale da će ulagati u kontrolu karcinoma kao prioritet javnog zdravlja, donošenjem Rezolucije Svetske zdravstvene skupštine 70.12 o prevenciji i kontroli karcinoma u okviru integrisanog pristupa [1,6].

Maligna transformacija ćelija u karcinom nije u potpunosti poznata, ali većina naučnika smatra da nastaje usled dugotrajnog nagomilavanja genetskih i epigenetskih mutacija te je stoga blagovremena dijagnoza jedan od najvažnijih zadataka i svrha medicine kao zdravstvene zaštite. Rano dijagnostikovanje ovih transformacija u ćelijama može poboljšati prognozu slučajeva karcinoma. Dijagnoza karcinoma danas uključuje analizu uzoraka tkiva i citologije dobijenih kroz nekoliko postupaka, uključujući hiruršku biopsiju, aspiracionu biopsiju, venepunkciju, pleuralnu punkciju, struganje površine tkiva i sakupljanje eksfoliativnih ćelija iz urina i sputuma. Konvencionalna histopatologija zasnovana na proceni morfologije ostala je standardna dijagnostička metoda već dugi niz godina, ali razvoj naprednih sofisticiranih tehnologija poput masene spektrometrije, mikromreže i automatizovanog sekvenciranja DNK otvorio je nove puteve u dijagnozi karcinoma i terapiji. Upotreba enzimske histohemije i elektronske mikroskopije proširila je primarnu mikro-anatomsku procenu tako da uključuje biohemijske i subćelijske ultra-strukturne karakteristike. Metode skrininga i nadzora karcinoma uključuju ultrazvuk, mamografiju, digitalnu mamografiju, kolonoskopiju, magnetnu rezonancu, kompjuterizovanu tomografiju, pozitronsku emisiju tomografiju i

spektroskopiju magnetnom rezonancom. Takođe, za dijagnozu se danas koriste druge tehnike kao što su imunohistohemija, *in situ* hibridizacija (FISH, CSH), PCR, RT-PCR (PCR u realnom vremenu), protočna citometrija i mikromreža. Najnovija tehnologija Microarray je efikasan pristup za izdvajanje podataka od biomedicinske važnosti za širok spektar primena, u istraživanju karcinoma pružiće veliku propusnost i dragocene uvide u razlike u tumoru pojedinca u poređenju sa DNK, ekspresijom mRNK i ekspresijom i aktivnošću proteina [10]. Ipak i pored svih dijagnostičkih metoda, javljaju se greške i iz tog razloga je SZO nedavno je dala prioritet oblastima bezbednosti pacijenata u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, koja predstavlja okosnicu i sam početak za ranu dijagnostiku bolesti, i dijagnostičke greške uvrstila u prioritetni problem. Težnja za poboljšanjem bezbednosti pacijenta protekle decenije uglavnom se bavila kvantificiranim problemima kao što su greške u lekovima, infekcije povezane sa zdravstvenom zaštitom i posthirurške komplikacije. Dijagnostičkoj grešci pripalo je srazmerno manje pažnje, uprkos činjenici da su značajne studije bezbednosti pacijenta dosledno otkrile da je dijagnostička greška česta. U Harvardskoj medicinskoj praksi, dijagnostička greška činila je 17% grešaka koje se mogu sprečiti kod hospitalizovanih pacijenata, a sistematski pregled studija obdukcije koji je obuhvatio četiri decenije klasifikovane istorije podataka otkrio je da je približno 9% pacijenata doživelo veliku dijagnostičku grešku koja je ostala neotkrivena dok je pacijent bio živ. Sve ove studije podrazumevaju da hiljade hospitalizovanih pacijenata svake godine umru zbog dijagnostičkih grešaka [11-13]. Sagledavanjem potreba koje se javljaju u iznalaženju najboljeg, najkvalitetnijeg načina da se pomogne pacijentu javlja se i potreba za što većim brojem informacija i sa te strane zdravstvena zaštita postaje sve bogatija podacima generisanim od pacijenata. Količina tako generisanih podataka zahteva računarski potpomognutu analizu u obliku korišćenja veštačke inteligencije (AI) / dubokog učenja kako bi imala smisla i razvila razumljive rezultate koji kliničarima i pacijentima mogu da pomognu na značajan način. Najvažniji delovi aplikacija za mašinsko učenje koji su se pojavili poslednjih godina sa porastom podataka su: 1) identifikacija / dijagnoza bolesti, 2) personalizovani tretman 3) pametni elektronski zdravstveni kartoni 4) istraživanje kliničkih ispitivanja. Ukupna ulaganja javnog i privatnog sektora u veštacku inteligenciju zapanjujuća su: sve u svemu, prema nekim procenama očekuje se da će dostići 6,6 milijardi dolara do 2021. godine. "Accenture" predviđa da bi vrhunske aplikacije za veštacku inteligenciju mogle rezultirati godišnjom uštedom od 150 milijardi dolara do 2026. godine [14-16]. AI ima važnu ulogu u zdravstvenoj ponudi budućnosti, kroz razvoj precizne medicine za koju se smatra da je preko potreban napredak u nezi. Iako su se rani naponi na pružanju dijagnoze i preporuka za lečenje pokazali izazovnim, očekujemo da će AI na kraju savladati i taj domen. S obzirom na brzi napredak u AI u analizi slike, čini se vrlo verovatnim da će većinu radioloških i patoloških slika u jednom trenutku ispitivati mašina. Celokupan razvoj i napredak AI sistema ide u prilog povećanja napora doktora u zbrinjavanju pacijenata, a ne u njihovoj zameniti kliničare.

Zadatak ove doktorske disertacije je da dâ doprinos u oblasti rane dijagnostike karcinoma kombinovanjem nove metode za detekciju abnormalnog stanja tkiva zasnovanoj na spektroskopiji sa metodama za klasifikaciju, nudeći na taj način automatizovan pristup detekciji karcinoma, sa posebnim osvrtom na kolorektalni karcinom. Pre nekoliko decenija, kolorektalni karcinom se retko dijagnostikovao. U svetu, u 2018. godini, karcinom kolorektuma je bio treći vodeći uzrok oboljevanja sa procentualnim udelom od 10,2% među svim obolelim (Slika 1.1), i drugi uzrok smrtnosti sa procentualnim udelom 8,2%. Na globalnom nivou to bi značilo da svaka deseta osoba obolela i svaka dvanaesta preminula osoba su imale kolorektalni karcinom. Najviša stopa incidencije i mortaliteta je zabeležena u Evropi (28,2/100.000 i 12,2/100.000), a najniža u Africi (6,1/100.000 i 4,6/100.000) prema podacima SZO-a. Procenjuje se da će broj novoobolelih i umrlih od kolorektalnog karcinoma povećati na globalnom nivou za 60%, tj. 2030. godine broj novoobolelih će iznositi više od 2,2 miliona, a broj umrlih više od 1,1 milion [17-19]. U Srbiji je prema podacima GLOBOKAN-a za 2018. godinu kolorektalni karcinom bio na drugom mestu oboljevanja od malignih bolesti sa brojem novoobolelih 6.14, odmah iza karcinoma pluća. Ukoliko pogledamo raspodelu prema polu, kod muškaraca kolorektalni karcinom je bio drugi vodeći uzrok novoobolelih (3.77) odmah iza karcinoma pluća, dok je kod žena bio na trećem mestu (2.37), iza karcinoma dojke i pluća [18,20].

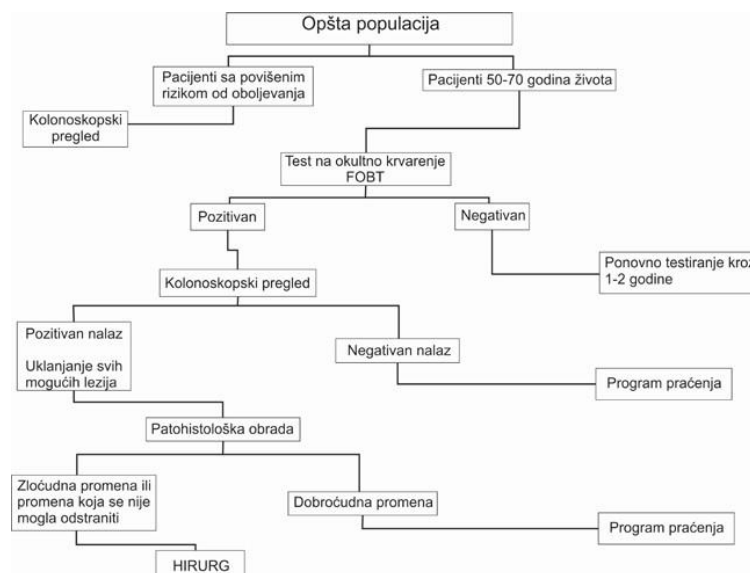


Slika 1.1. Statistika kolorektalnog karcinoma u svetu u 2018. godini, A – broj novoobolelih slučajeva, B – broj smrtnih slučajeva, https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf

Kolorektalna karcinogeneza je kompleksan process koji se odvija u više faza, tokom kojeg dolazi do patoloških neoplastičnih promena crevne mukoze i akumulacije genetičkih i epigenetičkih promena u ćelijama crevne mukoze. Kolorektalni karcinom nastaje transformacijom normalne crevne mukoze prvo u benigni, a zatim u premaligni polip koji daljim razvojem prerasta u invazivni maligni tumor. Ključni faktori u nastanku kolorektalnog karcinoma su onkogeni i tumor-supresorski geni čije promene dovode do deregulacije ćelijskog ciklusa [18]. Polipi su česti, mogu se razviti na bilo kom delu epitelnog tkiva kolona i procenjuje se da će trećina ili polovina svih osoba tokom života razviti jedan ili više polipa, ali se velika većina njih neće razviti u karcinom. Prosečno trajanje razvoja benignog polipa do karcinoma nije poznato, procena je da je potrebno najmanje 10 godina [21]. Dug period od nastanka polipa do razvoja kolorektalnog karcinoma je jako značajan za rano otkrivanje bolesti. Otkrivanje bolesti u prekanceroznom stadijumu - stadijumu dobroćudnog polipa ili u stadijumu lokalizovane bolesti omogućava potpuno izlečenje u više od 85% (76%-90%) obolelih [22]. Ključnu ulogu u ranoj dijagnozi bolesti ima primarna prevencija koja podrazumeva mere i postupke koji se sprovode da ne bi došlo do nastanka oboljenja (zdrava ishrana, fizička aktivnost, kontrola telesne mase, izbegavanje alkohola i cigareta) i kojom se može sprečiti nastanak tumora u oko dve trećine osoba. Međutim, nije uvek moguće preventirati nastanak malignih bolesti primarnom prevencijom jer nisu uvek poznati svi mehanizmi i uzročnici nastanka tumora. U tom slučaju veliku ulogu ima sekundarna prevencija, tj. otkrivanje bolesti u ranoj fazi kada je moguće njeno lečenje i izlečenje. Otkrivanje bolesti u ranoj fazi realizuje se putem skrining programa čiji je cilj otkrivanje bolesti u ranoj, početnoj fazi, kada je lečenje daleko efikasnije, što će direktno uticati na smanjenje broja novoobolelih i umrlih, a indirektno će uticati na poboljšanje kvaliteta života pacijenata obolelih od ove bolesti [18]. Da bi skrining bio uspešan treba omogućiti: 1) veliku pokrivenost populacije (treba težiti obuhvatu od najmanje 75% populacije); 2) dalje zbrinjavanje lica sa pozitivnim testom i njihovo praćenje; 3) prikupljanje podataka putem informacionog sistema; i 4) kontrolu kvaliteta. Ciljna populacija u skriningu karcinoma debelog creva može biti različita i zavisi od mnogo faktora: epidemioloških, demografskih, kadrovskih, organizacionih i finansijskih, a preporuka evropskih vodiča je da treba da obuhvati muškarce i žene od 50 do 74 godina života. Test koji se primenjuje treba da bude visokosenzitivnan, specifičan, lako primenljiv i relativno jeftin [22].

2 PREDMET ISTRAŽIVANJA

U svetu i našoj zemlji je do sada objavljeno nekoliko vodiča dobre kliničke prakse, koji se odnose na prevenciju, rano otkrivanje karcinoma debelog creva i praćenje obolelih pacijenata. Srbija spada u zemlje sa visokom stopom mortaliteta i srednje visokom stopom incidence kolorektalnog karcinoma, i u skladu sa tim neophodne su mere prevencije sa ciljem smanjenja broja obolelih i umrlih, a takođe i radi poboljšanja kvaliteta života i smanjenja troškova lečenja (Slika 2.1) [20, 22].



Slika 2.1. Predloženi algoritam populacionog skrininga u Srbiji [26]

S obzirom da se do 40% slučajeva karcinoma prepisuje uzrocima koji mogu da se spreče, postoji jako veliki potencijal za smanjenje broja slučajeva i prostor za delovanje u Evropskoj uniji u vidu skrininga. Međutim, trenutno se na prevenciju izdvaja oko 3% budžeta širom EU [23]. Uočavanje značaja skrininga i rane detekcije bolesnika je od krucijalano značaja za samog pacijenta, dalji tok bolesti, kvalitet života pacijenta i socio-ekonomske razloge. Skrining se odnosi na upotrebu jednostavnih testova u zdravoj populaciji kako bi se identifikovali pojedinci koji imaju bolest, a čiji se simptomi još uvek nisu pojavili. Ipak, lekari u primarnoj zdravstvenoj zaštiti se obično suočavaju sa velikim brojem pacijenata i ponekad donose nepouzdanu odluku i iz tog razloga, može se reći da dijagnoza u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (tj. prvi kontakt, dostupnost, nastavak, sveobuhvatna i koordinirana nega) predstavlja područje visokog rizika za greške. Dijagnostička greška se javlja kada se pacijentova dijagnoza potpuno propusti, ukoliko se neprimereno odlaže i/ili pogreši, što se procenjuje prema eventualnoj količini sakupljenih i obrađenih informacija, ali kategorije propuštenih, odloženih i pogrešnih se u velikoj meri preklapaju. Ipak, često je teško odvojiti ove tri navedene stvari; na primer, i u propuštenim i u pogrešnim scenarijima, dijagnoza je takođe odložena. Stoga se ovi koncepti moraju primeniti zajedno kako bi se steklo razumevanje situacije i na što efikasniji način sprečila pojava greške, što navodi na mišljenje o potrebi razvoja visoko senzitivnog testa. U skladu sa tim segment medicinske tehnologije koji se trenutno suočava sa revolucionarnim promenama je *In Vitro* dijagnostika (IVD), usled najnovijih dostignuća u genetičkim istraživanjima, dijagnostičkoj tehnologiji i digitalizaciji. IVD obuhvata pregled uzoraka pacijenta van tela, koji se analiziraju ili u laboratoriji, direktno kod lekara ili u kući pacijenta. Proizvođači dijagnostičke opreme i testova pokrivaju čitav spektar, od jednostavnih testova glukoze u krvi i trudnoće do složenih karcinoma i genetskih testova - uglavnom zasnovanih na uzorcima krvi, stolice ili urina. Rezultati ispitivanja omogućavaju zaključke o stanju pacijenta, ukazuju na od koje bolesti pati i kako se najbolje može pojedinačno izlečiti. IVD proizvodi (uključujući uređaje, instrumente i takozvane „komplete za testiranje“) i IVD usluge (kao što su upravljanje podacima, održavanje softvera i opreme) obezbedili su prihod veći od 70 milijardi dolara širom sveta u 2019. godini. Glavni pokretač ovog razvoja je

starenje stanovništva, incidenca oboljevanja gde je potrebna precizna dijagnostika i terapije zasnovane na ishodima [24].

Skrining testovi se grubo mogu podeliti na dve kategorije:

1. Neinvazivni testovi za ispitivanje stolice, čiji je primarni cilj otkrivanje karcinoma u ranoj fazi, i
2. Pregledi debelog creva, čiji je cilj pored ranog otkrivanja karcinoma otkrivanje i prekursorskih lezija i njihovo otklanjanje (invazivno ispitivanje).

2.1 Testovi za ispitivanje stolice

Testovima za ispitivanje stolice se otkriva prisustvo „nevidljive“ krvi u stolici pacijenta golim okom ili specifična DNK, odnosno fragmenti koji mogu upućivati na prisustvo karcinoma debelog creva. Ovaj tip testova je neinvazivan i može se primeniti i u kućnim uslovima [18,25-28].

2.1.1 Gvajak test na okultno krvarenje (gFOBT)

Test se zasniva na pretpostavci da postoji krvarenje kod neoplazmi debelog creva pri čemu se otkriva aktivnost peroksidaze hema. U slučajevima kada postoje veliki polipi, otkrivanje okultnog (golim okom nevidljivog) krvarenja je dosta lakše. Uspešnost otkrivanja se povećava sa većim brojem testiranja (dva do tri testiranja) u nekoliko dana u poređenju sa samo jednim testom jer gvajak FOBT nije specifičan i postoji mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata pogotovo kod osoba koje su konzumirale crveno meso ili hranu koja ima perioksidnu aktivnost jer aktivnost peroksidaze hema nije samo specifična za ljude, a i lažno negativnih rezultata u slučaju konzumacije vitamina C. Lekari preporučuju izbegavanje ovih namirnica, međutim nije poznato koliko se testirani pacijenti pridržavaju preporuka. Uticaj na tačnost testa mogu da imaju i nesteroidni, antiinflamatorni i antikoagulantni lekovi, za sada ne postoji mnogo podataka, dok vodiči dobre kliničke prakse ne preporučuju prekidanje njihovog uzimanje u toku i pre testiranja [18, 25-29].

Pacijenti koji imaju pozitivan gvajak FOBT test imaju 3-4 puta veći rizik da imaju rak debelog creva u odnosu na one sa negativnim [30]. U slučaju pozitivnog testa pacijentima se preporučuje kolonoskopski pregled [18, 22, 26, 30, 31]. Nakon izvršenog testiranja (na 3 uzorka stolice), test i dalje nema veliku senzitivnost na neoplaziju, otkriva 13-50% pacijenata sa karcinomom i 11-24% bolesnika sa uznapredovalim adenomom. Uznappedovali adenom se definiše kao tubularni adenom koji je veći od 10mm, adenomom sa viloznom komponentom ili displazijom visokog stepena [18, 26, 30]. U slučaju postojanja negativnih rezultata efikasnost testa će rasti ako se isti ponavlja na godišnjem nivou. Studije praćenja testiranja na prisustvo okultne krvi u stolici, u trajanju od preko deset godina, pokazale su značajno smanjenje stope mortaliteta, čak za 15-33% i to bez obzira na postojanje razlika u metodama istraživanja i intervalu testiranja. Druga istraživanja pokazuju da je incidenca karcinoma debelog creva smanjenja za 17-20% u periodu praćenja od 18 godina. Primena ovakvih testova u kućnim uslovima je moguća uz relativno male troškove, sa akcentom da njegova efikasnost zavisi od uspešnosti naknadnih kolonoskopskih pregleda za one sa pozitivnim rezultatima i ponovljenog godišnjeg testiranja za one sa negativnim rezultatima. Potrebno je napomenuti da se zahvaljujući tehnološkom napretku osetljivost testa popravila poslednjih godina, ali i bez obzira na to prihvatljivost ponovnog testiranja u ciljnoj populaciji nije uvek na očekivanom nivou u više od 50% [18, 30].

2.1.2 Fekalni imunohemijski test - (FIT)

FIT (fekalni imunohemijski test) je test novije generacije na prisustvo, golim okom nevidljive, krvi u stolici. Ovaj test koristi antitela koja su specifična za neku komponentu krvi, npr. za humani hemoglobin, albumin ili neke druge. Kako je specifičan za ljudsku krv manje je podložan lažno-pozitivnim rezultatima (usled načina ishrane) u poređenju sa gFOBT testom. Senzitivnost ovog testa

je značajno veća i prelazi 50% u slučajevima kada se koriste 1-3 uzorka stolice. U velikom broju istraživanja pokazano je da je pri kvalitativnom korišćenju testa, senzitivnost 20-30% za uznapredovale polipe, a kod kvantitativnog očitavanja testa senzitivnost raste do 67%. Danas je u upotrebi nekoliko komercijalnih FIT testova slične osetljivosti [18, 30, 32].

Od velike kliničke važnosti je informacija o učinku skrining programa (gde se ispituje stolica) koja se meri odzivom ciljane populacije, gde značajnu prednost pokazuje FIT jer se kod njega testiranje vrši samo jednom u poređenju sa gFOBT-om (gde je potrebno izvršiti 3 testiranja zbog povećanja senzitivnosti) i gde su odzivi pacijenata na skrining 59,6% i 46,8% respektivno [18, 30, 32].

Iako FIT (imunohemijski testovi) imaju veću senzitivnost od standardnih gvajak FOBT testova, nije poznata njihova efikasnost u smanjenu mortaliteta karcinoma debelog creva u poređenju sa senzitivnijim gFOBT. Sa druge strane, mogućnost prevencije karcinoma i uklanjanja uznapredovalih adenoma je ograničena korišćenjem kvalitativno očitavanih imunohemijskih testova, ispod 50% i u glavnom se kreće u rasponu 25-30%, ukoliko se ne koristi kvalitativni FIT [26].

2.1.3 Pregled stolice na DNK

Mutacije gena povezane sa karcinomom debelog creva, u slučaju otkrivanja mehanizama karcinogeneze dalo je osnov za razvoj specifičnih metoda otkrivanja pomenutih mutacija pregledom stolice. U velikoj studiji 2004. godine testirana je prva verzija ovog testa i pokazano je da je kancer otkriven kod 52% pacijenata, međutim samo kod 18% pacijenata potvrđeno je postojanje uznapredovalih adenoma. Zatim se usledile godine usavršavanja i kasnija istraživanja pri testiranju jednog uzorka stolice pokazala su senzitivnost za karcinom čak 87%, a za uznapredovale adenome oko 40% [18, 26, 33, 34].

Pregledom stolice moguće je otkriti tumore u ranom stadijumu ukoliko se osobe odazivaju na ponovno testiranje u propisanim intervalima. Međutim, sprovedena istraživanja su pokazala da 25–40 % osoba tokom godina ne prihvata ponovno testiranje kada je u pitanju pregled stolice i zbog toga je preporučen interval od 3 godine za ponovno testiranje. Taj period može biti prihvatljiva, efikasna i ekonomski isplativa alternativa u odnosu na gvajak i imunohistohemijski test. Glavna prednost fekalnih DNK testova u poređenju sa FOBT testom ili kolonoskopijom je činjenica da na njih ne utiče proksimalna lokacija tumora [35, 36]. Druga prednost je nedostatak potrebe za pročišćavanjem ili promenama u ishrani. Ipak, osetljivost fekalnih DNK testova za adenome u poređenju sa otkrivanjem kolorektalnog karcinoma je niža. Pored toga, nedostaju podaci o kontrolisanim studijama ispitavanja skrininga ovim testom kao za FOBT.

Druge tehničke poteškoće uključuju probem realizacije sakupljanja i isporuke uzoraka stolice za pacijente koji su na skriningu. Zatim, sprovedena studija pokazuje da su DNK testovi imali dvostruko više abnormalnih rezultata od FIT-a, sa većom stopom lažno pozitivnih rezultata, što dalje implicira da će biti potrebno više kolonoskopija za dalju procenu kolorektalnog karcinoma. Dakle, neizbežno veći broj dijagnostičkih ispitivanja povećao bi troškove i rizike skrininga. Usled pozitivnog rezultata gFOBT testa, kao trenutne metode skrininga, urađeno je 690.011 kolonoskopija za lažno pozitivne skrining testove i rezultiralo dodatnim godišnjim troškovima od oko 800miliona funti [36-38].

Najveći nedostatak testova fekalne DNK je njegova isplativost, jer su i starije i novije studije, posebno zasnovane na Markovljevom modelu, zaključile da je fekalna DNK isplativa samo na sopstveni zahtev pacijenta, ali u suštini dominira većina ostalih dostupnih opcija skrininga, uključujući FOBT i kolonoskopiju [36, 39,40]. Ovo može zahtevati ograničenje broja DNK markera kako bi njihova klinička upotreba bila razumnija [36, 41]. Inače mnogi hromozomi (1, 3, 5,7, 8,12,15,17,18,19,20 i 22) su odgovorni za nastanak kancera debelog creva.

2.2 Pregledi-debelog-creva

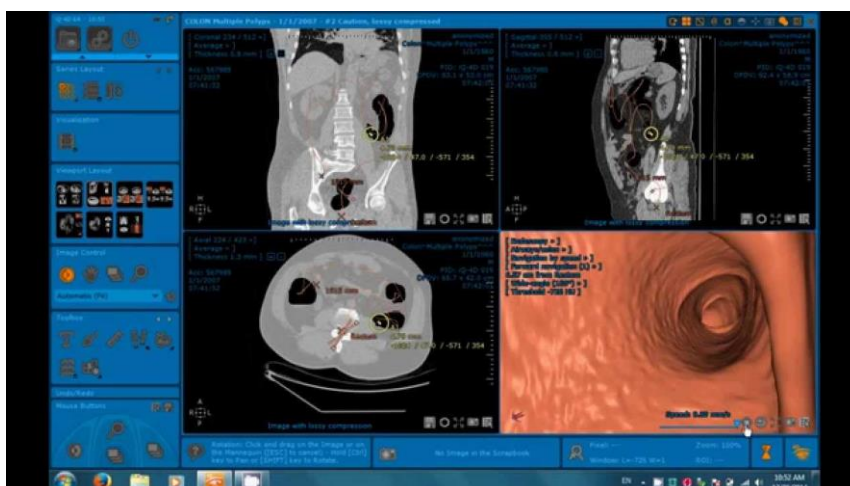
Dijagnostikovanje maligniteta se često postavlja na osnovu podataka dobijenim snimanjem, a kasnije potvrđenih histopatološkim nalazom. Do skora su radiološka procena ili istraživačka hirurgija najčešće korišćena za dijagnozu karcinoma. Pojavom kompjuterizovane tomografije i magnetne rezonance otvorio se novi pristup sagledavanja važnih struktura i anatomskih informacija. Trenutno je u kliničkoj praksi moguće molekularno snimanje spektroskopijom magnetne rezonance i pozitronsko emisionom tomografijom (PET). Ovi modaliteti omogućavaju funkcionalnu, biohemijsku i fiziološku procenu važnih aspekata maligniteta [10]. U daljem delu poglavlja navešćemo četiri glavne metode koje se koriste za preglede debelog creva: (1) kompjuterizovana tomografska kolonografija, (2) endoskopska ispitivanja kapsulom, (3) sigmoidoskopija, i (4) kolonoskopija.

2.2.1 Kompjuterizovana tomografska kolonografija (CTC, CT-kolonografija „virtuelna kolonoskopija”)

Metoda kompjuterizovane tomografske kolonografije (virtualna kolonoskopija) koristi 2D ili 3D slike kolona kako bi se videle i analizirale promene zida creva, intraluminalne promene, kao i promene koje sa spoljašnje strane pritiskaju zid creva. Efikasnost skrininga CT kolonografijom dobijaju se indirektno na osnovu detekcije prekursorskih lezija karcinoma debelog creva. Tehnika koristi magnetne za polarizaciju i pobuđivanje jezgara vodonika u molekulima vode u tkivu, proizvodeći detektabilni signal koji je prostorno kodiran, što rezultira slikama tela. Snimanje traje oko 20 minuta, a tokom njega pacijent ima mogućnost komunikacije sa lekarom ili tehničarem. Rendgenski zraci (jonizujuće zračenje) prolaze kroz telo pod različitim uglovima i detektuju se pomoću kompjuterizovanog skenera. Tako dobijeni podaci se obrađuju i prikazuju kao slike preseka unutrašnjih struktura tela [18, 42]

CT kolonografijom otkriva se 90% promena većih od 10mm, ali takođe postoji i 14% lažno pozitivnih rezultata. Polipe veličine od 6-9mm moguće je otkriti u 65,3% slučajeva. Podaci za polipe manje od 6mm ne postoje jer je senzitivnost CT kolonografije u tim slučajevima mala. U slučaju CT kolonografske histološke analize otkriveno je 55% uznapredovalih adenoma većih od 6mm. U vodičima dobre kliničke prakse preporučuje se da se pacijenti upućuju na kolonoskopski pregled ako imaju više polipa većih od 6mm, što je oko 15-25% svih pregledanih na CT kolonografiji. Ovi rezultati su doprineli da CT kolonografija postane prihvatljiv metod skrininga, međutim, kao nedostatak, navodi se da je za bilo kakvu otkrivenu promenu na debelom crevu neophodna dodatna kolonoskopija. Sa druge strane prednosti CT kolonografije u odnosu na kolonoskopiju jeste da ne zahteva sedaciju, zatim nema rizika od perforacije i dovoljno je nekoliko minuta za pregled, ali kao i kolonoskopija zahteva pripremu debelog creva koja u mnogim slučajevima može biti i zahtevnija kod CT kolonografije [10, 18, 25, 26, 43].

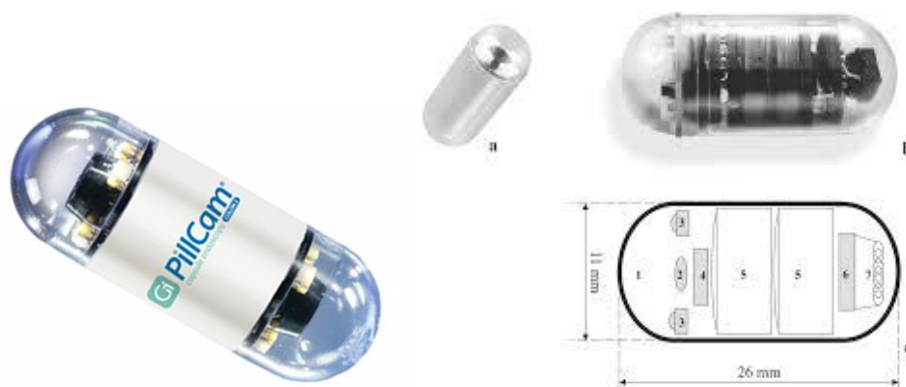
U slučaju CT kolonografije postoji „strah“ zbog nastanka tumora usled posledica zračenja pacijenata u toku pregleda (8,8-10,2mSv/pregled), međutim noviji i napredniji uređaji omogućavaju kvalitetne snimke sa minimalnim izlaganjem zračenju. Trenutno nije utvrđeno da li je CT kolonografija odgovarajući pregled za praćenje pacijenata sa otkrivenim polipima, kao i u kojem bi se intervalu vršili pregledi, stoga su neophodna dodatna istraživanja da bi se utvrdilo koji pacijenti mogu da se prate neinvazivnim metodama, a koji moraju da se upute na endoskopski pregled [18].



Slika 2.2. Virtuelna kolonoskopija, prikaz dobijenog rezultata, <https://www.youtube.com/watch?v=-IIZ-6HKuNo>

2.2.2 Endoskopsko ispitivanje kapsulom (kapsula endoskopija)

Kod ove vrste ispitivanja koristi se kapsula u kojoj se nalazi video kamera na oba kraja sa kojom se fotografiše unutrašnjost gornjih delova digestivnog trakta i tankog creva. Snimljene slike se prenose bežičnim putem do uređaja za snimanje koji ih posle pojačava, pretvara i prosleđuje na računar. Unapređeni modeli imaju značajno dugotrajnije baterije tako da je moguće snimiti i debelo crevo. U poređenju sa klasičnim kolonoskopskim pregledom senzitivnost je niža, 73% uznapredovalih adenoma i 74% ostalih karcinoma, dok je 90% uznapredovalih adenoma i karcinoma detektovano pomoću kolonoskopa. Ispitivanje kapsulom zahteva „perfektnu“ pripremu debelog creva sa jedne strane jer na uticaj i kvalitet snimaka utiče molitet digestivnog trakta što se kasnije ogleda pouzdanošću pregleda. U 10% pregleda kapsula ne stigne da snimi celo crevo. Ovo sporo napredovanje kapsule kroz creva može biti posledica usporenog moliteta zbog čega se baterija istroši pre nego što kapsula dođe do kraja. Ubrzan prolaz kamere kroz debelo crevo, sa druge strane, može za posledicu da ima mali kvalitet slika. Zbog svega navedenog počele su da se primenjuju „pametne“ kapsule, koje su osetljive na pokrete tako da snimaju samo kada se ostvari dovoljan pomeraj unutar creva, a u slučaju usporenog kretanja prelaze u „sleep mode“ da uštede bateriju [18, 25, 26, 44, 45, 46].



Slika 2.3. Endoskopska kapsula, <https://www.clinicaladvisor.com/home/web-exclusives/fda-clears-video-capsule-endoscopy-device/>, Glukhovskiy, A. (2003). Wireless capsule endoscopy. Sensor Review, 23(2), 128–133. doi:10.1108/02602280310468233

U slučaju da se ovim pregledom otkrije polip preporučuje dodatni kolonoskopski ili CTC pregled. Da bi se ova tehnika mogla pouzdano primenjivati neophodna su dalja istraživanja gde bi ciljevi bili: adherencija bolesnika, kvalitet pripreme creva, dugotrajnost bateije i senzitivnost i specifičnost uznapredovalih lezija.

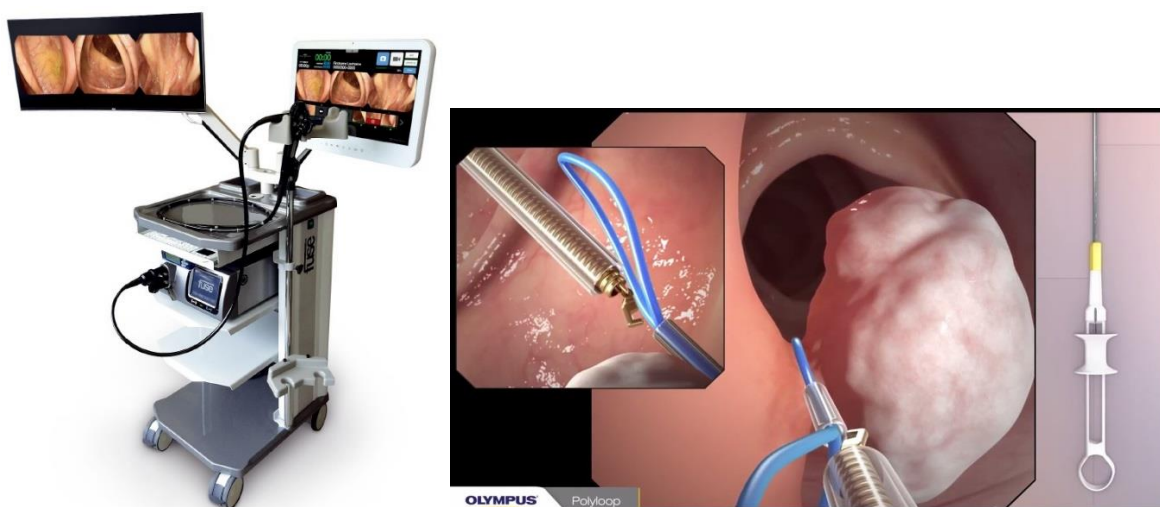
2.2.3 Sigmoidoskopija

Sigmoidoskopija predstavlja metodu za vizualizaciju prvih 50-60cm kolona. Kao takva zahteva pripremu debelog creva, može se obaviti u ordinaciji bez sedacije i obično je praćena osećajem nelagodnosti. Procedura je relativno jednostavna i mogu je obaviti obučeni lekari koji nisu specijalisti gastroenterologije, endoskopski asistenti pa čak i medicinske sestre, međutim postoji značajna razlika o procentu uočenih promena stoga se mora paziti na kvalitet pregleda. U slučaju pronalaska promena pacijenti se šalju na kompletan kolonoskopski pregled. Na osnovu rezultata kolonoskopskih pregleda pokazano je da oko 30% osoba sa uznapredovalim lezijama levog kolona ima promene i u proksimalnom kolonu, a one se ne mogu otkriti sigmoidoskopskim pregledom [47]. Ova vrsta promena prisutnija je kod osoba ženskog pola starosti preko 60 godina te se smatra da bi u ovim slučajevima sigmoidoskopija bila manje korisna [48].

Rezultati studije obavljene u Norveškoj sa nasumičnim izborom pacijenata pokazuju da nakon 7 godina od skrining programa metodom sigmoidoskopskog pregleda, nije bilo značajnog smanjenja incidence kolorektalnog karcinoma dok je primećeno neznajno smanjenje mortaliteta od kancera debelog creva u opštoj populaciji. Međutim, kod pregledanih pacijenata došlo je do smanjenja smrti usled karcinoma kolona za 59%, i smanjenja mortaliteta od karcinoma rektuma i sigme za 76% u poređenju sa kontrolnom grupom. U praksi, lekarima je kolonoskopija mnogo prihvatljivija u slučaju pregleda debelog creva, posebno što se, pregleda celo crevo, pregled se obavlja u analgesedaciji, dok je u nekim zemljama (SAD) mnogo skuplji pregled a samim tim i unosniji u poređenju sa sigmoidoskopijom. Sve navedeno može da predstavlja razloge zašto lekari retko primenjuju sigmoidoskopiju [18, 26, 49].

2.2.4 Kolonoskopija

Kolonoskopijom se vrši pregled celog debelog creva, pri čemu postoji mogućnost uklanjanja polipa i uzimanja biopsijskih uzoraka. Kod kolonoskopije je neophodno čišćenje debelog creva pre pregleda, koje se izvodi u endoskopskoj jedinici ili ambulanti u slučaju već zbrinutih pacijenata. Kompletna jedinica sastoji se od video kolonoskopa i procesora.



Slika 2.4. Prikaz kolonoskopskog uređaja i načina rada istog.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5467064/>,
https://www.youtube.com/watch?v=4aK_2QgNEkU

Kolonoskop za odrasle osobe ima radnu dužinu od 168 do 200 cm i spoljnog prečnika je od 9,2 do 12,8 mm, fleksibilan je i omogućava dijagnostičke i terapijske procedure. Takođe, vidno polje je visoke rezolucije i pokriva 330°, a to je postignuto pomoću tri slike i LED grupe, postavljene po jedna na prednjoj i dve na obe strane distalnog vrha optičkog vlakna. Slike odražavaju prenos odgovarajućih sočiva i endoskopisti na taj način omogućavaju da izvede sve potencijalne manevre, poput potpunog skretanja vrha (180° gore/dole i 160° levo/desno) [50-52]. Usled neugodnosti prilikom izvođenja pregleda, dodatno se pacijenti mogu podvrgnuti sedaciji. Nakon pregleda obično se zahteva da pacijent izostane sa posla taj dan što indirektno povećava troškove pregleda.

Najbolji rezultati su kolonoskopije su za lezije veće od 6 mm, pokazujući osetljivost i specifičnost od oko 98%, odnosno 99%. Međutim, značajan deo pacijenata imaće nepotpunu kolonoskopiju zbog loše pripreme creva, loše tolerancije pacijenta, opstrukcije ili drugih tehničkih poteškoća [53]. Na osnovu rezultata studija koje su sprovedene pokazuje se da se primenom kolonoskopije u skiningu, smanjuje incidenca karcinoma debelog creva za 53-72% i smrtnost za 31%. Međutim nedostaci ovih studija leže u tome što ni jedna od njih ne uzima u obzir komplikacije kolonoskopskog pregleda, sa druge strane ni jedna od ovih studija nije pokazala stvarnu dobit kolonoskopije u smanjenju smrtnih ishoda uopšte. Nacionalna Polyp studija pokazala je da incidenca kolorektalnog bila manja od očekivane kod pacijenata sa adenomima, koji su kolonoskopski pregledani i kod kojih su uklonjeni polipi, u periodu za 6 godina praćenja [18, 26].

U nekim istraživanjima rezultati sugerišu da kolonoskopija ima uticaj na smanjenje mortaliteta u slučaju karcinoma distalnog kolona (čak za 67%) dok nema nikakvog uticaja na smanjenje mortaliteta od karcinoma u proksimalnom, desnom kolonu. Ipak treba napomenuti da se u ovom istraživanju ne bave kvalitetom i kompletnošću samog kolonoskopskog pregleda. U Nemačkoj u okviru polulacionog istraživanja je pokazano da pacijenti sa obavljenim kolonoskopskim pregledom imaju 67% smanjenje prevalencije uznapredovalih adenoma u levom kolonu, dok u desnom nje pokazano nikakvo smanjenje prevalencije. Ovi rezultati nameću opravdano pitanje o uspešnosti kolonoskopije kod otkrivanja karcinoma proksimalnog kolona i to iz dva razloga: 1) nedovoljno razumljiva biologija proksimalnih adenoma i karcinoma, i 2) kvalitet pregleda zbog nemogućnosti uočavanja promena u desnom kolonu [26].

Ipak, kolonoskopija sa histopatologijom predstavlja zlatni standard u dijagnostikovanju kolorektalnog karcinoma zbog svoje uspešnosti i mogućnosti delovanja prilikom dijagnostikovanja i lečenja. Od velike važnosti na učinkovitost kolonoskopije ima sam način i kvalitet izvođenja pregleda jer ona predstavlja krajnju rezultantu svih drugih skrining programa za kolorektalni karcinom. Važni parametri kvalitetno urađenog pregleda ogledaju se u broju/procentu karcinoma koji je otkriven u određenom periodu posle obavljenog pregleda, broj/procentat uočenih polipa u odnosu na broj skrining kolonoskopija, procenat komplikacija, i ostali parametri kvaliteta pregleda (procenat intubacije cekuma, vreme izvlačenja instrumenta, retrofleksija instrumenta u rektumu itd.).

Komplikacije prilikom izvođenja kolonoskopije su vrlo retke, jedna do tri na 1000 pacijenata. Komplikacije koje se mogu pojaviti prilikom pregleda su krvarenje usled uklanjanja polipa, reakcije bolesnika na sedative ili komplikacije od strane kardiovaskularnog ili respiratornog sistema, i kao najteži oblik perforacija, odnosno nastanak rascepa zida creva koji može zahtevati hiruršku intervenciju [18].

U prethodnim godinama tehnološki napredak u oblasti endoskopske slike doveo je do mogućnosti da se otkriju i površinske promene sluznice do 2,5mm visine (prema pariskoj klasifikaciji), gde se hromoendoskopija (indigo karmin) izdvaja kao najkorisnija. Takođe, poboljšana je kvaliteta endoskopske slike i posebna kompjuterska obrada slike. Važno je napomenuti da uspešnost skrininga zavisi od kvaliteta kolonoskopije, s obzirom da se koristi kao potvrda pozitivnih rezultata prethodnih testiranja i stoga su jako bitni sledeći faktori: način izveštavanja, pravovremeno upućivanje na kontrolni pregled u periodu praćenja, izveštaji o drugim oboljenjima, rizici za pregled, kvalitetna priprema za pregled, celovitost pregleda, vreme trajanja i opis analiza, tehnika izvođenja polipektomije i komunikacija sa odgovornim medicinskim osobljem. Indikatori kvaliteta pregleda

između ostalog su i kvalitet pripreme, procenat intubacije cekuma, procenat uočavanja adenoma, procenat uhvaćenih polipa i poslatih na histopatološku analizu, neplanirani ili neželjeni događaji, davanje pravilne preporuke za dalje praćenje i satisfakcija bolesnika. Vreme izvlačenja instrumenta ne bi trebalo da bude kraće od 6 minuta i ono je udruženo sa većim procentom detekcije adenoma [18, 26].

Sve navedene metode imaju svoje prednosti, kao i ograničenja, ali i dalje postoji velika potreba i potencijal za razvojem nove metode koja bi bila korišćena u ranoj detekciji kolorektalnog karcinoma. Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je epitelno tkivo kolona i rektuma i otkrivanje njegovog malignog stanja u ranoj fazi. Korišćenjem metode OMIS dobijamo informaciju o biofizičkim karakteristikama tkiva na osnovu kojih je izvršena klasifikacija epidermalnog tkiva kolorektuma na zdravo i bolesno, a kasnijim unapređenjem može se izvršiti raspodela prema stepenima prihvaćene TMN klasifikacije. Predloženi automatski algoritam za razvrstavanje materijala prema obrađenim podacima omogućila bi uslove za prevazilaženje problema subjektivnosti postojećih metoda kao što je već navedeno u tekstu Disertaciji. Pored toga ova doktorska disertacija otvara mogućnost nove inovacije kombinovanjem postojeće metode OMIS sa kolonoskopom. Na ovaj način povećali tačnost, skratili bi vreme dijagnostikovanja, ukazali koje promene su samo za praćenje, a za koje je neophodno uzeti biopsijski nalaz.

3 UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Rano otkrivanje karcinoma je presudno, jer stanje pacijenta može biti nepovratno kada se pojave klinički simptomi. Zapravo, rano otkrivanje bolesti i identifikacija rizičnih osoba mogu odložiti ili sprečiti dalje napredovanje odgovarajućim tretmanima i u velikoj meri bi povećali stopu preživljavanja pacijenata. Međutim, trenutne metode skrininga i dijagnostike, uključujući tehnike snimanja, obično otkrivaju karcinom u kasnoj fazi kada je vidljiva tumorska masa, a postojećim skrining testovima nedostaje neophodna osetljivost i specifičnost u ranoj fazi bolesti. Do danas je zlatni standard za dijagnozu većine karcinoma i dalje mikroskopska procena obojenih uzoraka tkiva od strane patologa, koja se vrši kada su kancerogene ili predkancerogene lezije uočljive i već sadrže značajne genetske promene. Štaviše, upotreba histopatološke dijagnoze je invazivna, dugotrajna i ima ograničenu osetljivost, jer u velikoj meri zavisi od subjektivne procene patologa što dovodi do varijacija unutar i među posmatračima. Stoga su pogrešne dijagnoze sa visokim lažno negativnim i lažno pozitivnim stopama uobičajene u proceni tkiva. U stvari, približno 10% patološke procene ne bi moglo rezultirati čvrstom dijagnozom, jer su ili neki tumori histološki slični ili tkivo porekla nije moglo biti identifikovano iz razloga slabo diferenciranih ćelija. Takođe, metoda uključuje složeni proces histohemijskih tehnika bojenja uzoraka tkiva, pri čemu najčešće korišćene boje hematoksilina i eozina nisu specifične za karcinom [54].

Najšire strategije skrininga kolorektalnog karcinoma zasnivaju se na godišnjim ili dvogodišnjim testovima fekalne okultne krvi, sa kolonoskopijom rezervisanom za pozitivne testove, ili na endoskopskim postupcima koji se izvode jednom ili na svakih 5 godina za fleksibilnu sigmoidoskopiju (FS) ili na svakih 10 godina u slučaju kolonoskopije. Pored toga, u toku su i drugi postupci skrininga, poput CT kolonografije i analize fekalne DNK. Usklađenost sa skriningom i tačnost skrining testova su dve glavne odrednice efikasnosti skrining programa. Iako su dokazi iz nekoliko studija pokazali da su neke od gore pomenutih strategija efikasne i isplative, učešće je i dalje slabo sa stopama usklađenosti nižim od 50% u programima zasnovanim na populaciji koji se izvode u Evropi i SAD. Tokom poslednje decenije došlo je do značajnog poboljšanja u performansama skrining testova za otkrivanje KRK i preneoplastičnih lezija. Kao što je rečeno nekoliko randomiziranih kontrolisanih ispitivanja pokazalo je da su novi polukvantitativni fekalni imunohemijski testovi (FIT) bolje prihvaćeni i imaju bolje performanse od tradicionalnog gvajak testa za otkrivanje kolorektalne neoplazije. Pored toga, uvedene su nove tehnologije (tj. endoskopija sa poboljšanom slikom (IEE)) za poboljšanje endoskopske detekcije polipa, iako njen uticaj u okviru skrininga još uvek treba definisati [30, 55].

Značajno je navesti da skrining kolorektalnog karcinoma nije samo efikasno sredstvo za smanjenje smrtnosti i incidencije povezane sa bolešću, već se procenjuju i prihvatljivi troškovi. Pre skoro dvadeset godina, američka radna grupa za preventivne usluge (USPSTF) procenila je da su se troškovi za različito životno doba dobijeni po životnoj godini kretali između 10,000 i 25,000 američkih dolara. Međutim, nekoliko metoda skrininga koje se danas smatraju prvim izborom strategija skrininga (tj. FIT) nisu bile dostupne u vreme izveštaja USPSTF. Dokazi sprovedenih studija potvrdili su isplativost u kontinuiranom skriningu kolorektalnog karcinoma u poređenju ukoliko ga ne bi bilo, bez obzira na korišćeni test skrininga. Međutim, isplativa analiza ne pojašnjava koji je optimalni test za skrining, zbog neizvesnosti koja okružuje mnoge aspekte takvih intervencija [55].

Odgovarajuća dijagnoza i određivanje stadijuma bolesti su presudni za sigurnost ispravne strategije lečenja. U poslednjih 10 godina stopa smrtnosti od kolorektalnog karcinoma smanjila se za više od 20% usled sve većeg razvoja dijagnostičkih tehnika i optimizacije hirurške, adjuvantne i palijativne terapije. Kompletna kolonoskopija do slepog creva, zajedno sa biopsijom za histopatološki pregled, smatra se zlatnim standardom za dijagnozu kolorektalnih lezija, s obzirom na njene visoke dijagnostičke performanse. Njegova glavna prednost je što se uklanjanje adenoma ili ranog karcinoma može obaviti tokom istog postupka, dok svi ostali skrining testovi zahtevaju kolonoskopiju za potvrdu i uklanjanje. Međutim, i pored svih prednosti kolonoskopija takođe ima važna ograničenja: prvo, rizik od velikih komplikacija (postpolipektomsko krvarenje i perforacija procenjuje se na vrlo nizak nivo

(0,1 i 0,3%) za simptomatske pacijente, ali i dalje može biti relevantan podatak u okviru skrining programa, gde se istražuju asimptomatski subjekti; drugo, iako se kolonoskopija smatra referentnim standardom za otkrivanje neoplazije debelog creva, polipi se i dalje propuštaju. Značajna stopa propusta adenoma od 20 do 26% za bilo koji adenom i od 2,1% za velike adenome (≥ 10 mm) zabeleženo je u studijama kolonoskopije. Stopa otkrivanja adenoma u velikoj meri zavisi od standarda kvaliteta, uključujući veštine kolonoskopiste, tehnologiju i nekoliko faktora povezanih sa pacijentima [53, 55]. Endoskopska kapsula za detekciju karcinoma debelog creva primenjena kod visoko rizičnih pacijenata pokazala je osetljivost i specifičnost za otkrivanje polipa ≥ 6 mm 64%, odnosno 84%, dok su osetljivost i specifičnost za napredno otkrivanje adenoma bili 73%, odnosno 79%. Osnovni nedostaci endoskopske kapsule su njena cena, jednokratna upotreba i nedostupnost celokupnoj populaciji, zatim vek trajanja baterije, loš kvalitet slike, nekontrolisana insuficijencija vazduha, zadržavanje ili odložen prolaz, video kompresija, nemogućnost manevrisanja, nemogućnost terapijskog ili biopsijskog dejstva, odloženo vreme tumačenja rezultata. U poređenju sa punom kolonoskopijom, tačnost kapsule debelog creva je znatno niža i potrebno je još opsežnije čišćenje creva [55-57]. Sigmoidoskopija kao metoda zasniva se na činjenici da se većina, 60%, lezija nalazi u sigmoidnom delu debelog creva i da se može izvesti bez opšte anestezije uz manju neprijatnost. Međutim, i ova metoda traži pripremu pacijenta i teža je od testova, a glavni limit joj je što ne može da pregleda celo debelo crevo [58]. Testovi na okultno krvarenje i pored prednosti u lakoći primene imaju velike nedostatke koji se ogledaju u niskoj senzitivnosti koja ograničava efikasnost u smanjenju smrtnosti od kolorektalnog karcinoma, zatim visoka specifičnost koja povećava troškove skrininga jer se osobe sa lažno pozitivnim rezultatima šalju na dodatni kolonoskopski pregled, kao i broj ponavljanja testa (FOBT). DNK test ima prednost u odnosu na pomenute testove jer ne zahteva promene ishrane ili pripremu pre testiranja, za razliku od FOBT-a i kolonoskopije nije osetljiv na proksimalnu lokaciju tumora. I pored svojih prednosti navedeni test ima ograničenja u vidu senzitivnosti, načina sakupljanja i transporta uzoraka. Kao veliki nedostatak navodi se visoka stopa lažno pozitivnih rezultata, a samim tim i isplativost njegove upotrebe [39,40].

Iz prethodno navedenih činjenica može se videti da metode skrininga imaju svoje prednosti i ograničenja, a da bi idealan model skrininga kako se navodi trebalo da bude jeftin, nekomplikovan, neinvazivan, visoke senzitivnosti i specifičnosti što bi omogućilo jasno izdvajanje osoba sa visokim rizikom od kolorektalnog karcinoma. U tom kontekstu i uzimajući u obzir sve veći broj pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, IVD testiranje postaje sve neophodnije i češće. Testovi za prevenciju bolesti i rano otkrivanje, procena rizika od bolesti i identifikacija lekova specifičnih za pacijenta biće neophodni u budućnosti. Pojavljuje se fundamentalna promena, sve manje testova se izvodi centralizovano u laboratorijama, ali se više odvija decentralizovano blizu pacijenta u bolničkoj stanici i u lekarskoj praksi. Na kraju, sam pacijent će (mora) više doprineti održavanju svog zdravlja, testirajući se kod kuće i integrišući se u mrežu elektronske dijagnostike svih ostalih učesnika na tržištu, uključujući proizvođače lekova, proizvođače dijagnostike, medicinske laboratorije i obveznike. Trenutno se ovi zahtevi budućeg IVD tržišta brzo oblikuju, što pokazuju sledeći primeri najnovijih dostignuća u genetskim istraživanjima, dijagnostičkoj tehnologiji i digitalizaciji. Poslednjih godina značajno je podstaknut razvoj dijagnostičke tehnologije. Pacijent će uskoro moći da dobije pristupačnu kompletnu DNK analizu koju mu je isporučila ordinacija lekara opšte prakse. Pored opisanog razvoja u genetičkim istraživanjima i dijagnostičkoj tehnologiji, digitalizacija ima najveći potencijal za IVD industriju. Sve veći broj malih komercijalno upotrebljivih uzoraka uzrokuje veliku količinu podataka na već rastućem tržištu. Za procenu takvih tokova podataka potrebni su najsavremeniji sistemi. Ovaj trend doveo je do bliske saradnje i akvizicija između IT kompanija i dobavljača IVD-a. IT kompanije imaju sve veću ulogu u IVD industriji, kroz formiranje saradnje ili direktne ponude svojih rešenja krajnjim kupcima IVD tržišta [24].

Tabela 3.1. Tipovi KRK skrining testova i njihova efikasnost u kliničkim studijama [18, 26]

Vrsta skrining testa	Senzitivnost za KRK - jednom urađen test	Senzitivnost za adenome - jednom-urađen testa	Preporučeni interval pregleda	Prednosti	Ograničenja
Pregledi stolice					
gFOBT-standardni gFOBT-SENS A	13–50 % 50–75 %	11 %–24 % 20 %–25 %	godišnje	- Bez pripreme za pregled - Testiranje od kuće - Niska cena - Neinvazivan	- Broj testiranja 3 - Propuštanje polipa - Lažno pozitivni rezultati - Obavezna kolonoskopija u slučaju abnormalnosti
FIT	60–85 %	20 %–50 %	dvogodišnje	- Specifičan za ljudsku krv - Jedno testiranje - Niska cena - Neinvazivan - Bez pripreme	- Propuštanje polipa - Lažno pozitivni rezultati - Obavezna kolonoskopija u slučaju abnormalnosti
DNA stari DNA novi	51 % 80 % +	18 % 40 %	Nepoznato, predlog 3 godine	- Bez pripreme - Testiranje kod kuće - 1 uzorak - Neinvazivan	- Propuštanje polipa - Visoka cena testa - Nepoznat interval testiranja - Obavezna kolonoskopija u slučaju abnormalnosti
Pregledi debelog creva					
CTC	>90 %	90 %	5 godina	- Pregled čitavog kolona - Bez sedatacije - Neinvazivan	- Potpuna priprema za pregled - Visoka cena pregleda - Nemogućnost uklanjanja polipa i biopsije - Izloženost niskoj dozi radijacije - Ne pokrivenost osiguranjem - Obavezna kolonoskopija u slučaju abnormalnosti
FRSS	>95-% distalni	30–70 %	5 godina	-Relativno jednostavna procedura - Omogućava pregled proksimalnog dela kolona	- Potpuna priprema za pregled - Pregled dela kolona - invazivna
Kolonoskopija	Kolon 95 %	88–98 %	10 godina	- Pregled celog debelog creva - Uklanja polipe i moguća biopsija - Dijagnostika drugih oboljenja - Obavezna posle abnormalnih rezultata drugih testova	- Potpuna priprema za pregled - Sedatacija ponekad neophodna - Neprijatna i invazivna - Odsustvo pacijenta sa posla - Rizici od povreda - Nemogućnost pregleda proksimalnog dela kolona

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je karakterizacija epitelnog tkiva debelog creva pomoću Optomagnetne imidžing spektroskopije i remanentne magnetizacije, kao dve osnovne metode, i primene automatizovanog algoritma za razvrstavanje stanja tkiva na dve grupe: zdravo/bolesno kako bi se otvorio novi pravac za dalji razvoj metode i njeno uvođenje u kliničku praksu kao metodu/test za skrining, uz povećanje preciznosti dijagnostike i uštedu vremena i novca.

Ciljevi istraživanja

Pregledom literature i na osnovu izloženog materijala **ciljevi** ove doktorske disertacije su:

1. Utvrđivanje spektralnih karakteristika zdravog i kancerogenog tkiva kolona i rektuma, definisanje karakteristika tkiva na bazi optomagnetne imidžing spektroskopije na uzorcima veličine 25 x 25mm,
2. Utvrđivanje biomehaničkih osobina zdravog i kancerogenog tkiva pomoću merenja paramagnetnih/dijamagnetnih osobina tkiva korišćenjem rezultata merenja remanentne magnetizacije (tačnost ± 3 pT) i parametarskog frakcionog modela (tečno-viskoelastično-čvrsto).
3. Izbor adekvatne metode i algoritama za automatsko razvrstavanje epitelnog tkiva rektuma (zdravo/kancerogeno) na bazi optomagnetnih spektralnih signala iz reflektovane difuzne i polarizovane svetlosti.

Očekivani rezultati

Očekivani rezultati doktorske disertacije:

1. Da se pomoću optičkih i paramagnetno/ dijamagnetnih svojstva tkiva debelog creva u *ex vivo* uslovima mogu identifikovati biofizičke razlike između zdravog i kancerogenog tkiva, pomoću OMIS i JR-6A metoda.
2. Da će se pomoću predloženog algoritama na bazi veštačkih neuronskih mreža i OMIS spektara, izvršiti klasifikacija zdravog/kancerogeno tkivo sa tačnošću većom od 85%.
3. Da će se nova metoda OMIS sa algoritmom na bazi veštačkih neuronskih mreža, kao neinvazivna metoda, moći primeniti za skrining i monitoring karcinoma debelog creva,
4. Da će disertacija otvoriti nove mogućnosti za razvoj tehnika/metoda ne samo za skrining i monitoring već i za ranu, neinvazivnu dijagnostiku karcinoma debelog creva na bazi kombinacije OMIS metode i kolonoskopa

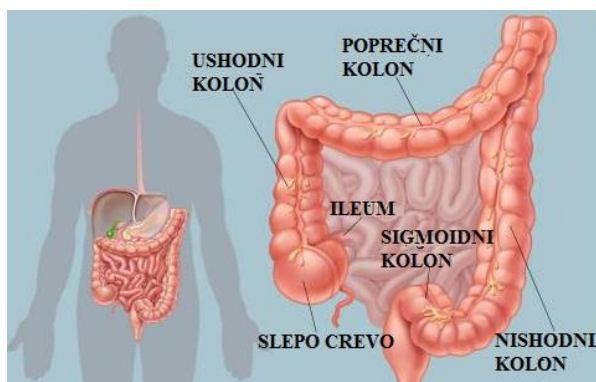
4 MATERIJAL

Materijal koji istražujemo u doktorskoj disertaciji je epitalno tkivo debelog creva. Debelo crevo (lat. *intestinum crassum*) je završni deo gastrointestinalnog trakta. Prostire se od ilealnog ušća (lat. *ostium ileocecale*) do čmara (lat. *anus*). U celini ima oblik znaka pitanja, koji svojim konkavitetom, okrenutim naniže, obuhvata vijuge tankog creva. Dužina debelog creva je 120-150 cm (oko 1/4 dužine tankog creva), dok se širina lumena smanjuje zdesna ulevo, od 8-9 cm na njegovom početku (cekumu) do 2-3 cm u završnom delu na sigmoidnom kolonu. Dimenzije (širina i dužina) variraju u zavisnosti od konstitucije, uzrasta i pola.

4.1 Anatomija debelog creva

Anatomski debelo crevo se deli na slepo crevo, kolon i pravo crevo. Slepo crevo (lat. *caecum ili caekum*) je početni deo desnog kolona i leži u desnoj bedrenoj jami. Ima oblik plitke kese, čije je slepo zatvoreno dno okrenuto naniže. Dužina cekuma je 6 cm, a kalibar 8-9 cm. Od donjeg dela unutrašnje strane cekuma polazi crvuljak ili crvoliki privezak (lat. *appendix vermiformis*). Dužina crvuljka iznosi oko 9 cm, a njegov kalibar iznosi 5-10 mm. Sluzokoža crvuljka sadrži brojne grupisane limfne čvorove zbog čega se crvuljak naziva "crevni karajnik", a samim tim često se u njemu razvija zapaljenski proces (lat. *appendicitis*) koji zahteva hirurško uklanjanje.

Kolon (lat. *colon*) je središnji i najduži deo debelog creva. Deli se na ushodni (lat. *colon ascendens*), poprečni (lat. *colon transversum*) i nishodni kolon (lat. *colon descendens*) koji na kraju prelazi u srpasti kolon (*colon sigmoideum*). Na početku i kraju poprečnog kolona nalaze se dve oštre krivine (hepatična i slezinska) u kojima je kolon najčvršće pripojen za zadnji trbušni zid. Poprečni i srpasti kolon poseduju peritonealnu duplikaturu – mezo, što ih čini intraperitonealnim organima, dok su preostali delovi kolona sekundarno retroperitonealni.



Slika 4.1. Delovi debelog creva, <https://www.webmd.com/digestive-disorders/picture-of-the-colon#1>

Ushodni kolon penje se vertikalno kroz desnu polovinu podmezokoličnog sprata trbušne duplje do ispod desnog rebarnog luka, tj. do ispod desnog režnja jetre i tu skreće ulevo, prelazeći u poprečni kolon. Leži u desnoj bedrenoj jami. Njegova dužina iznosi 15 cm, a prema položaju koji zauzima u trbušnoj duplji spada u sekundarno retroperitonealni organ.

Poprečni kolon je intraperitonealan organ, dužine 50 cm i prečnika 5 cm, pruža se poprečno kroz trbušnu duplju do ispod levog rebarnog luka i tu skreće naniže, nastavljajući se nishodnim kolonom. Na prelazu ushodnog u poprečni kolon nalazi se desna krivina kolona ili hepatična (*flexura coli dextra*), dok se na prelazu poprečnog kolona u nishodni kolon nalazi leva krivina kolona ili slezinska (*flexura coli sinistra*).

Nishodni kolon pruža se vertikalno naniže do leve bedrene jame, sekundarno retroperitonealni organ, gde se nastavlja sigmoidnim kolonom. Dužina nishodnog kolona iznosi 25 cm. Počinje u

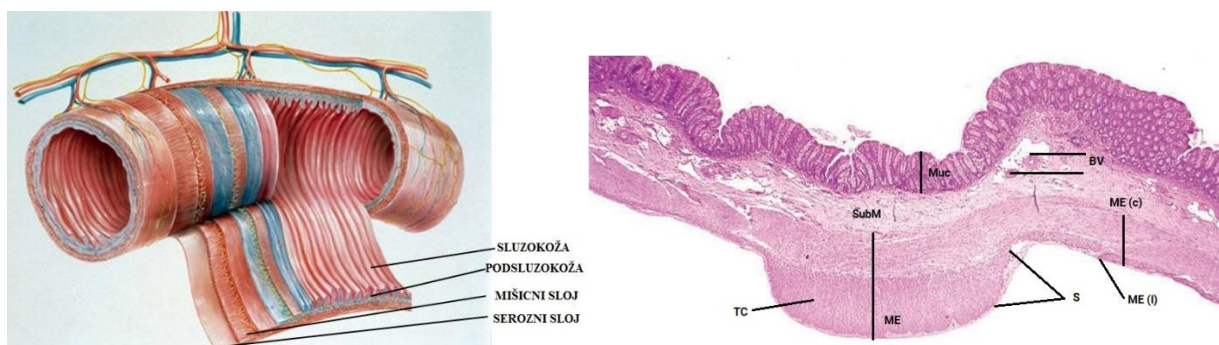
levom hipohondrijumu, gde se nastavlja na krivinu kolona (*flexura coli sinistra*), zatim se pruža vertikalno naniže, kroz levi slabinski predeo, do leve bedrene jame i tu se produžava srpastim kolonom. Leži u podmezokoličnom spratu trbušne duplje dublje položen nego ushodni kolon. Između prednje strane nishodnog kolona i prednjeg trbušnog zida leže vijuge tankog creva te zato nishodni kolon ne može da se napipa kroz prednji trbišni zid.

Sigmoidni kolon (srpasti) ima oblik slova S, dug je 40 cm i kalibar mu je 3 cm, a pruža se najpre, kroz levu bedrenu jamu, a zatim silazi u malu karlicu, gde se nastavlja čmarnim (pravim) crevom. Prema svom položaju je intraperitonealan organ. Njen gornji, manji deo, leži u levoj bedrenoj jami, dok se njen donji, veći deo, nalazi u maloj karlici.

Pravo crevo (lat. *rectum*) se nastavlja na terminalni deo debelog čija je gornja trećina (rekto-sigmoidni prelaz) položena intraperitonealno. Njegove donje 2/3 se nalaze ispod peritoneuma, prolazeći kroz presakralni prostor i mišićnu masu pod karlice. Pravo crevo počinje na rektosigmoidnom prelazu u visini trećeg sakralnog pršljena. Dužina rektuma je 12-15 cm. Iako reč *rectus* znači prav, rektum zapravo nije pravo crevo. U sagitalnoj ravni gradi luk konkavan ka napred prilagođavajući se i ispunjavajući sakrokockigealno udubljenje, da bi pri prolasku kroz pelvični pod formirao anorektalni ugao konkavan pozadi. U frontalnoj ravni gradi tri krivine od kojih su gornja i donja konveksne u desno a srednja u levo. U lumenu rektuma ovim krivinama odgovaraju valvule rektuma tzv. Hustonovi nabori koje formiraju cirkularni mišićni sloj i sluzokoža. Sluzokoža nije čvrsto vezana za mišićni sloj te se nabori gube prilikom distenzije rektuma [59].

4.2 Histologija debelog creva

Mikroanatomska građa debelog creva, u svom poprečnom preseku, ogleda se u slojevitosti, karakterističnoj za većinu organa digestivnog sistema. Zid debelog creva sastoji se iz četiri sloja: sluzokoža (lat. *tunica mucosa*), podsluzokoža (lat. *tunica submucosa*), mišićni sloj (lat. *tunica muscularis*) i serozni sloj ili adventicijalni omotač (lat. *tunica serosa* ili *tunica adventitia*). Navedeni raspored slojeva prikazan je za pogled od iznutra ka spolja.



Slika 4.2.(levo) slojevi zida digestivne cevi i (desno) histološki prikaz zida debelog creva, Ros H, Hystology: a text and atlas, sixth edition, Lippincott&Wilkins, 2010

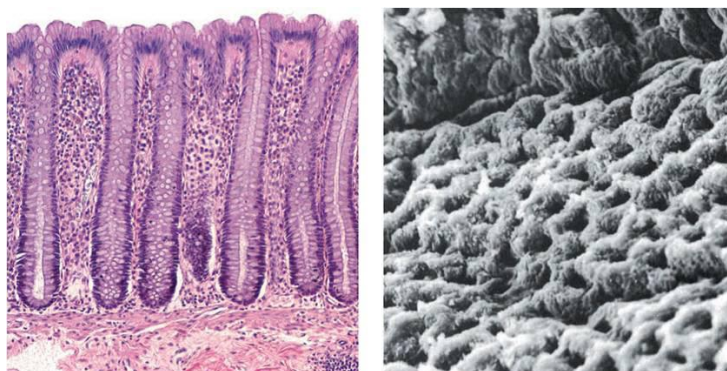
Sluzokoža i podsluzokoža debelog creva specifično su nabrane i ovi nabori su uzrok karakterističnog izgleda lumena debelog creva, u vidu pukotine između nabora koji se sustiču prema sredini lumena.

Sluzokoža sastoji se iz tri lamine (podsloja), počev od lumena digestivne cevi: *lamina epithelialis*, *lamina propria* i *lamina muscularis mucosae*.

Epitelni podsloj sastoji se iz jednorednog cilindričnog epitela i gradi paralelne uvrate podjednake dubine, perpendikularne u odnosu na sluznicu. Uvrati ovog sloja predstavljeni su kriptama, što u suštini čini prototip prostih tubularnih žlezda. Pokriva mnogobrojne crevne resice, a nastavlja se u kontinuitetu i kroz laminu propriu do mišićnog sloja kao epitel tubularnih Lieberkinovih žlezda (*glandulae Lieberkühni*). Najzastupljenije ćelije ovog podsloja su apsorptivne ćelije (enterociti) i

peharaste ćelije. Odnos ovih ćelija je približno je 1:1, s tim što je u proksimalnim delovima više apsorptivnih, a u rektumu više peharastih ćelija. Apsorptivne ćelije su visoke cilindrične polarizovane ćelije čija je apikalna plazmalema u kontaktu sa sadržajem lumena debelog creva, a bazalna plazmalema u kontaktu sa bazalnom membranom. Osim uloge digestije i apsorpcije sastojaka hrane, enterociti imaju ulogu sekrecije imunoglobulina A (sIgA). Peharaste ćelije imaju karakterističan izgled pehara jer im je bazalna polovina uža od apikalne koja se naglo širi jer se u njoj nalaze nagomilane granule mucina. Ove ćelije sintetišu i sekretuju glikoprotein mucin koji sjedinjavanjem sa vodom u lumenu creva daje mukus, koji kasnije omogućava prolaz sadržaja-fecesa, nastalog uklanjanjem velikog dela vode iz sadržaja koji postaje čvrsta masa, bez suvišnog i štetnog trenja.

Pored ovih, jasno morfološki definisanih ćelija u epitelnom podslaju nalaze se enteroendokrine i matične ćelije. Matične ćelije se nalaze u najdubljim delovima Liberkinovih kripti, čijom proliferacijom i diferencijacijom nastaju sve ostale populacije epitelnih ćelija. U slepom crevu i na mestu prelaska u ushodni kolon nalaze se Panetove (*Paneth*) ćelije, dok njihovo pojavljivanje u distalnijim delovima vezuje za nastanak nekih infekcija.



Slika 4.3. sluzokoža debelog creva, Ros H, Hystology: a text and atlas, sixth edition, Lippincott&Wilkins, 2010

Drugi podslaj, lamina propriju, u osnovi čini rastresito vezivno tkivo. Karakteriše je postojanje Liberkinovih kripti koje su prave tubularne i pružaju se celom širinom mukoze. Oko bazalne membrane epitela Liberkinovih kripti uočava se kontinuirani sloj fibroblasta koji čine markantniji omotač oko epitela. Fibroblasti sintetišu retikularna vlakna koja čine lamina retikularis bazalne membrane epitela kolona. Uglavnom se ispod epitela uočava zadebljali sloj retikularnih vlakana koja su organizovana u vidu ploče kolagena koja se nalazi između bazalne lamine epitela i bazalne lamine endotela krvnog suda laminae propriae. Uloga im je u pružanju prostorne orijentacije apsorbovanim molekulima hrane i njihovom usmeravanju ka krvnim sudovima laminae propriae. Osim fibroblasta, u lamini propriji se nalaze i mnogobrojne druge ćelije među kojima i ćelije imunološke odbrane u okviru GALT-a. Za lamina propriju kolona karakteristično je i veoma važno odsustvo limfnih sudova. što znači da karcinom debelog creva koji je ograničen na sluzokožu nema metastatski potencijal, već se tretira kao *in situ* karcinom [60,61].

Lamina muskularis mukoze se sastoji od glatkih mišićnih ćelija koje se pružaju kružno u odnosu na dužnu osu debelog creva i predstavlja granicu između sluzokože i podsluzokože. Ovaj podslaj se sastoji iz *tunica submucosa* i *tunica muscularis*. Submukoza je rastresito vezivno tkivo debelog creva koje obiluje krvnim i limfnim sudovima, kao i nervima.

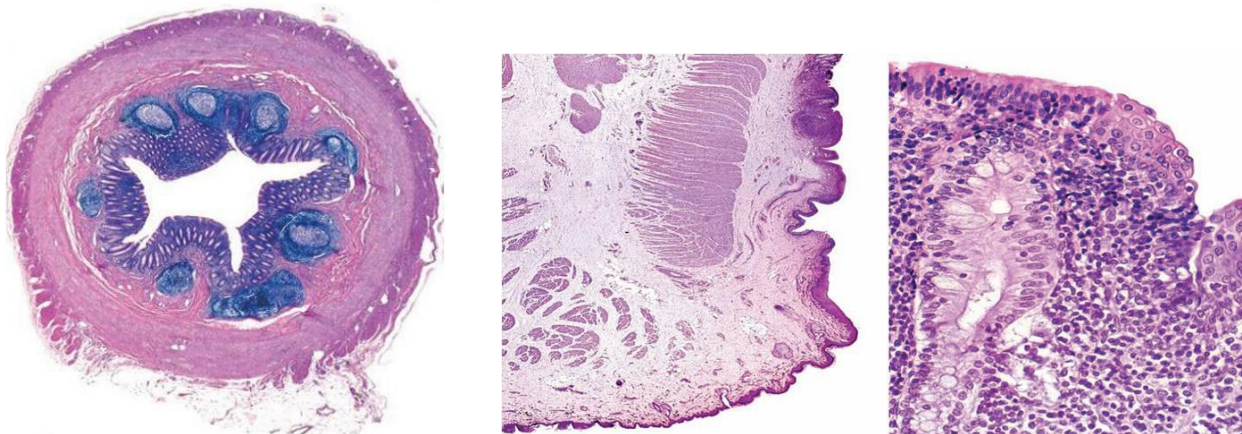
Mišićni sloj debelog creva sastoji se iz unutrašnjeg cirkularnog podslaja i spoljašnjeg longitudinalnog sloja koji je na poprečnom preseku diskontinuiran i čine ga tri uždužne trake (*taenia coli*), dok je prisustvo mišićnih ćelija između traka kontinuirano, ali su raspoređene u veoma tankom sloju. Takođe za ovaj sloj je karakteristično prisustvo pojedinačnih mišićnih snopova koji se periodično odvajaju od tenija i zalaze u unutrašnji (cirkularni) podslaj glatkih mišićnih ćelija.

Ovakvim rasporedom mišićnih snopova omogućava se segmentna kontrakcija i stvaranje haustra (sakulacija kolona) što omogućava bolji kontakt između sadržaja lumena i epitela kolona.

Seroza i adventicija zastupljene su u zavisnosti od toga koji deo debelog creva se nalazi intraperitonealno (tunica serosa), a koji deo ekstraperitonealno (tunica adventitia). U oba slučaja čini rastresito vezivno tkivo koje je kod tunicae serose pokriveno mezotelom visceralnog lista peritoneuma (trbušne maramice).

Crvuljak je deo debelog creva koji je praktično izgubio svoju ulogu u obradi hrane. U mukozi se zapažaju malobrojne kratke Liberkinove kripte. Ispod zaravnjene površine epitela, u lamini propriji i submukozi su mnogobrojni limfociti grupisani u nodule (*nodulli lymphatici solitarii*). Zbog prisustva i funkcije ovih struktura, appendix vermiformis je simbolično nazvan crevnom tonzilom. Naime, postoji morfo-funkcionalna sličnost između građe tonzole (*tonsilla*) u ždreleu i apendiksa. Kao limfatični organ, tonzila predstavlja barijeru antigenima (unetim vazduhom ili hranom) koji prolaze kroz ždrelo. Isto tako se u apendiksu, ostvarivanjem kontakta sa imunokompetentnim ćelijama, zaustavljaju i inaktiviraju antigeni koji su prošli prethodne barijere.

Kao deo debelog creva, apendiks ima iste slojeve zida. Spoljni sloj tunicae muscularis se sastoji od uniformnog sloja glatkih mišićnih ćelija koje su paralelne dužnoj osi apendiksa.



Slika 4.4.(levo) histološki prikaz zida appendix vermiformis-a; (desno) histološki prikaz analnog kanala, Ros H, Hystology: a text and atlas, sixth edition, Lippincott&Wilkins, 2010

Pravo crevo histološki gledano ima sličnu građu kao i ostatak debelog creva. Na oko 2 cm od anusa, u tranzicionoj zoni, jednoredan cilindričan epitel naglo prelazi u pločasto slojevit epitel bez orožavanja koji se zatim u nivou anusa nastavlja na pločasto slojevit epitel sa orožavanjem (*epidermis perineuma*). Epitelni sloj prati sloj vezivnog tkiva (*lamina propia*) sa krvnim i limfnim sudovima i mišićnim slojem (*lamina muscularis mucosae*). Submukoza sadrži rastresito vezivno tkivo sa krvnim sudovima, limfnim folikulima i Meisnerovim pleksusom. Mišićni sloj ima unutrašnji kružni i spoljašnji longitudinalni sloj između kojih leži Auerbahov pleksus.

U mukozi proksimalnog dela rektuma nalaze se tubularne prave žlezde sa mnogobrojnim peharastim ćelijama koje sekretuju mucin u lumen rektuma, dok se u distalnom delu nalaze cirkumanalne žlezde koje sekretuju po apokrinom tipu [59, 62, 63].

4.3 Funkcionalne karakteristike debelog creva

Osnovne funkcije kolona obuhvataju dehidrataciju i skladištenje ileumskog otpadnog materijala u obliku fecesa. Vodu, elektrolite i neke metabolite apsorbuje sluzokoža, pokretima preko luminalnog sadržaja uz pomoć lokalnih (segmentacione) i totalnih (peristaltičke) kontrakcija zida. Kalijum se dodaje sadržaju preko sluzi tj. mukusa. Uopšteno gledajući, što je veći broj pokreta veća je apsorpcija tečnosti, u mnogim slučajevima rastresitost stolice je povezana sa relativnom neaktivnošću mišića zida i konstipacijom usled preterane kontraktilnosti.

4.4 Metode prikupljanja uzoraka za ispitivanje

Za potrebe istraživanja projekta „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, u čijem okviru je rađena ova doktorska disertacija, korišćeni su uzorci tkiva kolona na klinici za digestivnu hirurgiju – I hirurškoj klinici kliničkog centra Srbije. Uzorci su preuzimani odmah nakon ekscizije tkiva, isprani vodom i karakterisani opto-magnnom imaging spektroskopijom (OMIS). Zatim je uz pomoć viskokvalifikovanog lica vršeno uzorkovanje materijala u specijalne kontejnere za skladištenje biološkog materija i uzorci su nakon transporta snimani u laboratoriji Nanolab na Mašinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, pomoću spinner magnetometra JR-6A.

5 METODE, TEHNIKE I PROCEDURE

Osnovna tehnika korišćena u eksperimentalnom delu studije je Opto-magnetna imidžing spektroskopija (OMIS) za karakterizaciju optičkih osobina tkiva debelog creva, a remanentni magnetizam za određivanje relevantnih paramagnetnih i mehaničkih osobina koristeći model frakcionog izvoda.

5.1 Opto-magnetna imidžing spektroskopija

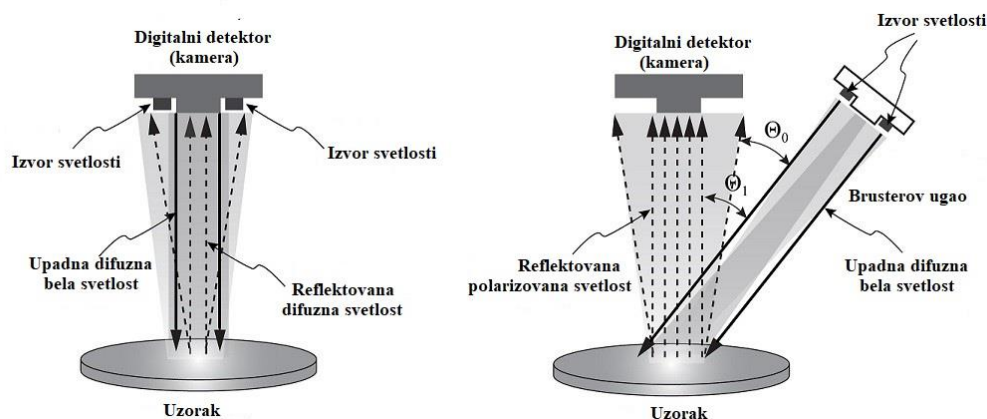
5.1.1 Osnovni principi Opto-magnetne imidžing spektroskopije

Opto-magnetna imidžing spektroskopija je tehnika koja se bazira na interakciji elektromagnetnog zračenja sa valentnim elektronima materije i vodoničnim vezama. Proračuni na osnovu orbitalne brzine valentnih elektrona u atomima ukazuju da je odnos magnetnih i električnih sila $F_M/F_E \approx 10^{-4}$. Kako je sila neposredno povezana sa kvantnim dejstvom, izraženim Plankovom konstantnom, $h = F \times d \times t = 6.626 \times 10^{-34} Js$, gde je F sila čije su vrednosti u opsegu 0,01 – 1.0 nN, d pomeraj čije su vrednosti u opsegu 0,1 – 5.0 nm, a t vreme čije su vrednosti u opsegu 10^{-8} - 10^{-10} s, može se zaključiti da su magnetske sile u materiji za četiri reda veličine bliže kvantnom dejstvu od električnih sila. Kvantna stanja bioloških makromolekula su na prvom mestu odgovorna za konformacione promene u materiji, što nam govori da će se promene stanja uzorka na molekularnom i ćelijskom nivou jasnije uočiti (otkriti) posmatrajući dejstva koja izazivaju posmatrajući magnetske sile u odnosu na električne sile [64,65].

U ovoj metodi svetlost se koristi kao merno sredstvo (sonda) kojim se ispituju osobine materijala iz razloga što je samo foton vidljive svetlosti dovoljno mali senzorski modalitet, kojime se može ostvariti garantovano dovoljna osetljivost i neinvazivnost interakcije sa materijom. Fundament spektroskopije, interakcija svetlost-materija, leži u Poinkarovoj sferi koja opisuje kako osobine difuzne svetlosti tako i polarizovane svetlosti i Blohove sfere za stanje slobodnih elektrona. Osnovni opseg OMIS-a je elektromagnetni spektar svetlosti talasnih dužina u opsegu od $\approx 400 - 800$ nm, što daje mogućnost dobijanja informacija o višim nivoima organizacije bioloških makromolekula [65,66].

5.1.2 Fizičke karakteristike OMIS-a

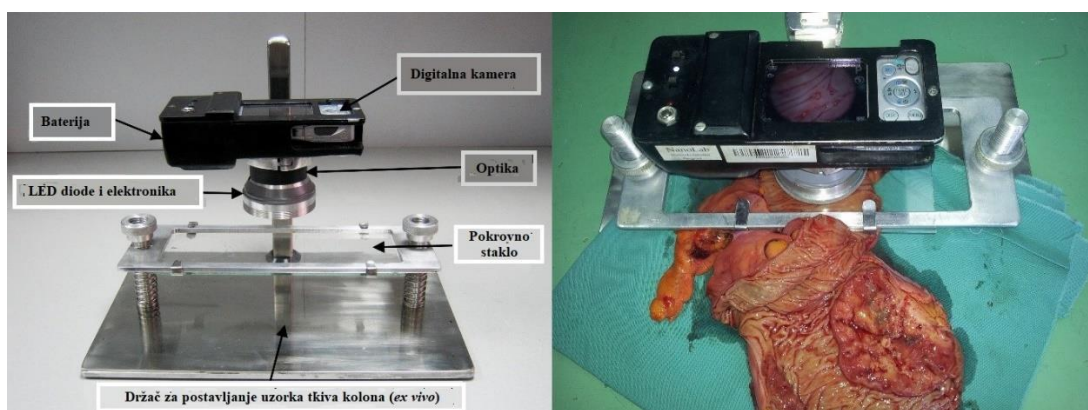
Svetlost kao elektromagnetni fenomen sastoji se iz električnog i magnetnog talasa uvek normalnih jedan u odnosu na drugi, a oni pod specifičnim uslovima mogu zauzimati različite orijentacije (ako je orijentacija proizvoljna onda se radi o *difuznoj svetlosti*, ako je uredjena linearno, onda može biti *vertikalno* ili *horizontalno* linearno polarizovana, ili ako je uređena kružno, onda može biti *cirkularno polarizovana*, sa levom i desnom orijentacijom). Polarizovano reflektovana svetlost nastaje kada upadna svetlost, pod određenim uglom, interaguje sa uzorkom. Ova zakonitost je definisana Poenkareovom sferom. Potrebna vrednost upadnog ugla pri kojoj se postiže ovaj efekat naziva se Brusterovim uglom. Kako svaka vrsta materije ima jedinstvenu vrednost Brusterovog ugla, polazna pretpostavka rada je da je moguće iskoristiti ovu specifičnost i karakterisati bilo koju materiju, odnosno tkivo, a samim tim i kolon. Zbog toga što je Brusterov ugao za vodu 53.1° , a voda čini oko 70% tkiva to je uzeto da je vrednost Brusterovog ugla za tkivo kolona 53° . Metoda OMIS-a detektuje paramagnetne i dijamagnetne osobine materije i koristi belu difuznu svetlost koja se najpre emituje normalno u odnosu na uzorak, a zatim ta ista svetlost se emituje pod Brusterovim uglom. Kada se od reflektovane difuzne svetlosti (RGB sistem boja i intenziteta 0-255) za svaki piksel, oduzme svetlost koja se reflektovala pod dejstvom upadne svetlosti (Brusterovim uglom) dobija se razlika intenziteta svetlosti po pikselima (0-255) koja nosi informaciju o sparenim (dijamagnetizam) i nesparenim (paramagnetizam) elektronima, a samim tim i o konformacionim stanjima tkiva (slika 5.1) [63-66].



Slika 5.1 Prikaz relativnih pozicija izvora svetlosti za belu difuznu (levo) i reflektovanu polarizovanu svetlost (desno). Stepenn polarizacije svetlosti je 95.4%, dok je razlika između uglova θ i $\theta_1 \pm 1:6^\circ$ (dvanaest belih LED dioda postavljeno je u dva kruga: šest-izvor difuzne svetlosti i šest izvor svetlosti pod Brusterovim uglom) [64-68].

5.1.3 Uređaj

Uređaj za opto-magnetnu imidžing spektroskopiju, koji je korišćen u ovom istraživanju, sastoji se od kućišta koje povezuje digitalnu kameru (Canon digital camera model IXUS 105, 12.1 MP), sistem za osvetljavanje uzorka i držač uzorka. Sistem za osvetljavanje uzorka sastoji se od dvanaest LED dioda poređanih u dva kruga i postavljenih ispred objektiva kamere tako da obezbeđuju osvetljavanje uzorka belim difuznim svetlom (šest dioda) i belim difuznim svetlom pod Brusterovim uglom (šest dioda). Vidno polje za snimanje je kružnog oblika, prečnika 25 mm. Korišćene LED diode su LL-304WC4B-W2-3PD sa pratećim tehničkim karakteristikama: prečnik 3mm, hladno bele boje, emisiona boja $X=0.28$, $Y=0.29$, svetlost 9000mcd, ugao gledanja 20° , prednji: konveksni, providno sočivo, 20mA sa visokom efikasnošću i pouzdanošću. Držač uzorka dizajniran je posebno za tkivo, a takođe postoji i za mikroskopske pločice (slika 5.2) [65].



Slika 5.2. NL-B53 sa Canon digitalnom kamerom, model IXUS 105, 12.1 MPix. (levo), i položaj ispitivanog uzorka tkiva i OMIS aparata (desno) [65]

Procedura snimanja uzorka OMIS metodom sastoji se iz sledećih koraka:

1. Uzorak tkiva se postavlja na držač i pritiska antirefleksnim staklom kako bi se postiglo stanje najbliže vakumu između uzorka i stakla. Zatim se uređaj spušta na antirefleksno staklo. Udaljenost između uzorka i uređaja je 2mm (debljina stakla). Ukoliko je uzorak na mikroskopskoj pločici procedura je ista, uzorak se postavlja na držač u specijalno izrađenom kućištu kako ne bi bilo uticaja spoljašnjih faktora. Zatim se uzorak prvo obasjava belom difuznom svetlošću, pri čemu je pravac

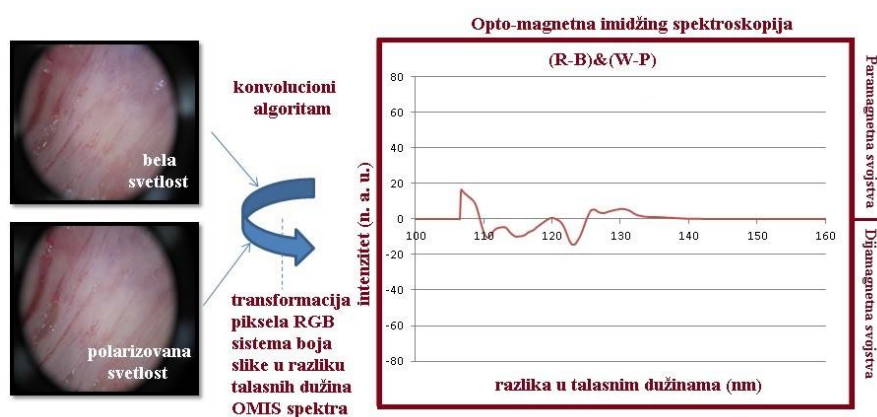
upadne svetlosti na površinu uzorka i meri se reflektansa koja je upravna na uzorak, odnosno snima se prva digitalna slika uzorka.

2. Uzorak tkiva se zatim obasjava belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom i snima se druga digitalna slika uzorka na bazi reflektovane svetlosti koja je polarizovana.

Ovaj postupak se za biološke uzorke, zbog paramagnetne/dijamagnetne dinamike vode u biološkim tkivima, ponavlja 20 puta: 10 puta se snima odziv obasjavanja uzorka belom difuznom svetlošću pod pravim uglom i 10 puta se snima odziv obasjavanja uzorka belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom.

3. Nakon što su uzorci snimljeni, digitalne slike uzoraka se obrađuju u tri faze. U prvoj fazi, zona od interesa je isečena/kropovana sa originalne slike na osnovu ekspertskeg mišljenja hirurga. Druga faza podrazumeva konvoluciju spektara u domenu plavog i crvenog kanala, izračunavanje razlike između odziva uzorka obasjanog belom difuznom i polarizovanom svetlošću. U poslednjoj, trećoj fazi, analiza spektara se vrši klasifikacijom uzoraka na osnovu njihovih intenziteta i razlika talasnih dužina.

Digitalne slike uzoraka obrađuju se pomoću algoritma razvijenog u MATLAB® 2013a (MathWorks, USA). Algoritam za spektralnu konvoluciju prilagođen je potrebama OMIS metode i zasniva se na dijagramu hromatičnosti nazvanom „Maksvelova potkovica“, odnosno na dvodimenzionalnom predstavljanju boja i na aproksimacijama tog dijagrama koje se koriste u digitalnoj fotografiji. Kao izlaz algoritam za spektralnu konvoluciju proizvodi Optomagnetne spektre uzoraka (slika 5.3).



Slika 5.3. Konvolucioni algoritam obrade digitalne slike i dobijanje opto-magnetnog spektra uzorka [67]

Optomagnetna imidžing spektroskopija koristi spektralnu raspodelu intenziteta u crvenom, zelenom i plavom delu spektra u RGB sistemu boja, s obzirom da je kamera prilagođena ljudskom oku (vizuelni sistem). Kao što je navedeno, algoritam za obradu slike zasnovan je na dijagramu hromatičnosti „Maksvelova potkovica“ i omogućava konverziju digitalne slike u optomagnetne spektre kroz nekoliko operacija, počevši od stvaranja histograma za svaki kanal svake boje i naknadne konverzije histograma u spektar. Par digitalnih slika dobijenih osvetljavanjem uzorka pod belom difuznom i polarizovanom svetlošću rezultiraće dobijanjem tri spektra za sva tri kanala, crveni, plavi i zeleni, za svaku sliku.

Spektri dobijeni pomoću OMIS se mogu kombinovati međusobno, pa s obzirom na to da se pojavljuje veliki broj mogućih kombinacija, konvolucioni spektri (convolution - smotan, zavijen), mogu izdvojiti različite osobine materijala – koje su na određen način povezane sa prostornom raspodelom elektrona, elektronskih orbitala, kao i intenzitetom veze (kovalentna, vodonična, jon-dipol i dr.). Oznaka (R-B)&(W-P) predstavlja operaciju konvolucije spektralne raspodele intenziteta u crvenom (R) i plavom (B) delu spektra odziva pri osvetljavanju belom difuznom svetlošću (W) i reflektovanom polarizovanom svetlošću (P).

Nakon što se uzorci snime Optomagnetnom imidžing spektroskopijom i dobiju se OMIS spektri, pristupa se analizi spektra i ekstrakciji karakterističnih veličina iz OMIS spektra. U te svrhe razvijen je algoritam u MATLAB-u koji pronalazi i računa ekstremume, razlike talasnih dužina na kojima se ekstremumi javljaju i površine ispod maksimuma i minimuma, a zatim upisuje te vrednosti u Excel tabelu.

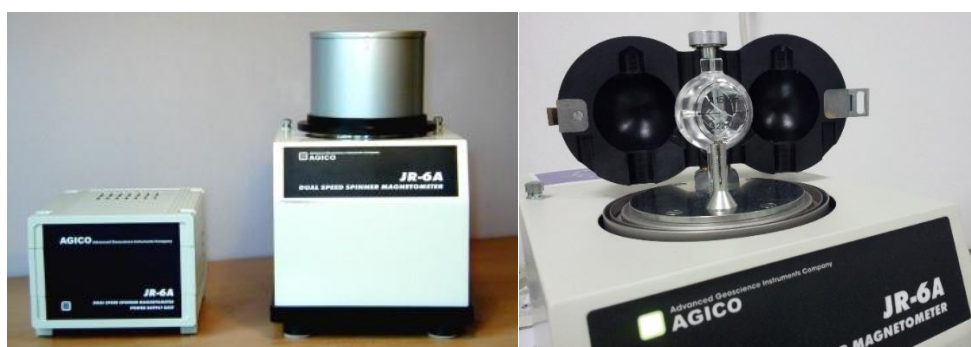
5.2 Spinner magnetometar JR-6A

Spinner magnetometrima se meri remanentna magnetizacija (RM) različitih uzoraka. Uglavnom se koristi za merenje magnetnih karakteristika stena, međutim uz odgovarajuću pripremu može se primeniti i za merenje RM kog drugih vrsta materijala. Remanentna magnetizacija je magnetizacija koja ostane unutar objekta kada se ukloni spoljašnje magnetno polje, drugim rečima ona predstavlja magnetnu memoriju. Prirodna remanentna magnetizacija nastaje kao posledica dejstva magnetnog polja zemlje na stene u toku njihovog formiranja kao i posledica promena tokom dugogodišnjeg postojanja usled izloženosti fizičkim i hemijskim faktorima. [69].

Materijali kao što su gvožđe, kobalt, nikel i njihove legure imaju permanentne magnetne momente koji su organizovani u male domene sa istim smerom, međutim zbog nasumične orijentacije tih domena ukupna magnetizacija je nula ili veoma mala. Pri dejstvu spoljašnjeg magnetnog polja na feromagnetike oni se trajno namagnetišu tako da ostaju namagnetisani i izvan polja odnosno poseduju remanentnu magnetizaciju. U literaturi ovakvi materijali su poznati kao feromagnetici i imaju histerezisna svojstva, što zapravo govori da magnetizacija ovih materijala zavisi od istorije primenjenog magnetnog polja [70].

Drugi tip remanentne magnetizacije, meren spinner magnetometrom, odnosi se na paramagnetne i dijamagnetne materijale. Na osnovu prethodnih istraživanja i pregleda literature rađena su istraživanja na zdravom i obolelom tkivu debelog creva [71].

Uređaj JR-6A (slika 5.4) kompanije Agico, Češka Republika, je dvobrzinski spinner magnetometar zasnovan na klasičnom dizajnu spinner magnetometra sa Helmholtcovim navojima. Instrument ima dva mikroprocesora koji kontrolišu brzinu rotacije uzorka, pojačanje signala, akviziciju i obradu podataka, digitalno filtriranje i kontrolišu autopozicioniranje manipulatora. Magnetometar je povezan sa računarom putem RS232C protokola preko kojeg se kontrolišu sve funkcije uređaja [72]. Spinner magnetometar meri ukupnu remanentnu magnetizaciju koja predstavlja sumu komponenti vektora RM u tri ortogonalna pravca, jačina magnetizacije su reda veličine $10^{-6} [Am^{-1}]$ za slabo namagnetisane sedimente do $10^2 [Am^{-1}]$ [69].



Slika 5.4. Spinner magnetometar JR – 6A (proizvođač: AGICO, Češka Republika)

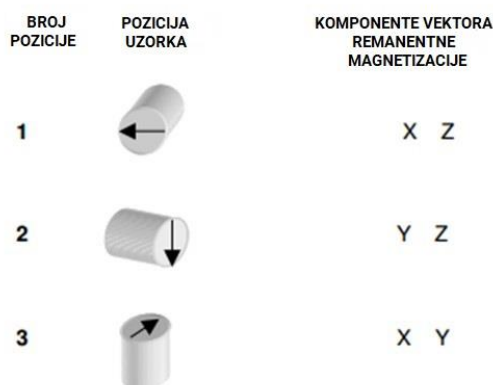
JR-6A spinner magnetometar poseduje automatski držač uzorka pomoću kojeg se omogućava automatsko merenje svake pojedinačne komponente RM vektora. Primenom manje brzine rotacije povećava mogućnost merenja krhkih i mekih uzoraka. Pre svakog merenja preporučuje se kalibracija koja se izvodi pomoću uzorka za kalibraciju. Kalibracioni uzorak dolazi u dva oblika i može biti u vidu kocke stranice 20 mm ili cilindra prečnika 25,4 mm i dužine 22 mm. Kod oba kalibraciona

uzorka jedna strana je uvek obeležena sa strelicom čime se određuje njihova orijentacija u odnosu na koordinatni sistem uređaja. Komponente RM vektora se na osnovu dobijenih signala izračunavaju uz pomoć Furijeove analize koja je implementirana u okviru programskog paketa.

5.2.1 Principi rada

Princip rada spinner magnetometra je zasnovan na zakonu elektromagnetne indukcije koji je formulisao Majkl Faradej još 1831. godine. Po ovom principu namagnetisani uzorak koji se kreće/rotira u blizini provodnika (kalema) stvara promenljivo magnetno polje koje indukuje električnu struju u samom uzorku. U slučaju spinner magnetometra uzorak je fiksiran i rotira konstantnom ugaonom brzinom unutar jako osetljivih kalemova koji su izolovani od dejstva spoljašnjeg magnetnog polja. Usled postojanja remanentne magnetizacije u uzorku i usled kretanja/rotacije uzorka, stvara se promenljivo magnetno polje koje indukuje struju u kalemovima srazmerno intezitetu RM. Kroz procese kalibracije eliminisane su moguće nepreciznosti merenja usled RM nosača. Kod nestandardnih nosača i pri merenju slabih uzoraka moguće je uraditi korekciju vrednosti za veličinu RM nosača tako što se on izmeri samostalno i komponente njegovog vektora RM se oduzmu od komponenti koje su izmerene kod sistema uzorak-nosač.

Standardno merenje RM vektora se sastoji iz uzastopnih merenja u najmanje četiri pozicije uzorka i držača. Ovakav tip merenja daje četiri vrednosti z komponente RM vektora i dve vrednosti x i y komponente na osnovu kojih se dobija konačna vrednost kao srednja vrednost svih merenih komponenti. Kod ovakvog načina merenja eliminiše se neželjena vrednost nosača uzorka kao i greške koje mogu nastati kao posledica nepravilnog oblika uzorka i šuma instrumenta. Prednost ovog metoda je u tome što eliminiše vrednost RM i ako korekcija držača nije urađena. Ova eliminacija RM nosača je moguća ako se merenje izvrši u četiri ili šest pozicija, dok je suprotno kada se upotrebljavaju manje od 4 pozicije i tada je obavezno da se izvrši korekcija za vrednost RM nosača.



Slika 5.5. Položaji automatskog držača za cilindrični uzorak [72]

Model JR-6A omogućava automatsko merenje pri čemu se uzorak fiksira samo jednom unutar nosača, a pozicije se menjaju automatski. U toku menjanja pozicije uzorak nije izložen spoljašnjem magnetnom polju i neprekidno ostaje zatvoren unutar trostrukog zaštitnog poklopca od legure nikla i gvožđa. Automatski nosač se sastoji od spoljašnje sferične ljuske i rotirajućeg unutrašnjeg sferičnog jezgra u kojem se fiksira uzorak. Pri promeni položaja uzorka vrši se rotacije oko zamišljene dijagonale kocke što omogućava postavljanje uzorka u 3 položaja u kojima je moguće izmeriti sve 3 komponente (x,y,z) vektora magnetnog polja. Primenom ovakvog automatskog pozicioniranja uzorka u 3 položaja nije moguće pronaći kombinaciju pozicija koje bi eliminisale vrednost RM nosača. Druga posledica ovakvog pozicioniranja je potpuno oslanjanje na korekciju koju instrument napravi što unosi dodatnu nesigurnost u rezultat merenja. Ovaj slučaj je posebno izražen kod mekih i krhkih uzoraka kada usled pomeranja nečistoća unutar uzorka mogu da se dobiju rezultate sa velikom greškom. Uzorci čije dimenzije odstupaju od nominalnih mogu da prouzrokuju velike vibracije usled

disbalansa pa se ne preporučuje njihovo merenje upotrebom automatskog držača. JR-6A meri vrednosti u opsegu od 0 do 12500 [A/m] sa osetljivošću od 2,4 [$\mu\text{A}/\text{m}$] i mernom nesigurnošću 1%.

Za merenje se mogu koristiti dve brzine rotacije, viša i niža, (87,7 [s^{-1}] ili 16,7 [s^{-1}]). Sa većom brzinom se postiže maksimalna senzitivnost uređaja, dok se sa nižom brzinom rotacije omogućava merenje vode, rastvor, mekih i krhkih uzoraka, kao i uzoraka nepravdinog oblika. Osetljivost uređaja pri velikoj brzini merenja iznosi $2,4 \times 10^{-6}$ [A/m] sa vremenom integracije od 10 [s], dok kod merenja manjom sa brzinom senzitivnost iznosi $1,0 \times 10^{-5}$ [A/m].

Spinner magnetometar Agico JR-6A se u potpunosti kontroliše pomoću softvera Rema6W. Rema6W omogućava merenje vektora RM pomoću automatskog, poluautomatskog ili manuelnog moda, a dobijeni podaci se čuvaju u ASCII tekstualnom obliku kome se može lako pristupiti.

Tabela 5.1. Prosečna vrednost remanentnog maganetizama vode (česmovače) na bazi 10 merenja, meren kao razlika [A/m] pre i posle tretmana magnetnim poljem jačine 0.25 [mT] u trajanju od 10 minuta.

TEČNOST (Voda - Česmovača)		
	Pre tretmana	Pre tretmana
10^{-6} [A/m]	18.67	18.67
Razlika	-4.35	
(-Δ)	-4.35±0.24	
Makisimalna razlika	-4.59	
Minimalna razlika	-4.11	

Tabela 5.2. Prosečna vrednost remanentnog maganetizama čvrstog materijala (polimera PMMA) na bazi 5 merenja, meren kao razlika [A/m] pre i posle tretmana magnetnim poljem jačine 0.25 [mT] u trajanju od 10 minuta.

ČVRST MATERIJAL (Polimerni materijal PMMA)		
	Pre tretmana	Pre tretmana
10^{-6} [A/m]	2417.28	2417.28
Razlika	+ 8.58	
(-Δ)	+8.58 ±0.24	
Makisimalna razlika	+8.82	
Minimalna razlika	+8.34	

Da bi osobine tkiva, koje je 45-65% tečno (vodeni rastvor) i 35-55% čvrsto (polimerne strukture), mogli da izračunavamo sa biomehaničkog aspekta neopodno je naći veze između zakonitosti Njutnovskih fluida sa Hukovim zakonom. Kao što je dobro poznato odnos normalnog napona σ i relativne promene dužine (istezanje ili sabijanje) ε čvrstog elastičnog polimernog tela u vremenu t se može iskazati Hukovim zakonom:

$$\sigma(t) = E\varepsilon(t) \quad [5.1]$$

gde E predstavlja moduo elastičnosti tela. Kada su u pitanju Njutnovski fluidi tada zakonitost odnosa napona, relativne promene dužine su u odnosu

$$\sigma(t) = \eta \, d\varepsilon/dt, \quad [5.2]$$

gde je sa η označen koeficijent viskoznosti fluida.

Ove jednačine su matematički modeli idealnih čvrstih materijala i fluida kojih u prirodi skoro da nema. U realnosti većina materijala poseduje oba svojstva i elastičnih tela i fluida, pa zato kažemo da se nalaze u stanju između idealno tečnog (koje možemo obeležiti sa “0”) i idealno čvrstog stanja koje možemo obeležiti sa “1”. Zbog toga se Hukovi (elastični) i Njutnovi (viskozni) elementi kombinuju u jednu jednačinu koja odražava oba svojstva, i to na dva načina: kao da su tečna i čvrsta faza slojevito razdvojene (u mnogo serijskih slojeva: čvrsto-tečno-čvrsto-tečno-čvrsto) i paralelno (mešavina čvrsto/tečno, povezano jakim vodoničim vezama ili jon-jon i jon-dipol vezama).

Ako kombinujemo Hukov/Njutnovske zakonitosti slojevito (serijski) tada dobijamo vezu Maksvelovog modela viskoelastičnosti u obliku

$$\frac{d\varepsilon}{dt} = \frac{1}{E} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta} \quad [5.3]$$

za koji imamo da ako je $\sigma = const$ tada sledi da je i $d\varepsilon/dt = const.$, što znači da ako je napon konstantan deformisanje je beskonačno, što ne odgovara stvarnoj situaciji. Međutim, ako je material povezan jakim vodoničim vezama ili jon-jon i jon-dipol vezama tada dobijamo Voigtov model:

$$\sigma = E\varepsilon + \eta \frac{d\varepsilon}{dt} \quad [5.4]$$

koji opet dovodi da ako je $\varepsilon = const$ da je i $\sigma = const$, što ne odražava prirodno stanje stvari, tj. nije u saglasnosti sa eksperimentalnim podacima.

U cilju prevazilaženja navedenih nedostataka razmotrimo Kelvinov model viscoelastičnosti, koji se dobija serijskom vezom Voigtovog viskoelastičnog i Hukovog elastičnog elementa u obliku:

$$\frac{d\sigma}{dt} + \frac{E_1 + E_2}{\eta} \sigma = E_1 \left(\frac{d\varepsilon}{dt} + \frac{E_2}{\eta} \varepsilon \right) \quad [5.5]$$

kao i Zenerov model viskoelastičnosti, koji se dobija paralelnom vezom Maksvelovog viskoelastičnog i Hukovog elastičnog elementa:

$$\frac{d\sigma}{dt} + \frac{E_2}{\eta} \sigma = (E_1 + E_2) \frac{d\varepsilon}{dt} + \frac{E_1 E_2}{\eta} \varepsilon \quad [5.6]$$

Kao što se može uočiti u oba sistema imamo po dva Hukova elementa sa modulima elasičnosti E_1 i E_2 i jedan viskoelastični element sa koeficijentom viskoznosti η . Ovi modeli daju dobar kvalitativni opis svojstava materijala, ali sa kvantitativne tačke gledišta u eksperimentima se nisu pokazali dovoljno dobrim [74]. Polazeći od ovih osnovnih zakona deformisanja viskoelastičnih materijala, dobijaju se komplikovane diferencijalne jednačine višeg reda koje nisu pogodne za upotrebu. Ali, ako pažljivije analiziramo Hukovu jednačinu [$\sigma(t) = E\varepsilon(t)$] možemo primetiti da je napon upravo srazmeran relativnoj promeni dužine čvrstog tela, tačnije, proporcionalan je *nultom izvodu* funkcije promene dužine čvrstog tela, dok kod tečnosti [$\sigma(t) = \eta \, d\varepsilon/dt$] imamo da je proporcionalan *prvom izvodu*. Na osnovu ovih uvida logično se nameće pretpostavka da u slučaju materijala sa ”tečno-čvrsto”, odnos napona i promene dužine možemo izraziti korišćenjem ”među-izvoda” (nultog i prvog), pa možemo napisati

$$\sigma(t) = E_0 D_t^\alpha \varepsilon(t), \quad 0 < \alpha < 1, \quad [5.7]$$

gde su E_0 i α konstante, pri čemu će α biti vrednost *frakcionog izvoda* koji će kod različitih viskoelastičnih materijala biti različit [75].

Frakcioni izvodi su oblast matematičke analize koja je započeta još krajem XVII veka kada su Njutn i Lajbnic postavljali osnove diferencijalnog i integralnog računa. Tačnije rečeno “iskra” frakcionog računa se pojavila kada je Lopital 1697. godine postavio pitanje Lajbnicu koje je značenje izvoda ako on nije celobrojna vrednost, nego naprimer $\frac{1}{2}$ ($n=1/2$)?. Mnogi danas smatraju da je ovom rečenicom rođen frakcioni račun. Ova ideja privukla je pažnju mnogih matematičara i naučnika tog doba, kao što su Liuvil, Riman, Ojler, Abel i drugi. Međutim sve do kraja 80’ godina prošlog veka, kada su otkrivene fizičke manifestacije koje se mogu mnogo bolje objasniti frakcionim računom nego drugim matematičkim analizama, ovaj metod je dobio na svom značaju [75]. Matematički modeli zasnovani na frakcionim diferencijalnim jednačinama su se pokazali veoma korisnim u mehanici, biohemiji, medicini, finansijama, teoriji verovatnoće i drugim oblastima nauke uključujući psihologiju za modeliranje ponašanja ljudi. Funkcija tipa:

$$D^\alpha f(x) = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dx} \int_0^x \frac{f(t)}{(x-t)^\alpha} dt \quad [5.8]$$

je dobila na značaju u modeliranju pojava iz svakodnevnog života, a još više kada se uvidelo da se ovom matematičkom analizom mogu opisati difuzioni procesi i viskoelastična svojstva materijala. Kako je $0 < \alpha < 1$, to se ovim matematičkim modelom mogu opisati kako granična stanja materijala (tečno i čvrsto) tako i međustanja materijala (viskoelastična). Međutim, ispostavilo se da postoje i nedostaci pri modeliranju nekih realnih problema u mehanici i teoriji viskoelastičnosti. Zato je uveden malo drugačiji pristup kod frakcionog računa (Kapurtovi izvodi). Na bazi ovog modifikovanog prilaza razvijeno je nekoliko frakcionih modela koji se sa uspehom koriste u biofizici, biohemiji i medicini [73]. U ovom radu za biomehaniku tkiva koristićemo frakcioni model parametarskog tipa “ $0 < \alpha < 1$ ”, pri čemu je “0” patološko stanje tkiva, a “1” zdravo tkivo. Imajući u vidu da je polimer biološko tkivo jedna vrsta tečnog kristala (polimeri su u biološkoj tečnosti uređeni slično kristalnim ćelijama čvrstog stanja) to između mehaničkih (deformacija strukture i napona), toplotnih (temperature), električnomagnetnih (električnog i magnetnog polja, kao i njihovih indukcija, odnosno zaostalih remanentnih vrednosti) i entropijskih vrednosti postoji međusobna povezanost [76,77]. Savremena istraživanja pokazala su da su magnetne osobine materijala u direktnoj vezi ne samo sa mehaničkim osobinama biopolimera već i sa hemiskim procesima [78]. Pored toga sva tkiva se nalaze pod uticajem zemljinog magnetnog polja (47.000 [nT]) koje kontinualno u okolini paramagnetnih biomolekula povećava magnetizam, a kod dijamagnetnih smanjuje. Kada zdravo ili bolesno tkivo stavimo u uređaj (spiner magnetometar) koji meri remanentnu magnetizaciju (zaostali magnetizam u tkivu) tada će se na bazi *rotacionog viskoznog koeficijenta* (γ_i) dobiti viskoelastične osobine tkiva kao “ $+\Delta$ ” i “ $-\Delta$ ” vrednosti od ravnotežnog frakcionog izvoda α (koji je između 0 i 1). Kako su dobijene vrednosti razlike zdravo/bolesno kod remanentnog magnetizma normalizivane (između 0 i 1) to je za zdravo tkivo

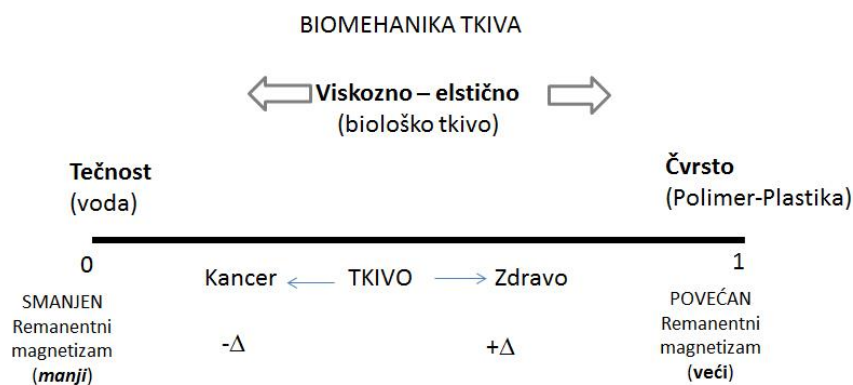
$$D_t^\alpha = D_{+\Delta} = (E_0 + \Delta E) \frac{\varepsilon(t)}{\sigma(t)} \quad [5.9]$$

a za bolesno tkivo

$$D_t^\alpha = D_{-\Delta} = (E_0 - \Delta E) \frac{\varepsilon(t)}{\sigma(t)} \quad [5.10]$$

pri čemu je E_0 –moduo elastičnosti ravnotežnog stanja tkiva, $E_0 + \Delta E_i = E_{zdravo}$, $E_0 - \Delta E_j = E_{bolesno}$, $\varepsilon(t)$ – promena dužine u vremenu i $\sigma(t)$ – promene napona u vremenu ($\sigma(t) = \eta d\varepsilon/dt$).

Kako je ceo problem sveden na parametarsku analizu na osnovu “ $+\Delta$ ” i “ $-\Delta$ ” možemo izvršiti klasifikaciju tkiva: zdravo/bolesno.



Slika 5.6. Model biomehanike tkiva na bazi ocene parametarskog frakcionog dinamičkog modela i remanentne magnetizacije, odnosno smanjena (-Δ) i povećanja (+Δ) remanentne magnetizacije. Kako je remanentna magnetizacija vode (viskozno stanje) $-\Delta = -4.35 \pm 0.24$, a čvrsto (elastično) $+\Delta = +8.34$, to kada kod tkiva imamo smanjenje remanentne magnetizacije (ide ka povećanom viskoznom stanju, višak vode) tada takav poremećaj vodi kancerogenom stanju, jer karcinom ima više vode za oko 21% [79].

5.3 Mašinsko učenje i veštačka inteligencija

Među prvim mašinama i uređajima koje je čovek osmislio i napravio našle su se jednostavne alatke da bi olakšao i ubrzao svoj svakodnevni fizički rad (npr., čekić, nož, i dr.). Daljim razvojem civilizacije usledio je razvoj sve složenijih mašina koje je čovek redovno koristio u skoro svim oblastima svoje fizičke delatnosti. Te mašine i uređaji postajali su sve složeniji da su u potpunosti uspele da zamene rad fizički čoveka u određenim oblastima (prva tehnološka revolucija: zamena ljudskog fizičkog rutinskog rada mašinskim). Zatim je nastao razvoj mašina koje su zamenile rutinski ljudski mentalni rad (računari) i svodio se na to da su procedure za izvršenje nekog zadatka bile u potpunosti definisane od strane čoveka koji su u potpunosti sagledali sve situacije koje se mogu dogoditi u toku rada mašine (druga tehnološka revolucija). Napretkom računarskih tehnologija poslednjih 60 godina stvorene su mogućnosti za razvoj „Veštačke inteligencije“ koja predstavlja početak treće tehnološke revolucije [80]. Veštačka inteligencija (Artificial intelligence) se definiše kao oblast računarskih nauka koja proučava aktivnosti u kojima „inteligentni agenti“ (intelligent agents), predstavljaju uređaje i mašine koji „maksimizuju“ svoje šanse za uspeh na osnovu proučavanja okoline u kojoj se nalaze [80,81].

Pod pojmom mašinsko učenje podrazumevaju se algoritmi i programi koji mogu da „nauče“ i spoznaju zakonitosti nekog procesa na osnovu podataka koji ga opisuju [80,81]. Sa stanovišta računarskih nauka mašinsko učenje omogućava računarima da uče, a da pritom nisu eksplicitno programirani. Mašinsko učenje se primenjuje u slučajevima gde nije moguće jednostavno dizajnirati konkretne algoritme sa dobrim performansama npr. filtriranje e-mail-ova, prepoznavanje karaktera i td. Ovakvi algoritmi donose odluke i prave predikcije na osnovu modela koji su određeni strukturom podataka koji se proučavaju. Posebna oblast mašinskog učenja koja se u poslednjih nekoliko godina i izdvojila kao zasebna oblast kojoj se posvećuje sve više pažnje zahvaljujući rezultatima i potencijalu primenjenih algoritama je „dubinsko učenje“ (Deep learning). Dubinsko učenje je oblast mašinskog učenja gde se proučavaju veštačke neuronske mreže i slični algoritmi koji poseduju proučavane osobine skrivenog i dubinskog u problemu koji trebamo rešiti. Neuronske mreže koje se primenjuju u dubinskom učenju imaju strukturu koja se sastoji od velikog broja skrivenih slojeva gde se u svakom sloju nalazi veliki broj nelinearnih procesirajućih jedinica (veštačkih neurona). Metodologija učenja koja se primenjuje u algoritmima mašinskog učenja može se podeliti na: nadgledano učenje (supervised learning), nenadgledano učenje (unsupervised learning), polu-nadgledano (semisupervised learning) i podpomognuto učenje (reinforcement learning).

U oblasti analize podataka metode mašinskog učenja se koriste se za razvoj složenih modela i algoritama za predviđanje pouzdanih i ponovljivih rezultata.



Slika 5.7. Odnos veštačke inteligencije, mašinskog učenja i dubinskog učenja.

<https://medium.com/swlh/artificial-intelligence-machine-learning-and-deep-learning-whats-the-real-difference-94fe7e528097>

Mašinsko učenje se pokazalo kao jedna od korisnih metoda za analizu rezultata dobijenih pomoću Optomagnetne imidžing spektroskopije (OMIS), što potvrđuju radovi izloženi u doktorskoj disertaciji „Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije“ [82], kao i rezultati izloženi u knjizi Nanomedicina u poglavlju izdatoj od „One Central Press“ [49].

Rezultati dobijeni pomoću OMIS metode predstavljeni su dijagramima, gde je svaki dijagram definisan sa 256 različitih vrednosti razlike talasnih dužina. Analizirajući dijagrame u velikom broju slučajeva je moguće primetiti jasnu razliku između različitih vrsta uzoraka međutim, u slučajevima gde postoji mnogo veličina koje opisuju jedan fenomen (slučaj OMIS diagrama, gde su razlike talasnih dužina vrednosti vezane za svaki snimljeni uzorak), određivanje i prepoznavanje jasnih zakonitosti koje određuju tip uzorka može biti veoma složen proces gde procedure mašinskog učenja, zahvaljujući mogućnosti da uči na osnovu dostupnih podataka, pokazuje jasne prednosti u odnosu na klasične analize.

Na osnovu strukture podataka i primenjenih algoritama mašinskog učenja iz literature izabrani su „Naive Bayes“, „Random Forest“ i Neuronske mreže za analizu i obradu podataka.

5.3.1 Naïve Bayes klasifikator

Naïve bayes je jednostavan, ima dobre performanse i veoma robustan klasifikator koji se može brzo obući čak i za velike skupove podataka. Jedna od osnovnih pretpostavki kada se primenjuje ovaj klasifikator je da su promenljive koje se analiziraju međusobno nezavisne (da promena jedne ne utiče na promenu druge). Međutim, u praksi se pokazalo da kršenje ove pretpostavke ne uzrokuje velike posledice po performanse samog klasifikatora što su pokazali i P. Domingos & M. Pazzani 1997 [83].

Klasifikator je baziran na Bajesovoj teoremi pomoću koje se izračunava uslovna verovatnoća da će se neki događaj desiti ako nam je poznata verovatnoća da se neki događaj, koji mu je prethodio, već desio. Npr. ako je danas oblačno mnogo je veća verovatnoća da će sutra padati kiša nego da je danas sunčano. U ovom primeru „padanje kiše sutradan“ je hipoteza čiju verovatnoću pokušavamo odrediti na osnovu poznavanja trenutnih vremenskih prilika (detaljnije o uslovnoj verovatnoći pogledati u prilogu 1). Bajesova teorema glasi:

$$P_r[Y = C_l | X] = \frac{P_r[Y] P_r[X | Y = C_l]}{P_r[X]} \quad [5.11]$$

gde je: $P_r[Y = C_l | X]$ - verovatnoća da Y pripada klasi C_l za novo X (u slučaju OMIS diagrama klase mogu biti bolesno i zdravo dok je X skup vrednosti po talasnim dužinama),

$P_r[Y]$ - verovatnoća događaja koji posmatramo, bazirana na onome što znamo o problemu koji pokušavamo da klasifikujemo tj. verovatnoća da je uzorak zdrav ili bolestan bez ikakvih uslova. Na primer za probleme koji se odnose na procenu bolesti, ova verovatnoća odgovara broju slučaja kancera u odnosu na ukupnu populaciju koju posmatramo.

$P_r[X | Y = C_l]$ - je uslovna verovatnoća, predviđa da li se određeni događaj desio ako je hipoteza tačna (koja je verovatnoća da postoji X ako Y pripada klasi).

$P_r[X]$ - ova verovatnoća predstavlja verovatnoću da se desio neki događaj ako se posmatraju svi mogući uslovi koji mogu da dovedu do tog događaja. Međutim, važno je naglasiti da ovaj član ne utiče na ishod događaja jer predstavlja normalizujuću konstantu [84, 85].

5.3.2 Klasifikaciona stabla i „Random forest“

Klasifikaciona stabla su algoritmi čija se metodologija odlučivanja zasniva na strukturi stabala i pri čemu dolazi do grananja polaznih podataka u različitim „pravicima“ u zavisnosti kako ispunjavaju postavljene uslove. Drugim rečima, modeli klasifikacionih stabala zasnivaju se na ako-onda (if-then) iskazima pomoću kojih se podaci dele u željene grupe, npr. visoki ljudi su viši od 190cm, a niski su niži. Ovako prostom analizom podaci se mogu klasifikovati u različite grupe.

Ideja stabala odlučivanja je da se podaci na osnovu njihovih karakteristika podele u manje homogene grupe, u pogledu klasa u koje želimo da svrstamo podatke. Da bi se postigla homogenost grupa potrebno je izvršiti podelu ulaznih podataka na takav način da se izvrši optimizacija po nekom od kriterijuma kao što su tačnost izlaznog klasifikatora, Gini index i „cross“ entropija. Na primer, stablo odlučivanja pretražuje sve vrednosti datih podataka pri čemu određuje granicu podele na dve grupe na takav način da se postigne najveća tačnost klasifikacije za podelu u datom čvoru. Ovaj proces podele atributa na manje homogene grupe se nastavlja sve dok se ne zadovolji jedan od uslova: maksimalna veličina stabla ili minimalni broj uzoraka u čvoru [84].

5.3.3 „Random forest“ i Skupovi stabala (bagged trees – bag of trees)

Osnovna ideja „Random forest“ tehnike je da se na osnovu skupa polaznih podataka formira mnogo različitih stabala odlučivanja na posebno određenim skupovima sa nasumično izabranim prediktorima (prediktor predstavlja karakteristiku nekog uzorka koji opisuje stanje tog uzorka) u svakom čvoru odlučivanja. Tehnika kojom se podaci uzorkuju u nove skupove u literaturi se naziva „Bootstrap“. U osnovi ove tehnike leži da se od polaznog skupa formiraju novi skupovi podataka na kojima će se trenirati izabrani klasifikator, pri čemu ti skupovi mogu da sadrže i uzorke koji se ponavljaju. Od ovako formiranih skupova podataka može se formirati skup klasifikatora (stabala odlučivanja) gde svaki klasifikator „glasa“ za konačni rezultat klasifikacije. Ova tehnika za određivanje rezultata klasifikacije i formiranje klasifikacionog modela u literaturi se naziva „Bagging“. Primenjujući „Bagging“ tehniku značajno se može smanjiti varijansa koja se javlja kod stabala čime se povećava sposobnost klasifikatora da ispravno klasifikuje nove podatke.

„Random forest“ u osnovi se sastoji od „Bagging“ tehnike, pri čemu se za grananje stabala ne koriste sve karakteristike podataka već se nasumično bira nekoliko njih u svakom čvoru odlučivanja, što dovodi do smanjivanja korelacije između stabala, a samim tim i do poboljšanja klasifikacije podataka [84].

5.3.4 „DEEP LEARNING“ – Dubinsko učenje – Neuronske mreže

U različitim oblastima tehnike javila se potreba za analizom veoma složenih procesa koji su na prvi pogled veoma jednostavni i trivijalni, međutim detaljnijom analizom postaje jasno da je skoro nemoguće opisati ili predvideti sve postupke koji se javljaju unutar analiziranog procesa ili pojave. Primer ovakvog procesa je sposobnost čoveka da prepozna različita lica drugih ljudi na osnovu fotografija. U ovom primeru se postavlja pitanje koje su to karakteristike koje definišu različite oblike ljudskih lica, odnosno kako opisati i kvantifikovati parametre da se sa sigurnošću može odrediti razlika između svakog ljudskog lica. Ovakav problem iziskuje pre svega definisanje svih karakterističnih parametara koji opisuju razliku između dva lica, a zatim određivanje svih tih definisanih parametara na osnovu fotografije. U ovakvom pristupu najlakše je poći od stvarnih fizičkih veličina koje definišu određene geometrijske karakteristike lica, a zatim njihovo određivanje na fotografijama. Kao što se može videti iz svega navedenog da bi se odredila tačna empirijska razlika između dva lica neophodno je da se izvrši složena analiza velike količine podataka. Postavlja se pitanje na koji način je moguće da ljudski mozak ovako složen problem veoma jednostavno rešava. Sličan primer je i sa bilo kojom drugom vrstom obrade podataka uključujući i naš problem koji treba da rešimo ovom disetracijom: interakcija mnoštva fotona vidljive svetlosti, različitih talasnih dužina od 400-800 nm, i njihova interakcija sa tkivom, odnosno sparenim i nesporenim elektronima. Pomoću veštačkih neuronskih mreža se uspešno mogu rešiti mnogobrojni problemi u tehnici bez poznavanja svih fizičkih interakcija između delova sistema, već je dovoljno poznavati samo odziv sistema na definisane pobude, drugim rečima Artificial Neural Networks - ANN omogućavaju analizu sistema i procesa bez potreba za poznavanjem svih fizičkih zakonitosti koje upravljaju njihovim ponašanjem [86]. Oblast Mašinskog učenja koja se bavi proučavanjem i primenom neuronskih mreža za razne probleme u literaturi se naziva dubinsko učenje (Deep learning) [80].

Veštačke neuronske mreže razvijene su po ugledu na fiziološko ponašanje ljudskog mozga i anatomije neurona kao osnovne jedinice nervnog sistema čoveka. Prema uprošćenom fizičkom modelu neuron se sastoji od dendrita, tela ćelije i aksona. Dendriti, njih oko 10.000, prikupljaju podatke iz okoline, odnosno sa aksona nervnih ćelija koje prethode posmatranoj nervnoj ćeliji, i sprovode ih do nervne ćelije. Nervna ćelija će postati aktivna ako ulazi sa dendrita pređu određeni prag aktivacije neurona. Kada se nervna ćelija aktivira ona svoj signal šalje aksonom do drugih neurona koji se u redosledu povezivanja nalaze posle nje. Aksoni neurona su pomoću sinapsi povezani sa dendritima ostalih nervnih ćelija. U sinapsama se pomoću složenih hemijskih procesa aktivacioni signali sa aksona nervnih ćelija prenose na dendrite ostalih nervnih ćelija, a hemijskim procesima u sinapsama se reguliše koliko svaki pojedinačni signal doprinosi ukupnom signalu potrebnom da se neuron aktivira [86].

Višeslojna perceptronska neuronska (Multi Layer Perceptron - MLP) mreža je veštačka neuronska mreža (ANN) koja omogućava prenos signala u pravcu samo napred, tj. od ulaznog do izlaznog neurona. Često se koristi u prepoznavanju uzoraka. Ovaj tip neuronske mreže ima više slojeva čvorova (neurona) koji su u potpunosti povezani sa čvorovima na sledećem sloju. Svaki MLP sadrži najmanje tri sloja, prvi je ulazni sloj, drugi je skriveni sloj, a poslednji je izlazni sloj. Slično ljudskom mozgu, neuroni u neuronskoj mreži prihvataju ulazni signal, procesiraju ga i šalju izlazni signal. Tako se neuroni sastoje od tri komponente: ulaznog signala, funkcije aktivacije i izlaza. Ulaz u neuron je signal koji neuron dobija od okoline ili sa prethodnog neurona, zatim se taj signal transformiše pomoću težinskog koeficijenta nakon čega se sumira sa svim ostalim ulazima, a izlaz je signal koji ide na sledeće susedne čvorove, a dobijen je kada se suma svih ulaza propusti kroz aktivacionu funkciju neurona. U početku su faktori težinski koeficijenti svake veze između dva neurona postavljeni kao male slučajne vrednosti, a zatim se ovi faktori ažuriraju u procesu učenja.

Proces učenja ANN koristi algoritam koji menja vezu između čvorova, na osnovu promene težinskih koeficijenata i na taj način se minimizuje odstupanje izlaza od poznatih vrednosti. Obično se ta razlika izražava srednjom kvadratnom greškom.

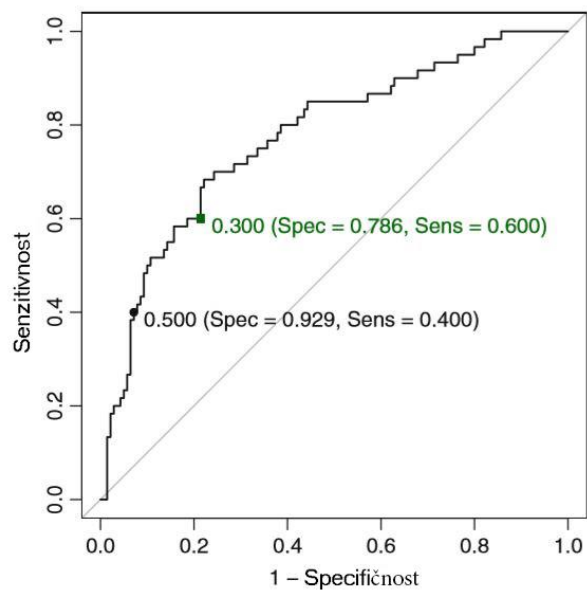
5.3.5 Algoritam sa povratim prostiranjem greške – „backpropagation“

Ovaj algoritam je jedan od najefikasnijih načina za obučavanje neuronskih mreža za veliki broj uzoraka. Ovom tehnikom se ne izračunavaju težinski koeficijent već se isključivo koristi za izračunavanje gradijenta funkcije cilja, a zatim se gradijentnim postupkom određuju vrednosti koeficijenata. Kod ovog algoritma je iskorišćen princip povratnog prostiranja greške gde greška jednog sloja neurona unutar mreže isključivo zavisi od rezultata koji su dobijeni u sloju nakon njega (videti prilog 1). Drugim rečima, grešku u preposlednjem sloju je moguće odrediti jedino na osnovu grešaka sa izlaza neuronske mreže odnosno na grešku u preposlednjem sloju utiču težinski koeficijent iz poslednjeg sloja, a zatim se na osnovu preposlednjeg sloja greška određuje u sloju pre njega i sve tako redom do ulaza u neuronsku mrežu. Primenom ovog postupka dosta se uprošćava određivanje gradijenta funkcije cilja gde se u slučaju primene osnovnog gradijentnog algoritma svi koeficijenti uzimali u obzir pri određivanju gradijenta funkcije cilja [87].

5.3.6 ROC – kriva (Receiver operating characteristic)

Jedan od osnovnih metoda za analizu bilo kojeg klasifikacionog problema sastoji se u određivanju specifičnosti, senzitivnosti i tačnosti na test uzorcima. Ipak ovakva analiza ne daje potpunu informaciju o ponašanju modela već daje vrednosti za izabranu granicu razdvajanja klasa (npr. visok čovek $> 175\text{cm}$, nizak čovek $< 175\text{cm}$). U nekim slučajevima (u zavisnosti od polaznog skupa podataka) može postojati velika razlika između senzitivnosti i specifičnosti kako bi se popravio odnos senzitivnosti i specifičnosti (odredila najbolja granica za razdvajanje) pogotovo ako se favorizuje jedna od njih (npr. kod senzitivnosti u slučaju obolelih pacijenata mnogo je važnije otkriti bolesnog pacijenta nego pogrešno klasifikovati zdravog, daljim testovima će se pokazati da je lažno bolestan pacijent) [84].

Da bi se stekla potpuna slika o modelu neophodno je ispitati svaki mogući odnos senzitivnosti i specifičnosti pomerajući granicu razdvajanja između dve klase. Ovakva analiza se može predstaviti u obliku dijagrama gde se na ordinatu nanosi senzitivnost, a na apscisu vrednost (1-specifičnost). Ovako dobijen dijagram se naziva ROC kriva (slika 5.8), i u praksi se često koristi da bi se odabrala odgovarajuća granica razdvajanja između klasa. Međutim, povećanje senzitivnosti uvek će biti uslovljeno smanjenjem specifičnosti i obrnuto. Jednostavno analizom ROC krive moguće je kvantitativno odrediti kvalitet rada klasifikatora. U slučaju idealnog modela koji savršeno razdvaja klase, 100% senzitivnost i 100% specifičnost, ROC kriva bi imala jedan skok po ordinati sa 0 na 1 i zatim skok po apscisi sa 0 na 1. Kao kvantitativna mera ovakvog modela uzima se površina (Area Under Curve – AUC) ispod ROC krive koja bi u slučaju „savršenog razdvajanja“ imala vrednost „1“. U slučaju kada je AUC 0,5 odnosno ROC kriva je linija koja spaja (0,0) i (1,1), klasifikator je u potpunosti neefikasan i kao takav vrši potpuno nasumičnu klasifikaciju uzoraka. Kako bi se uporedili modeli dovoljno je da se uporede njihove ROC krive kao i njihove AUC, kvalitetniji modeli bi imali krivu koja je više pomerena u gornji levi ugao što bi za posledicu imalo i veći AUC. Posebna prednost primene ROC krive je u tome što je neosetljiva na disproporciju u veličini podataka kod klasa. Međutim, primena AUC, kao samostalne kvantitativne mere, može da prikrije informaciju o ponašanju modela, pogotovo u primerima kada je ROC kriva „nagnuta“ u samo u jednu stranu npr. ako je kriva jako strma u početku (velika senzitivnost, što može biti povoljna karakteristika), a ima manju AUC od drugog modela [84].



Slika 5.8. ROC kriva – na slici su prikazane dve granice razdvajanja (0,5 i 0,3) kao i vrednosti specifičnosti i senzitivnosti za obe granice [84].

6 PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

U okviru projekta III41006 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a za potrebe izrade doktorske disertacije u saradnji sa Prvom hirurškom klinikom, Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u periodu od 6 godina (2011-2017.godina) prikupljeno je 596 uzoraka tkiva kolona i rektuma snimljenih i obrađenih metodom OMIS (uzorci tkiva kolorektuma i histopatološke pločice istog tkiva) i 209 uzoraka tkiva (tkivo nakon resekcije, u fiziološkom rastvoru i formalinu) čije su karakteristike merene spinner magnetometrom JR-6A. Navedeni uzorci pripadali su grupi od 208 pacijenata, oba pola, različitih starosnih grupa i sa potvrđenom histopatološkom analizom na kolorektalni karcinom.

Od ukupnog broja snimljenih uzoraka većina, preko 98%, pripadali su najčešćem tipu kolorektalnog karcinoma – adenokarcinomu, dok su preostala 2% bili melanom, MALT limfom, planocelularni karcinom, GIST. *Ex vivo* istraživanje sprovedeno je neposredno nakon resekcije tkiva. Kako se OMIS kao optička metoda zasniva na interakciji svetlost-materija sa prodorom od 3 do 5 mm unutar tkivnog uzorka [62] izvršena je karakterizacija svih slojeva tkiva debelog creva. Debljina normalnog zida debelog creva kreće se od 0,2 do 2 mm i skoro nikada ne prelazi 2 mm (debljina može biti od 0,2 do 2,5 mm u kolonskim segmentima prečnika 3–4 cm, od 0,3 do 4 mm u segmentima sa prečnikom od 2–3 cm i od 0,5 do 5 mm u segmentima prečnika 1-2 cm) [88].

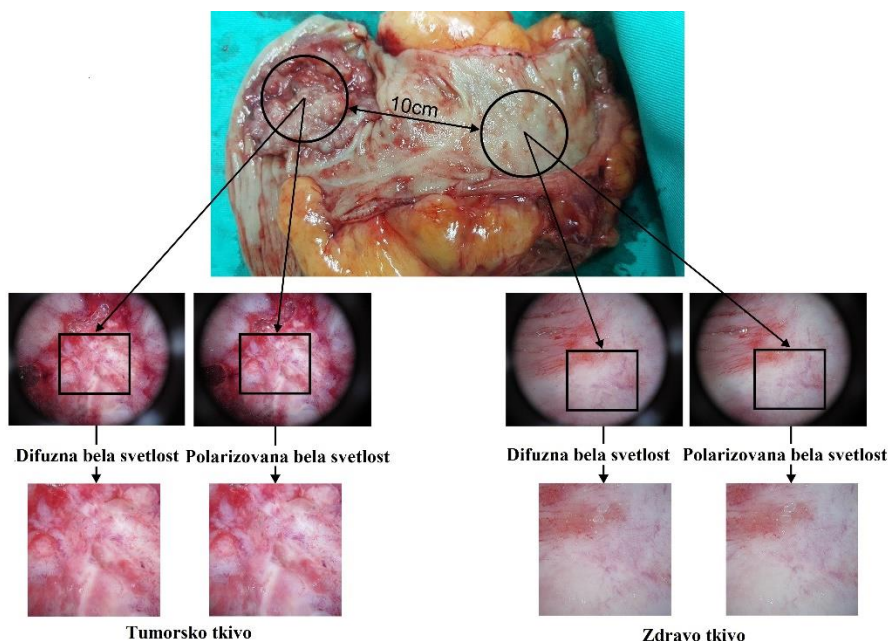
Pored metode OMIS-a, za merenje karakteristika kolorektalnog tkiva korišćena je i metoda za merenje remanentnog magnetizma, spinner magnetometrom JR-6A. Uzorci snimljeni ovom metodom razvrstani su u tri grupe.

Kao što je navedeno, kolorektalni karcinom započinje promenom u ćelijama sluzokože debelog creva i rektuma. Kako se bolest razvija, tumorske ćelije se šire kroz sve slojeve crevnog zida u druga tkiva i na kraju u udaljene organe. Prilikom pregleda i dijagnostikovanja kolorektalnog karcinoma potrebno je odrediti stadijum bolesti koji se određuje se obimom lokalne i udaljene invazije, pomoću opšte prihvaćenih TNM sistema klasifikacije (tabela 6.1) [65,89].

Tabela 6.1. TNM klasifikacija i grupisanje po stadijumima kolorektalnog karcinoma; T - odnosi se na veličinu i opseg glavnog tumora. Glavni tumor se obično naziva primarnim tumorom; N - odnosi se na broj obližnjih limfnih čvorova zahvaćenim karcinomom; M - odnosi se na to da li je tumor metastazirao - proširio se sa primarnog mesta na druge delove tela.

Klasifikacija CRC-a prema stadijumu bolesti			
Stadijum	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
	T3-T4a	N1	M0
IIIB	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
IIIC	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IV	Any T	Any N	M1

Svaki uzorak je slikan pomoću OMIS-a 20 puta, 10 puta pod belim difuznim svetlom i 10 puta pod belim difuznim svetlom pod Brusterovim uglom (refleksija svetla je polarizovana), da bi se dobile digitalne slike. Nakon snimanja, uzorci epitelnog tkiva su fiksirani u 10% formalinskom rastvoru za histopatološko ispitivanje. Istraživanje je u svim slučajevima obavljeno u istim uslovima kako bi se smanjila mogućnost grešaka u prikupljanju signala i obradi podataka.



Slika 6.1. Uzorak tkiva debelog creva nakon hirurške resekcije i označena mesta korišćena za snimanje uzorka OMIS metodom.

Za potrebe sprovedenog istraživanja, korišćeni su humani uzorci koji su bili u skladu sa etičkim standardima institucionalnog i/ili nacionalnog istraživačkog odbora i Helsinškom deklaracijom iz 1964. godine i njenim kasnijim izmenama ili uporedivim etičkim standardima, što je potvrdio Etički komitet Univerziteta u Beogradu Medicinski fakultet izdavanjem odluke koja potvrđuje mogućnost sprovođenja studije.

U nastavku biće dat presek stanja, broj i vrsta prikupljenih uzoraka prema godini istraživanja.

I godina istraživanja (2011. godina)

U prvoj godini istraživanja snimljeno i obrađeno je 40 uzoraka tkiva i 22 histopatološke pločice. Materijal svežih uzoraka obuhvatio je i jedan netipičan uzorak kolorektalnog karcinoma, MALT lymphom. Što se tiče histopatoloških pločica, pripremljene su dve grupe uzoraka po 11 pločica. Prva grupa bile su standardno pripremljene bojene pločice, dok je dok drugih 11 pločica izostao proces bojenja.

II godina istraživanja (2012. godina)

U drugoj godini istraživanja snimljeno i obrađeno je 97 uzoraka kolorektalnog tkiva. Tokom ove godine počelo je slikanje tkiva koje se nalazi pored tumorskog tkiva, sa ciljem poređenja rezultata 3 klase, zdravo-tkivo pored tumora-bolesno.

III godina istraživanja (2013. godina)

U trećoj godini istraživanja ukupno je snimljen i obrađen 81 uzorak tkiva.

IV godina istraživanja (2014. godina)

Četvrtu godinu istraživanja pored snimanja uzoraka tkiva metodom OMIS-a, započeta su i merenja na Spiner magnetometru JR-6A i dobijeni prvi preliminarni rezultati. Ukupno je snimljeno 84 uzorka, od toga 76 uzoraka na metodom OMIS i 15 uzoraka od 8 pacijenata na spiner magnetometru.

Uzorci snimani na spiner magnetometru bili su podeljeni u tri faze/grupe: 1- uzorci tkiva snimljeni odmah nakon resekcije, 2- uzorci tkiva nakon jednog dana u fiziološkom rastvoru, i 3- uzorci tkiva u formalinu.

V godina istraživanja (2015. godina)

Tokom pete godine uzorkovano je 215 uzoraka tkiva kolona i rektuma koji su obrađeni metodom OMIS i 194 uzorka izmerenih na spiner magnetometru JR-6A, raspodeljenih u 3 faze istraživanja.

VI godina istraživanja (2016. godina)

Poslednje, šeste godine istraživanja prikupljeno i obrađeno je 19 uzoraka tkiva kolona, 12 histopatoloških pločica klasifikovanih zdravo/bolesno i 12 histoloških pločica sa različitim vrstama kolorektalnog karcinoma (GIST, Lymphoma, melanom, NEC) OMIS metodom.

7 REZULTATI

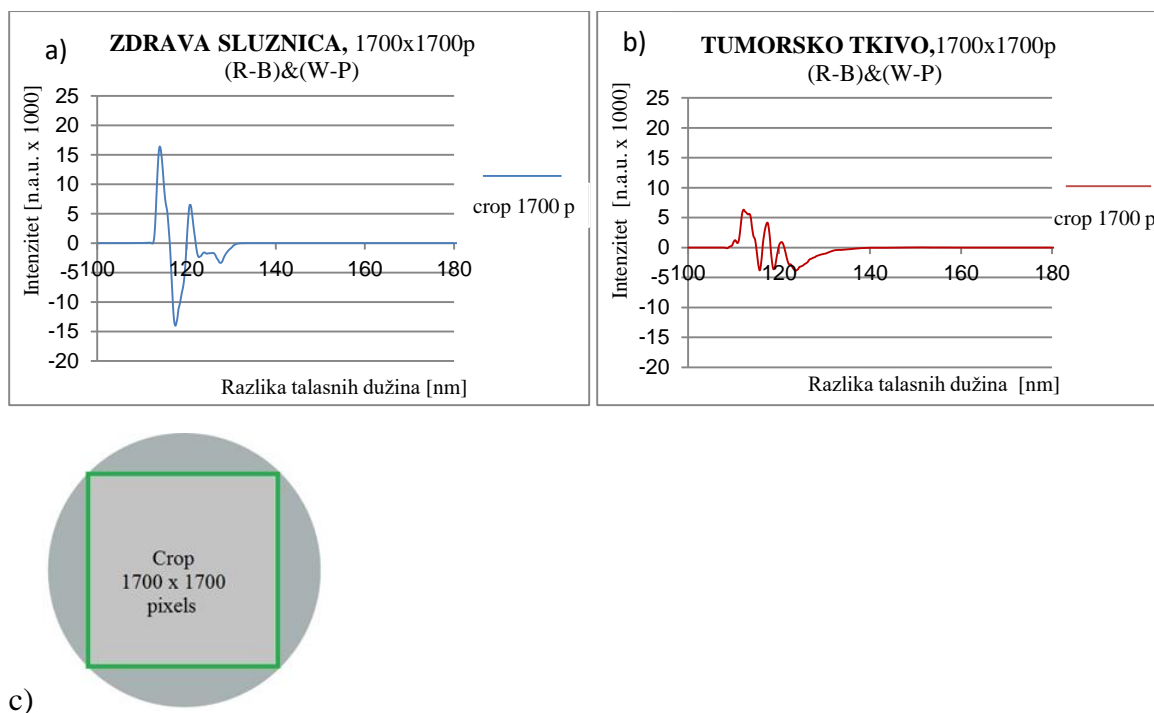
U ovom poglavlju predstavimo rezultate dobijene pomoću dve korišćene metode za snimanje ispitivanih uzoraka tkiva kolona i rektuma, OMIS-a i spinner magnetometra JR-6A, u vidu slika, dijagrama i tabela. Prikaz obrađenih rezultata postavljen je kroz nekoliko celina: Rezultati snimanja uzoraka OMIS metodom, Klasifikacija dobijenih rezultata i rezultati uzoraka snimanih metodom spinner magnetometra JR-6A.

7.1 Rezultati snimanja uzoraka metodom OMIS

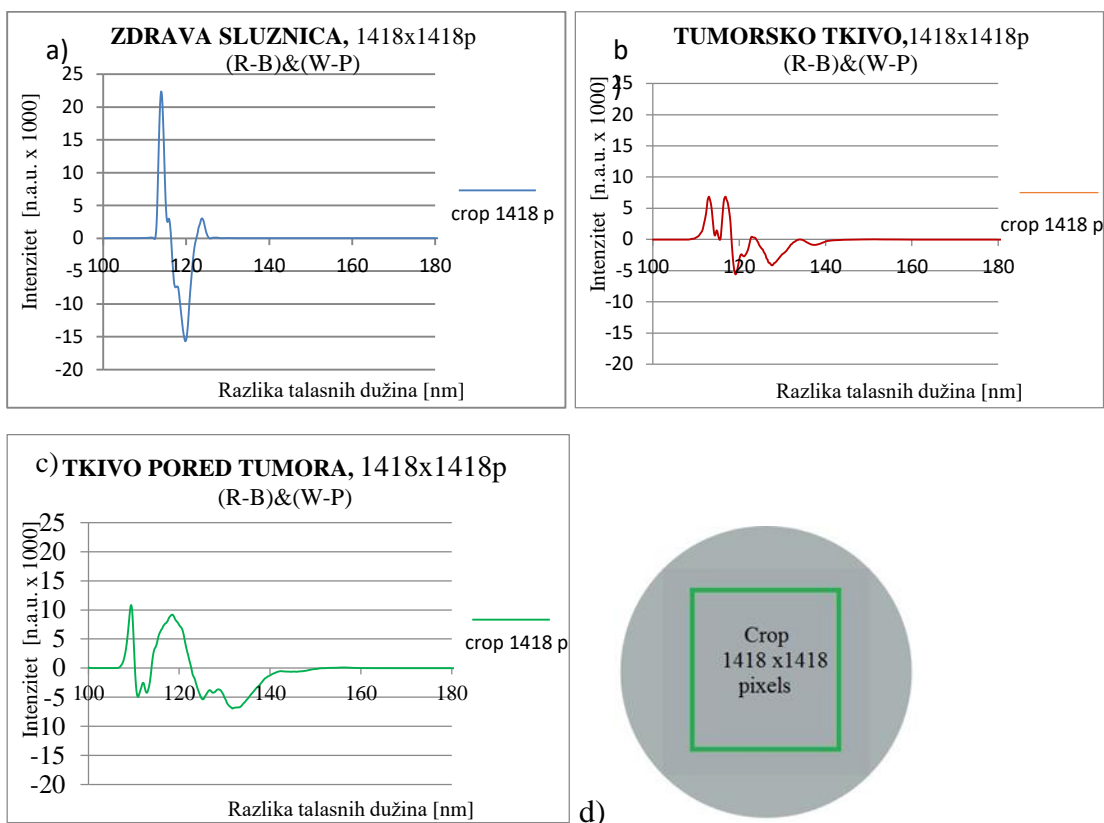
7.1.1 Rezultati snimanje uzoraka odmah nakon resekcije tkiva, tumorski tip - adenocarcinom

Metodom OMIS su praćene/snimane tri različite regije uzoraka kolorektalnog tkiva: zdrava sluznica - udaljenosti najmanje 10 cm od tumora, sluznica pored tumora i tumorsko tkivo. Nakon toga snimljene slike su isećene/kropovane u tri različite veličine: 1700x1700 piksela (cela slika), 1418x1418 piksela (centralna regija slike) i 710 x710 piksela (izabrana oblast od interesa prema smernici lekara), (Sl.6.1). Pristup podele kropovanja na tri različite veličine urađen je da bi se uvidelo da li postoji razlika u senzitivnosti i specifičnosti metode, kao i u izboru regije od interesa. Nakon kropovanja pristupilo se obradi slike, a za predstavljanje rezultata korišćen je najčešći tip OMIS spektra (R-B) & (W-P).

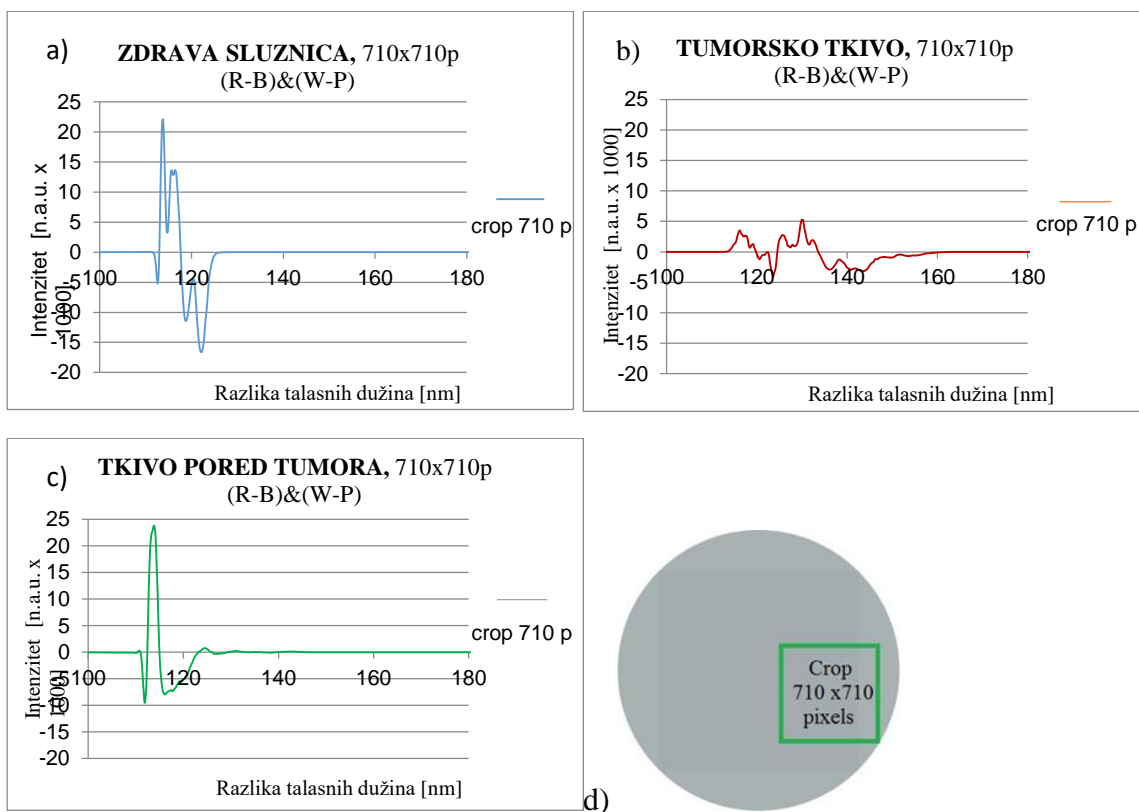
Predstavljeni dijagrami i slike, Sl. 7.1, Sl. 7.2 i Sl. 7.3 [65], predstavljaju rezultat obrade jednog uzorka tipa kolorektalnog karcinoma dobijenog od istog pacijenta koji je tipičan predstavnik zdrave sluzokože i tumorskog tkiva (tip adenokarcinoma, stadijum T3b, N1, M0).



Slika 7.1. Optomagnetni spektar slike istog uzorka, koji je obuhvatao najveću površinu slike („Fig. 7.1c“) koja se može iseći (cela slika), veličina kropovanja 1700x1700 piksela: „Sl. 7.1a ”- normalna sluznica i „ Fig. 7.1b ”- kolorektalni karcinom.[65]



Slika 7.2. Optomagnetni spektar slike istog uzorka iz tri različita područja sa istim centralnim isecanjem (Slika 7.2d - 1418 piksela): Sl.7.2a - normalna sluznica, Sl. 7.2b - kolorektalni karcinom I Sl. 7.2c - tkivo u blizini tumora [65]



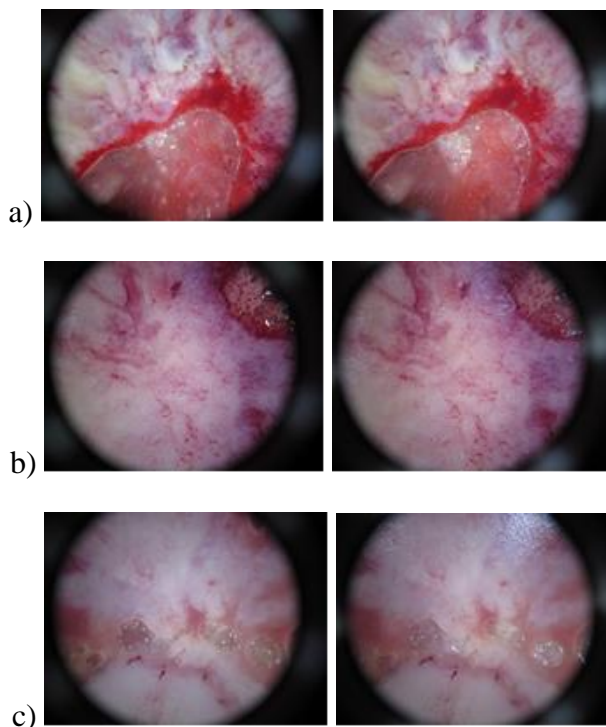
Slika 7.3. Optomagnetni spektar slike istog uzorka iz tri različita područja sa istim kropom (Slika 7.3d - 710 piksela): Sl. 7.3a - normalna sluznica, Sl. 7.3b - kolorektalni karcinom i Sl. 7.3c - tkivo blizu normalnog tkiva [65]

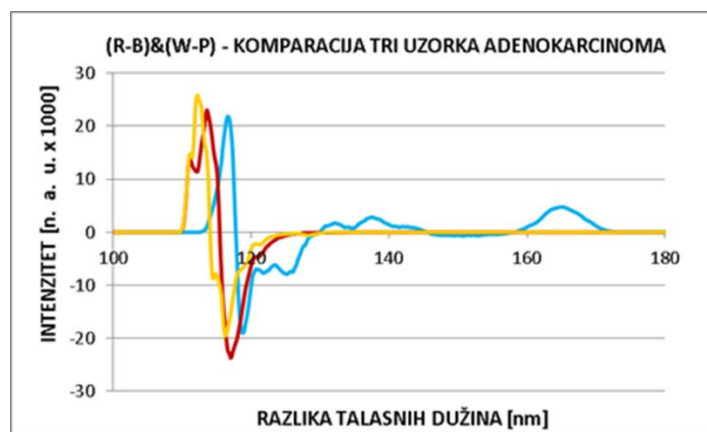
Upoređujući reprezentativne dijagrame za tumor i zdravu sluznicu kao jednu grupu, može se videti da se OMIS spektri značajno razlikuju između normalne mukoze / tumora, dok su dijagrami istog stanja tkiva izrazito slični. Analizom svih grupa dijagrama, za sve vrste kropova može se videti prisustvo dva karakteristična pika, jednog pozitivnog i jednog negativnog. Razlog malih razlika između dijagrama, posebno između prva dva i trećeg, je više diferencirano stanje kolorektalnog karcinoma zbog veličine kropa (prva dva dijagrama imaju slične veličine kropova u poređenju s trećim od 710p).

Najuočljivije karakteristike koje razlikuju zdrave od uzoraka tumora su vrednost intenziteta (između +/- 15 normalizovanih arbitrarnih jedinica [n.a.u]) i OMIS spektar (raspon razlika talasnih dužina (WLD) od oko 107 nm do skoro 160 nm). Za zdravu sluznicu (Sl. 7.2 i Sl. 7.3), prvi vrh u sva tri isecanja/kropa je pozitivan na razlikama talasnih dužina od oko 113 nm i pokazuje paramagnetna svojstva. Drugi vrh pokazuje dijamagnetna svojstva tkiva i ukazuje da tkivo poseduje normalnu paramagnetnu/dijamagnetnu dinamiku i da je kompaktno i dobro uređeno. Iako se pojavljuju razlike u nivou energije i talasnim dužinama od oko 2-5 nm, dijagrami zdrave sluzokože pokazuju slično ponašanje. Prvi vrh za kolorektalni karcinom (Slika 7.3) je oštar, sa talasnim dužinama od oko 112 nm, a sledeći vrhovi su manjeg intenziteta i ukazuju na to da je tkivo bogato nesparnim elektronima (paramagnetnim). Prvi negativni vrh pojavljuje se oko 115-115 nm i ukazuje da sadrži sparene elektrone (dijamagnetni). Dijagrami druge grupe, normalne sluznice i tkiva u blizini tumora, prikazani na Sl. 7.2c i Sl. 7.3c, pokazuju razlike u broju karakterističnih vrhova i njihovom intenzitetu [65].

7.1.2 Rezultati snimanje uzoraka odmah nakon resekcije tkiva, različite vrste kolorektalnog karcinoma

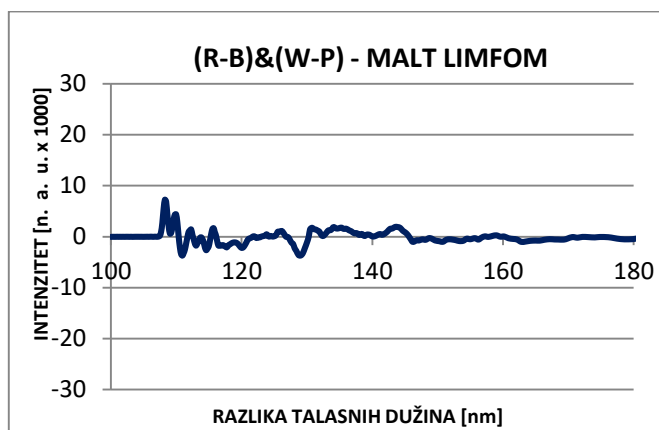
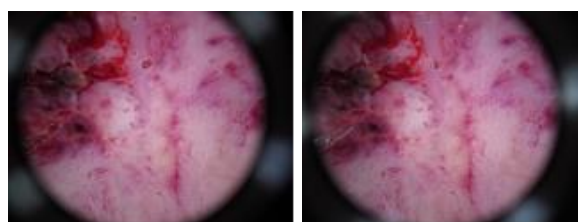
U nastavku predstavljena su četiri vrste kolorektalnog karcinoma sa kojima smo se susreli prilikom prikupljanja uzoraka za doktorsku disertaciju. Radi poređenja sa najprisutnijom vrstom kolorektalnog karcinoma dat je prikaz tri reprezentativna uzorka te vrste, jedan uzorak MALT limfoma, melanoma i planocelularnog karcinoma.



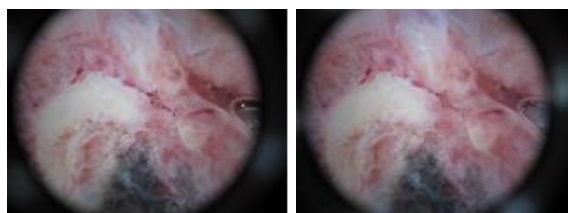


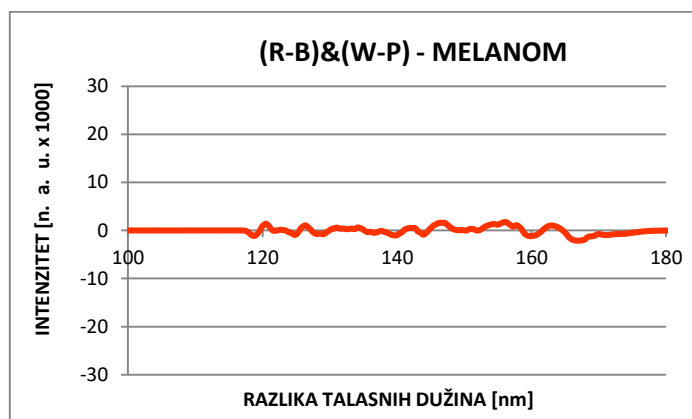
Slika 7.4. Uzorak 1, 2 i 3 – adenokarcinoma (a, b, c), snimci dobijeni belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagrami za tri uzorka adenokarcinoma [89]

Slika 7.4 prikazuje 3 uzorka adenokarcinoma kod kojih se može uočiti slično ponašanje tkiva u paramagnetnom i dijamagnetnom domenu. Prikazane su tipične vrednosti, karakteristični pikovi, za sva tri tkiva u domenu (R-B) & (V-P): za uzorak 1 - (112,073, 25,356), (116,036, -17,754); uzorak 2 - (112,846, 23,201), (116,637, -22,294); uzorak 3 - (116,423, 21,065), (117,993, -20,019).

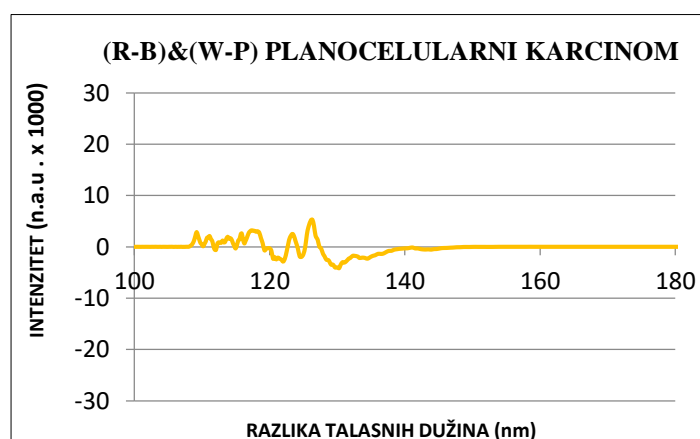
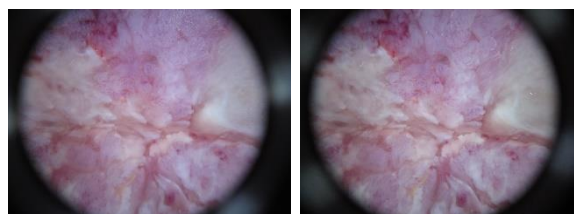


Slika 7.5. Snimak MALT limfoma dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram za uzorak MALT limfoma [89].





Slika 7.6. Snimak melanoma, dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram melanoma koji pokazuje malu paramagnetno/dijamagnetu aktivnost, pa je zbog karakterističnog izgleda krive nemoguće precizno odrediti vrednosti intenziteta pikova i razlika talasnih dužina [89]

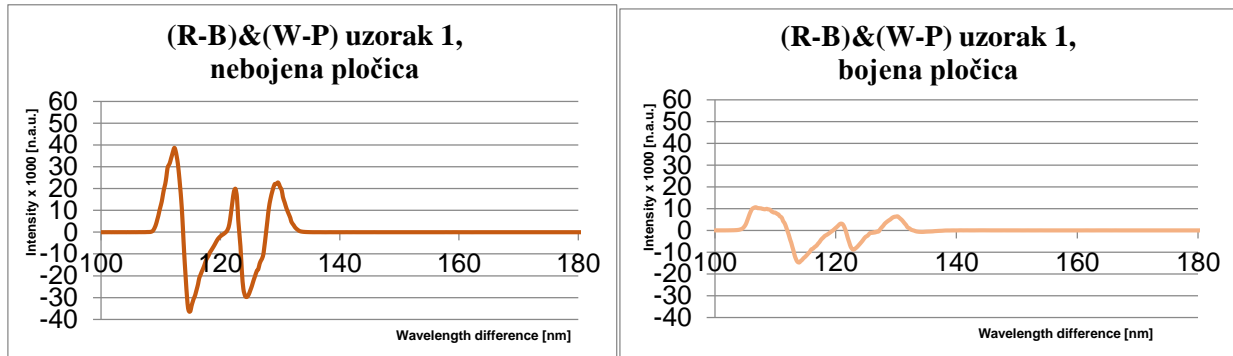


Slika 7.7. Snimak planocelularnog karcinoma, dobijen belom difuznom svetlosti i belom reflektujućom polarizovanom svetlošću i Optomagnetni dijagram planocelularnog karcinoma koji pokazuje malu paramagnetno/dijamagnetu aktivnost, pa je zbog karakterističnog izgleda krive nemoguće precizno odrediti vrednosti intenziteta pikova i razlika talasnih dužina [89].

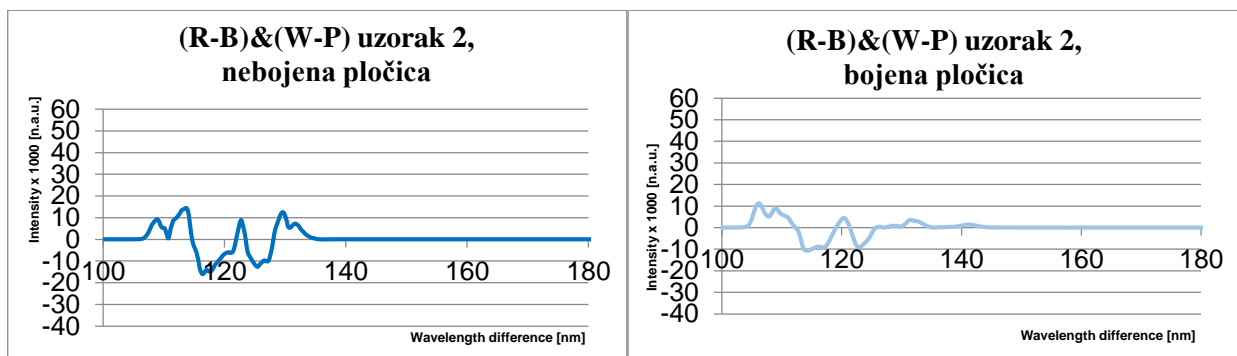
Upoređujući dijagram adenokarcinoma, sl. 7.4 sa dijagramima na slikama 7.5, 7.6 i 7.7, mogu se uočiti potpuno različite aktivnosti u dijamagnetskom i paramagnetnom domenu, intenzitetu i razlici talasne dužine. Tkivo zahvaćeno MALT limfomom pokazuje aktivnost u domenu razlika talasnih dužina od 107 do 175 nm sa intenzitetom od -5 (dijamagnetna zona) do +7 (para-magnetna zona). Suprotno tome, tkivo zahvaćeno melanomom pokazuje aktivnost u talasnim dužinama između 119-175 nm i intenzitetom -3 - +3 normiranih jedinica. Poslednji uzorak, planocelularni karcinom, pokazuje aktivnost u talasnim dužinama razlike od 105-145 nm i intenzitet -4 - +4 normiranih jedinica. Dobijeni rezultati pokazuju da je metoda opto-magnetne slikovne spektroskopije dovoljno osetljiva metoda za klasifikaciju tkiva i da jasno pokazuje razliku između različitih vrsta raka, kao i sličnosti sa istom vrstom. Potrebna su dalja istraživanja na većem broju uzoraka [89].

7.1.3 Rezultati snimanje histopatoloških pločica uzoraka kolorektalnog karcinoma, adenokarcinoma

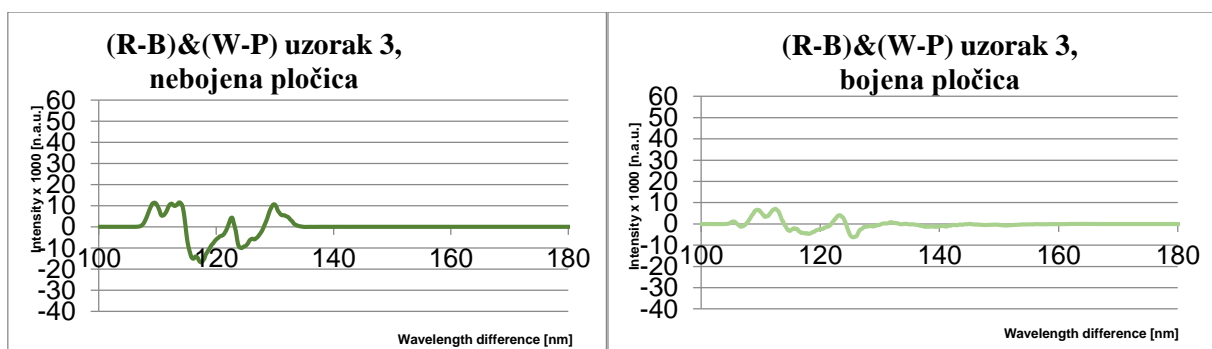
Pored predstavljenih rezultata, urađeno je i komparativno snimanje uzoraka histopatoloških pločica tkiva adenokarcinoma koje su pripravane prema propisanim procedurama, a zatim su za iste uzorke urađene i histopatološke pločice kod kojih je izostavljeno bojenje. Kao i kod uzorkovanja svežeg tkiva dobijene su digitalne slike histopatoloških pločica, snimane po 20 puta OMIS metodom.



Slika 7.8. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 1.



Slika 7.9. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 2.



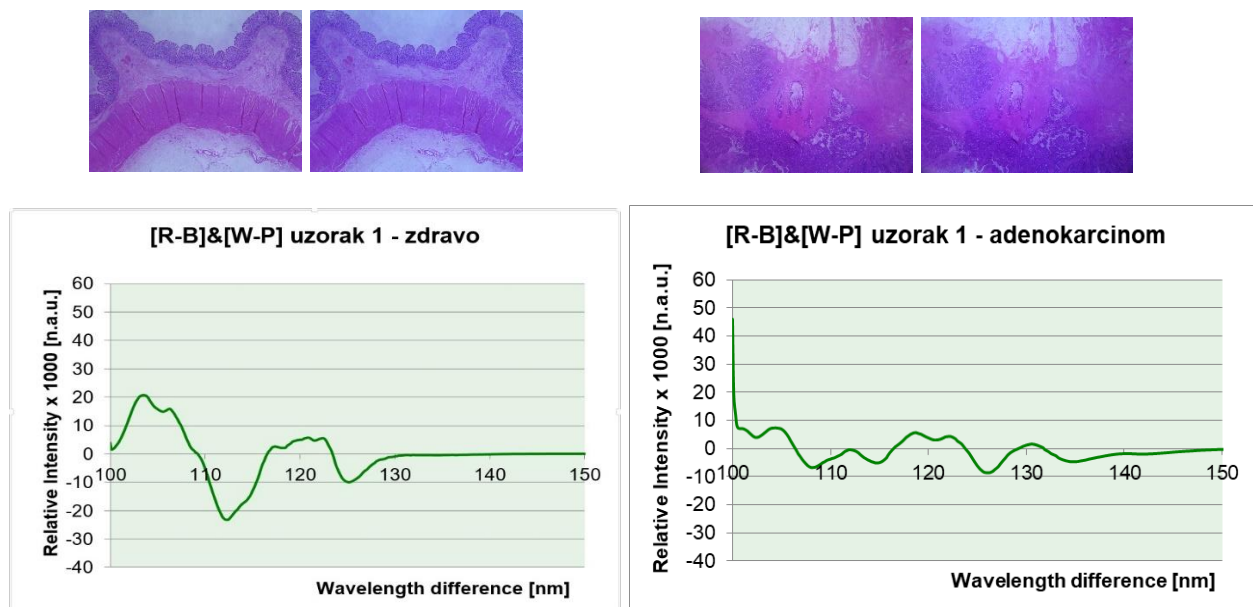
Slika 7.10. OMIS dijagrami ne obojenih (levo) i obojenih (desno) histopatoloških pločica istog uzorka tkiva 3.

Slike 7.8, 7.9 i 7.10 prikazuju OMIS dijagrame nebojenih i obojenih pločica kolorektalnog tkiva. Ove slike nebojenih pločica pokazuju jasan intenzitet pika koji je veći od vrednosti kod obojenih pločica, što se može objasniti mišljenjem da posmatrano tkivo nije izgubilo svoja prirodna svojstva. Rezultati dobijeni obradom obojenih i ne obojenih pločica pokazuju značajnu sličnost, što ukazuje da

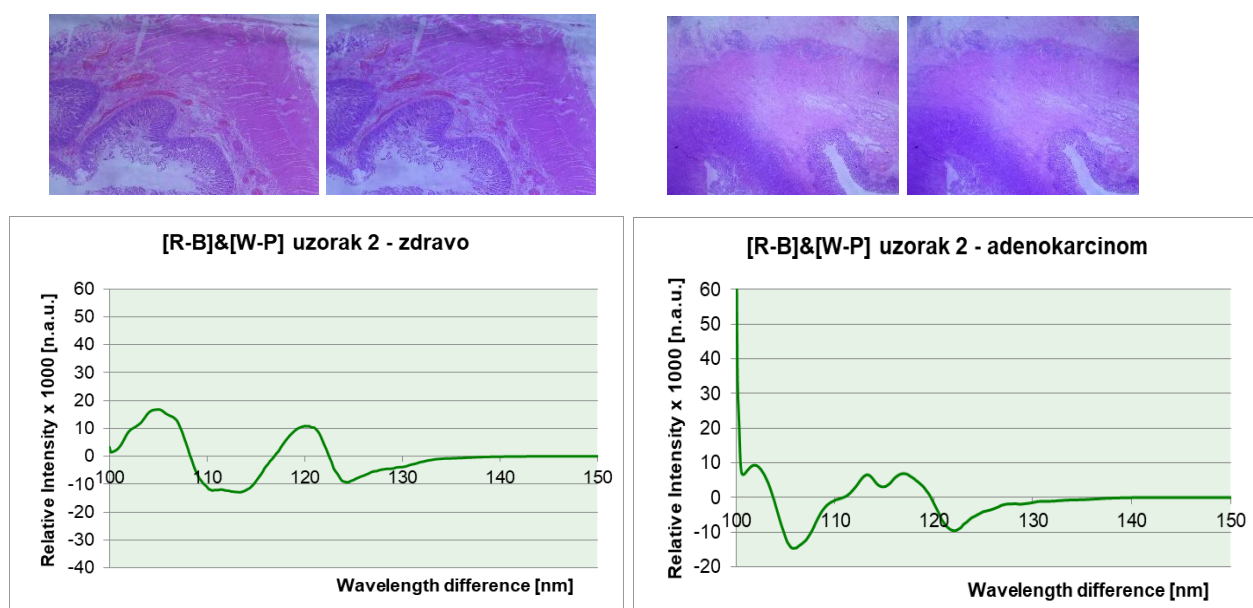
se postupak bojenja može izbeći. Prednosti uključuju bržu i jeftiniju obradu podataka. Najvažnija stvar pločica bez bojenja je da rezultat ne zavisi od postupka uzimanja uzoraka i bojenja.

7.1.4 Rezultati snimanje histopatoloških pločica kolorektalnih uzoraka, zdravo tkivo i adenokarcinom

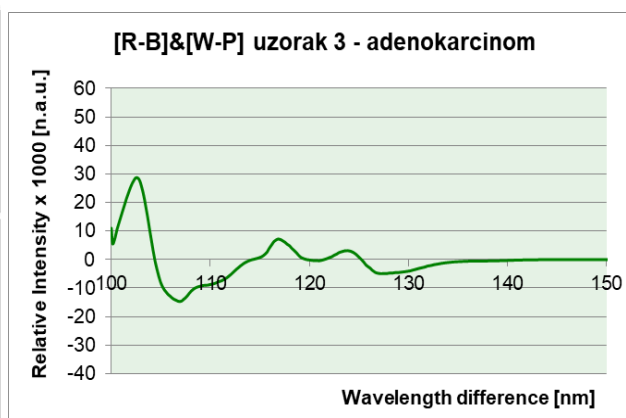
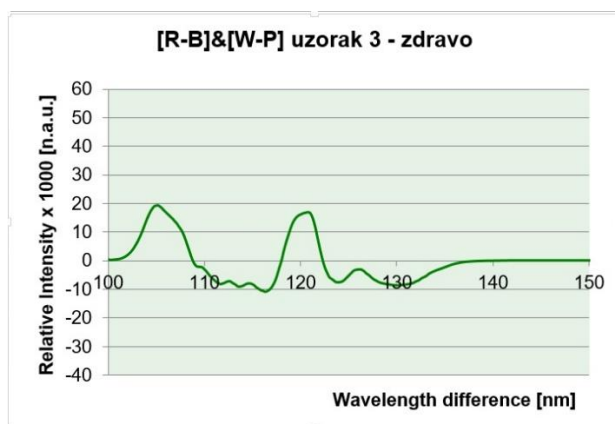
Naredne slike i dijagrami prikazuju rezultate dobijene obradom uzoraka histopatoloških pločica koje su izrađene za adenokarcinom i zdravo tkivo. Ukupno je snimljeno 6 parova pločica, a biće predstavljena 3 predstavnika.



Slika 7.11. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 1, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami histopatoloških pločica za uzorak 1, levo – zdravo tkivo, desno - adenokarcinom



Slika 7.12. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 2, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami levo – zdravog tkiva, desno – adenokarcinoma.

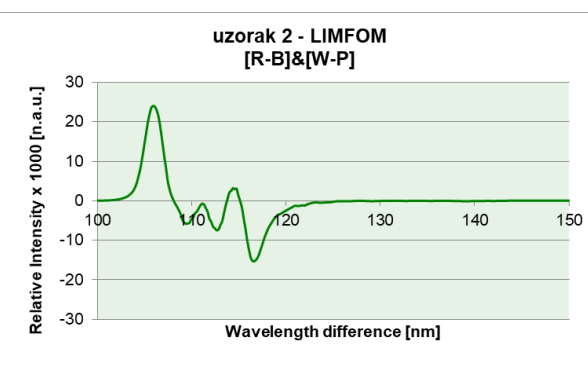
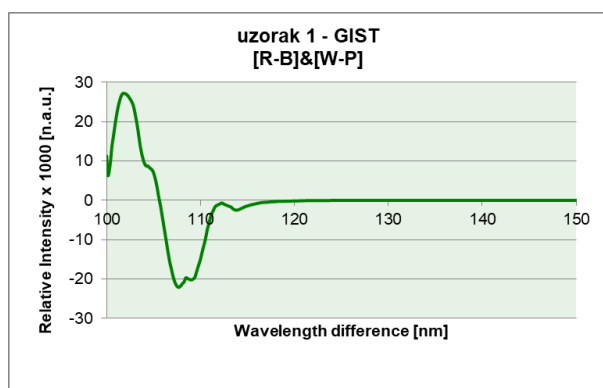


Slika 7.13. Snimak histopatoloških pločica za uzorak 3, kropovana regija, levo – zdravo tkivo, desno – adenokarcinom i OMIS dijagrami levo – zdravog tkiva, desno – adenokarcinoma.

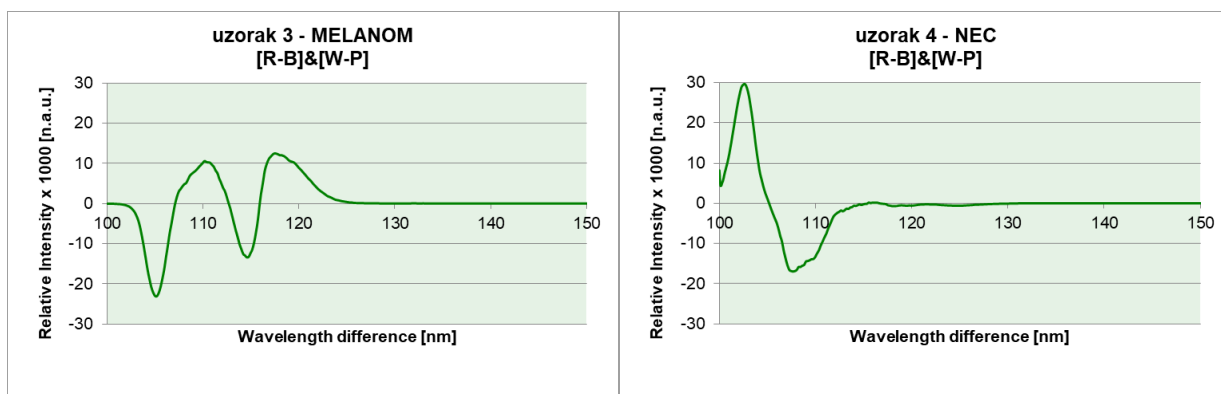
Slike 7.11, 7.12 i 7.13 prikazuju OMIS dijagrame obojenih pločica kolorektalnog tkiva prikazane za zdrave uzorke i uzorke sa adenokarcinomom. Prikazani dijagrami prikazuju jasno razdvajanje uzoraka na zdravo i bolesno, pri čemu se jasno uočava drugačija aktivnost uzoraka zahvaćenih karcinomom.

7.1.5 Rezultati snimanje histopatoloških pločica različitih vrsta kolorektalnih karcinoma

Poslednja vrsta uzoraka snimljena OMIS metodom su histopatološke pločice kojima su uzorkovanje 4 različite vrste kolorektalnog karcinoma.



Slika 7.14. i Slika 7.15. Opto-magnetni dijagram uzorka GIST i LIMFOM kolorektalnog karcinoma



Slika 7.16. i Slika 7.17. Opto-magnetni dijagram uzorka MELANOM i NEC kolorektalnog carcinoma

Poređenjem dijagrama mogu se uočiti potpuno različite aktivnosti u dijamagnetnom i paramagnetnom domenu, intenzitetu i razlici talasne dužine. Tkivo zahvaćeno GIST-om pokazuje aktivnost u domenu razlika talasnih dužina od 100 do 117 nm sa intenzitetom od +27 (para-magnetna zona) do -21 (dijamagnetna zona). Kod uzorka sa LIMFOM-om vide intenziteti u rasponu od +22 (para-magnetna zona) do -13 (dijamagnetna zona) i razlici talasnih dužina 106-123 nm. MELANOM pokazuje aktivnost u domenu razlika talasnih dužina od 107 do 127 nm sa vršnim intenzitetom od -20 (dijamagnetna zona) do +12 (paramagnetna zona). Suprotno tome, tkivo zahvaćeno NEC-om pokazuje aktivnost u talasnim dužinama između 102-120 nm i intenzitetom +30 - -16 normiranih jedinica. Dobijeni rezultati pokazuju da je metoda opto-magnetne slikovne spektroskopije dovoljno osetljiva metoda za klasifikaciju tkiva i da jasno pokazuje razliku između različitih vrsta raka, kao i sličnosti sa istom vrstom, ali zahteva dalja detaljna istraživanja.

7.2 Primenjeni algoritmi za klasifikaciju podataka

Kao što je pomenuto u odeljku metode i procedure, za obradu dobijenih podataka korišćeni su sledeći algoritmi mašinskog učenja: višesojna perceptron neuronska mreža, Naive-Bayes i Random forest. Svaki od primenjivanih algoritama mašinskog učenja može se svrstati pod grupaciju algoritama za nagledano učenje (supervizijsko učenje). Ovakav tip učenja podrazumeva da se podaci podele u minimum 2 skupa od kojih jedan predstavlja trening skup, a drugi skup je za testiranje algoritma. Veličina ovih skupova se može razlikovati od slučaja do slučaja, ali se u okviru literature mogu pronaći podele od 70% - 30% na trening i test set respektivno, do 90% - 10%. Ova podela može zavistiti od broja uzoraka koji se analiziraju kao i od količine klasa u koje se podaci svrstavaju. U zavisnosti od algoritma koji se primenjuje moguće je izdvojiti još jedan set, ali se ova vrsta seta uglavnom koristi kod neuronskih mreža kako bi se izvršila validacija treninga i izračunao gradijent greške u toku obučavanja algoritma. Veličina testa za validaciju može biti i preko 10%.

Kod izbora veličine test i trening skupova neophodno je da se obrati pažnja da bude dovoljno velik broj podataka u test skupu kako ne bi došlo do velikih grašaka u određivanju tačnosti. Veoma veliki uticaj na tačnost klasifikacije algoritma odnosno modela ima i broj podataka svake klase u svakom od skupova. Poželjno je da balans između klasa i u trening i u test skupu bude što približniji, 50-50% u slučaju klasifikacije na dve klase, a kada se radi o klasifikaciji na veći broj klasa neophodno je da postoji podjednak broj podataka iz svake klase kako bi se smanjilo favorizovanje one klase koje ima više u odnosu na ostale. Ovaj problem je posebno izražen ako postoji jako velika razlika između količine podataka koji definišu svaku klasu. Npr. ako u slučaju karcinoma postoji 150 zdravih uzoraka i 3 bolesnih klasifikator ispravno klasifikuje 150 zdravih, a zatim 2 bolesna smesti u pogrešnu grupu i pri tome samo 1 bolestan ispravno klasifikuje. Za postavljene podatke dobija se tačnost 98,69% pri čemu je senzitivnost 100%, a specifičnost 33,33%. Na osnovu dobijenih rezultata vidi se da je tačnost prilično visoka i da je senzitivnost 100% na osnovu čega bi se moglo zaključiti da se radi o veoma dobrom modelu, međutim niska specifičnost govori o tome da su u skupu podataka favorizovani

zdravi podaci. Ovakav raspored u skupu može imati za posledicu da tačnost ostane visoka i ako se svi bolesni pogrešno klasifikuju.

7.2.1 Opis strukture podataka

Podaci prikupljeni pomoću OMIS metoda nalaze se u obliku dijagrama koji su formirani tako da se na apscisi nalazi razlika talasnih dužina, a na ordinati intenziteti. Svaki dijagram se sastoji od 256 vrednosti inteziteta i isto toliko razlika talasnih dužina. Pošto su razlike talasnih dužina iste za sve uzorke, celokupnu informaciju o uzorcima nose samo vrednosti inteziteta, stoga je bilo dovoljno analizirati samo njih. Detaljnijom analizom podataka utvrđeno je da postoji 36 razlika talasnih dužina gde su inteziteti nula i koje nije bilo potrebno analizirati jer ne nose nikakvu informaciju.

Prikupljeni podaci su se sastojali od nekoliko grupacija podataka koji su bili podeljeni prema veličini i poziciji gde su slike snimljene i od kojih su dobijeni dijagrami OMIS metodom. Na ovaj način možemo prikupljene podatke podeliti u nekoliko grupa:

- Prva podela je na zdrave i bolesne uzorke
- Druga prema veličini snimljene slike
- Ovoj podeli se može pridružiti i posebna grupacija gde se nalaze slike koje su snimane na prelazu između zdravog i bolesnog tkiva.

Prema podeli u odnosu na veličinu slike postoje 3 vrste slika od kojih su se formirali OMIS dijagrami:

- 1700x1700 pixels, ove slike su najveće i kod njih postoji podela samo na zdrave i bolesne uzorke

- 1418x1418 pixels, kod ovih slika su pored jasno razdvojenih zdravih i bolesnih uzoraka snimani i uzorci koji se nalaze na granici između zdravog i bolesnog tkiva odnosno postoje 3 vrste uzoraka.

- 710x710 pixels, dimenzija slika u ovoj grupi je najmanja što je omogućilo da se uzorkuje najveći broj slika da bi se od njih dobili OMIS dijagrami. U ovoj veličini razlikujemo sledeće vrste:

- Zdravi uzorci
- Bolesni uzorci
- Zdravi uzorci pored tumora odnosno granični uzorci.

Na osnovu svih ovih podataka formirano je 9 analiza da bi se napravile sve moguće kombinacije uzoraka za svaku od veličina slika. Tako u slučaju slika 1700x1700p postoji samo jedna kombinacija odnosno vrši se klasifikacija na zdravo i bolesno.

Kod slika veličine 1418x1418p postoji tri kombinacije koje je se ispituju:

- Zdravo – Bolesno
- Zdravo – uzorci pored tumora - granični uzorci
- Granični uzorci – Bolesno

Kod slika dimenzija 710x710p napravljeno je 2 kombinacije:

- Zdravo – Bolesno
- Zdravo – Zdravi uzorci pored tumora

7.2.2 Opis algoritma

Modeli klasifikatora za Naive Bayes i Random Forest razvijeni su pomoću programskog jezika „R“ i pomoću integrisanog razvojnog okruženja „R Studio“. Da bi se od polaznih podataka OMIS metode došlo do klasifikatora koji mogu da sortiraju ulazne podatke bilo je neophodno da se ti podaci pripreme. Priprema podataka se sastojala iz sledećih koraka:

1. Uklonjene su sve talasne dužine koje imaju konstantnu vrednost nula i koje se ne menjaju u toku vremena,

2. Svakoj grupi podataka su se pridružile određene klase (zdravom tkivu klasa „zdravo“ i bolesnom tkivu klasa „bolesno“),

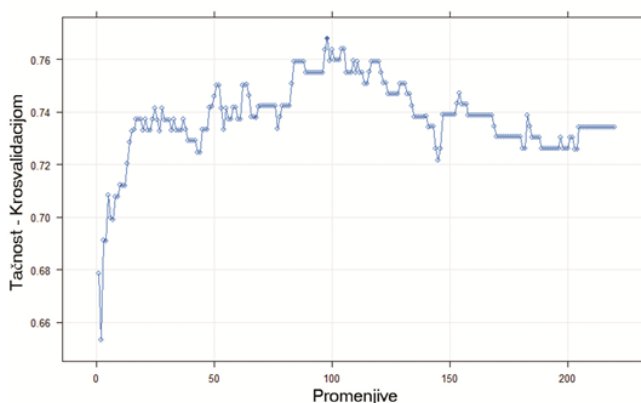
3. Zatim je izvršena pred obrada podataka primenjujući metod standardizacije podataka. Ovim metodom je skup svake posebne WLD modifikovan tako da ima nultu srednju vrednost i jediničnu varijansu (videti prilog 1). Na ovaj način se postignuto je da svi podaci imaju podjednak značaj pri obučavanju klasifikatora, odnosno smanjen je uticaj podataka koji imaju velike relativne promene vrednosti [91-93],

4. Zatim je izvršena „randomizacija“ podataka tako što su svi podaci (zdravi i bolesni) izmešani koristeći slučajne brojeve sa uniformnom raspodelom. Na ovaj način postignut je nasumičan redosled podataka koji se dovodi klasifikatoru, odnosno da unapred nije poznato da li je podatak zdrav ili bolestan, a uz pomoć uniformne raspodele se postiže da su zdravi i bolesni uzorci ravnomerno raspodeljeni kroz ceo skup. Takođe, ovako je omogućena ravnomerna raspodela zdravih i bolesnih uzorka kod podele na trening i test skup u oba skupa.

5. Razdvajanje na trening i test skup je sprovedeno tako da se u okviru trening skupa nalazi 75% podataka, dok se u okviru test skupa nalazi ostatak od 25%.

Prethodni postupak predstavlja pripremu podataka koja je izvedena pre obučavanja svakog novog klasifikatora za svaku od navedenih kombinacija uzorka. Primenjeni kodovi u programskom jeziku „R“ prikazani se mogu videti u prilogu 2. Kako se ulazni podaci sastoje od 256 promenljivih primenjeni su algoritmi koji služe za eliminaciju promenljivih na takav način da nemaju uticaja na tačnost klasifikatora. U okviru „CARET“ biblioteke u programskom jeziku „R“ iskorišćenja je „rfe()“ funkcija koja vrši selekciju promenljivih na osnovu unapred definisanih parametara [94]. Selekcija promenljivih se vrši tako što se „rfe()“ funkciji dovedu svi podaci iz trening skupa zajedno sa svojim klasama, navede se vrsta za koju se pripremaju podaci kao i način na koji se testira uticaj podataka (tačnost, specifičnost, AUC za ROC krivu).

Na osnovu ovih podataka algoritam „rfe()“ funkcije vrši rangiranje promenljivih prema njihovom značaju, a zatim redom ispituje tačnost željenog klasifikatora tako što se počinje od promenljive sa najvećom „važnošću“ pa se zatim dodaje sledeća promenljiva sa manjim značajem i sve tako dok se ne pronađe skup promenljivih koji najbolje ispunjava zadati kriterijum (npr. skup promenljivih koje imaju najveću tačnost). Na ovaj način, u slučaju OMIS dijagrama“ eliminiše se i i više od pola promenljivih i tako značajno s vreme potrebno da se obrade podaci (Slika 7.28). Na osnovu rezultata dobijenih pomoću „rfe()“ funkcije formirani su novi skupovi koji sadrže promenljive koje najbolje ispunjavaju zadati kriterijum (primenjeni kôd se može videti u prilogu 2).



Slika 7.18. Povratna informacija „rfe()“ funkcije za eliminaciju promenljivih.

Dijagram prikazuje zavisnost tačnosti klasifikatora od broja promenljivih koje učestvuju u klasifikaciji. Nakon određene promenljive tačnost se smanjuje, odnosno nisu sve promenljive neophodne za klasifikaciju. Tako novodobijeni skup je upotrebljen za obuku finalnog klasifikatora. Potrebno je naglasiti da je prethodni algoritam isti za sve klasifikatore jedino se razlikuju ulazni podaci i vrsta klasifikatora koji se obučava i za koji se određuju promenljive koje postižu najbolju

tačnost. Svaki od primenjenih algoritama poseduje i određen broj parametara koje je moguće podešavati u toku obučavanja, a uspešnost definisanih parametara određivanja je pomoću metoda krosvalidacije (videti prilog 1). Za svaki od parametara su postavljene granice u kojima se mogu kretati njihove vrednosti i koraci sa kojima se te vrednosti menjaju, a zatim je postavljen algoritam odnosno funkcije koje su definisane u okviru upotrebljenih programskih biblioteka da samostalno pretražuju sve moguće kombinacije parametara dok se ne odredi kombinacija koja najbolje zadovoljava zadati kriterijum (tačnost klasifikatora) (videti prilog 2).

Prethodni algoritam primenjen je u slučaju dva klasifikatora: Naive Bayes (NB) i Random forest (RF). Kod NB klasifikatora postoje 3 parametra koja je moguće modifikovati, dok kod RF postoji jedan (videti prilog 1). Nakon obuke klasifikatora izvršeno je njihovo testiranje uz pomoć test seta koji predstavlja 25% polaznih podataka. Iz test seta su takođe izdvojene promenljive koje su izbačene iz trening seta. Postignuti rezultati su prikazani u Tabeli 7.1, Tabeli 7.2 i Tabeli 7.3 gde su navedene vrednosti za tačnost, senzitivnost i specifičnost za svaki klasifikator i svaki tip podataka. Kao dodatno merilo rada klasifikatora određene su ROC krive za test podatke, za svaku kombinaciju podataka, i izračunata je površina ispod krive (AUC). Na slikama Slika 7.19, Slika 7.20, Slika 7.21 i Slika 7.22, su prikazane ROC krive za svaku od kombinacija uzoraka sa izračunatim AUC.

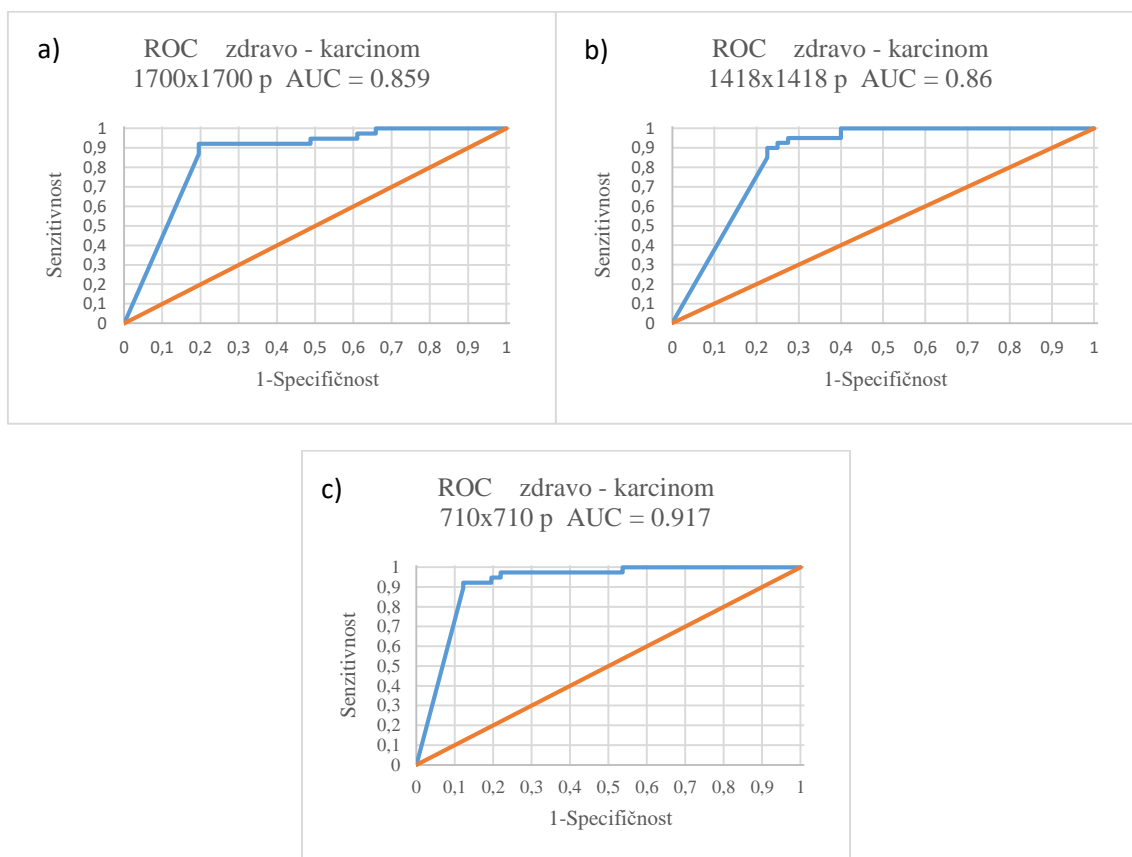
Rezultati klasifikatora Naive-Bayes ukazuju na visok procenat tačnosti za ispitivanu grupu uzoraka: 74,68% za kropovanje 1700x1700 piksela, 81,25% za 1418x1418 piksela i 89,87% za regiju kropovanja 710x710 piksela (Tabela 7.2). Ove rezultate prate i dobijene ROC krive, gde su najveće vrednosti AUC za 710x710p (AUC = 0,917) kropove koji se fokusiraju na jasno definisanu oblast gde se kancer nalazi. Zatim 1418x1418p sa vrednošću AUC = 0,86 i veličinu kropa 1700x1700p gde je AUC = 0,859.

Tabela 7.1. Upoređivanje mera performansi klasifikacije OMIS podataka korišćenjem Naive Bayes klasifikatora za normalnu mukoza i karcinom (veličina kropovane regije: 1700x1700 piksela, 1418x1418 piksela i 710x710 piksela) [65]

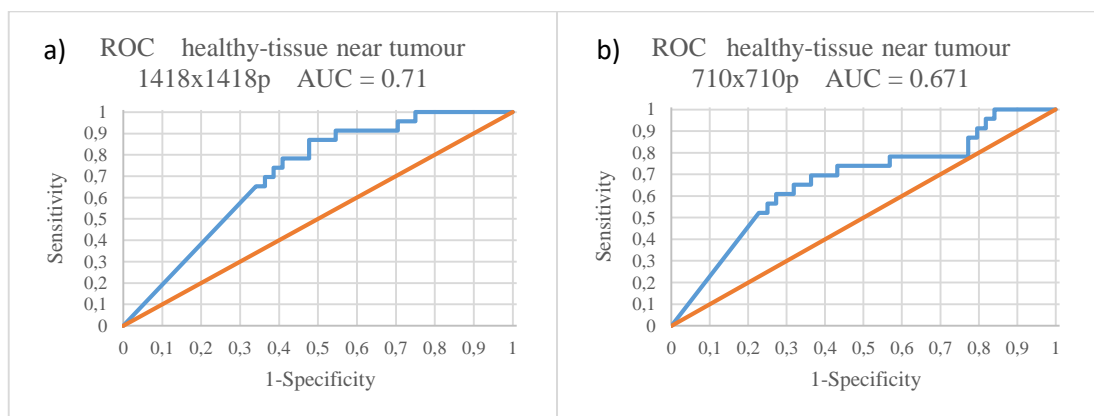
NAÏVE-BAYES klasifikator	Cela slika	Centralni krop	Zona od interesa
	1700 x1700 piksela	1418 x 1418 piksela	710 x710 piksela
	Zdravo - karcinom	Zdravo - karcinom	Zdravo - karcinom
Senzitivnost %	76.32	77.50	92.11
Specifičnost %	73.17	85.00	87.80
Tačnost %	74.68	81.25	89.87

Tabela 7.2. Upoređivanje mera performansi OMIS klasifikacije podataka korišćenjem Naive Bayes klasifikatora za zdravo tkivo i tkivo u blizini tumora (veličina isečene regije: 1418x1418 piksela i 710x710 piksela)[65]

NAÏVE-BAYES klasifikator	1418 x 1418 piksela	710x710 piksela
	Zdravo – tkivo pored tumora	Zdravo – tkivo pored tumora
Senzitivnost %	78.26	65.22
Specifičnost %	56.82	72.73
Tačnost %	64.18	70.15



Slika 7.19. ROC kriva za tri vrste klasifikacije pomoću Naive Bayes klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1700x1700 piksela (Sl. 7.1a), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1418x1418 piksela (Sl. 7.2a), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličine isecanja 710x710 piksela (Sl. 7.3a).[65]



Slika 7.20. ROC kriva za dve vrste klasifikacije pomoću Naive Bayes klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i tkiva u blizini tumora, Sl. 7.2c - veličina isecanja od 1418x1418 piksela i Sl. 7.3c - veličina isecanja od 710x710 piksela.[65]

Dobijeni rezultati „Random Forest“ klasifikatora se neznatno razlikuju od rezultata dobijenih sa NB klasifikatorom kod malih kropova 710x710p dok se sa porastom veličine slike razlike povećavaju i ne prelaze više od 10% (pogledati u tabelama 7.1, 7.2, i 7.3). Potrebno je naglasiti da su razlike u tačnosti, senzitivnosti i specifičnosti značajno manje kod kombinacija gde se razdvaja bolesno tkivo od zdravog nego u slučajevima kada se analizira zdravo i tkivo pored tumora. Oblici ROC kriva (Slike 7.19, 7.20, 7.21, 7.22) kod oba tipa klasifikatora potvrđuju dobijene rezultate gde se jasno vidi da je

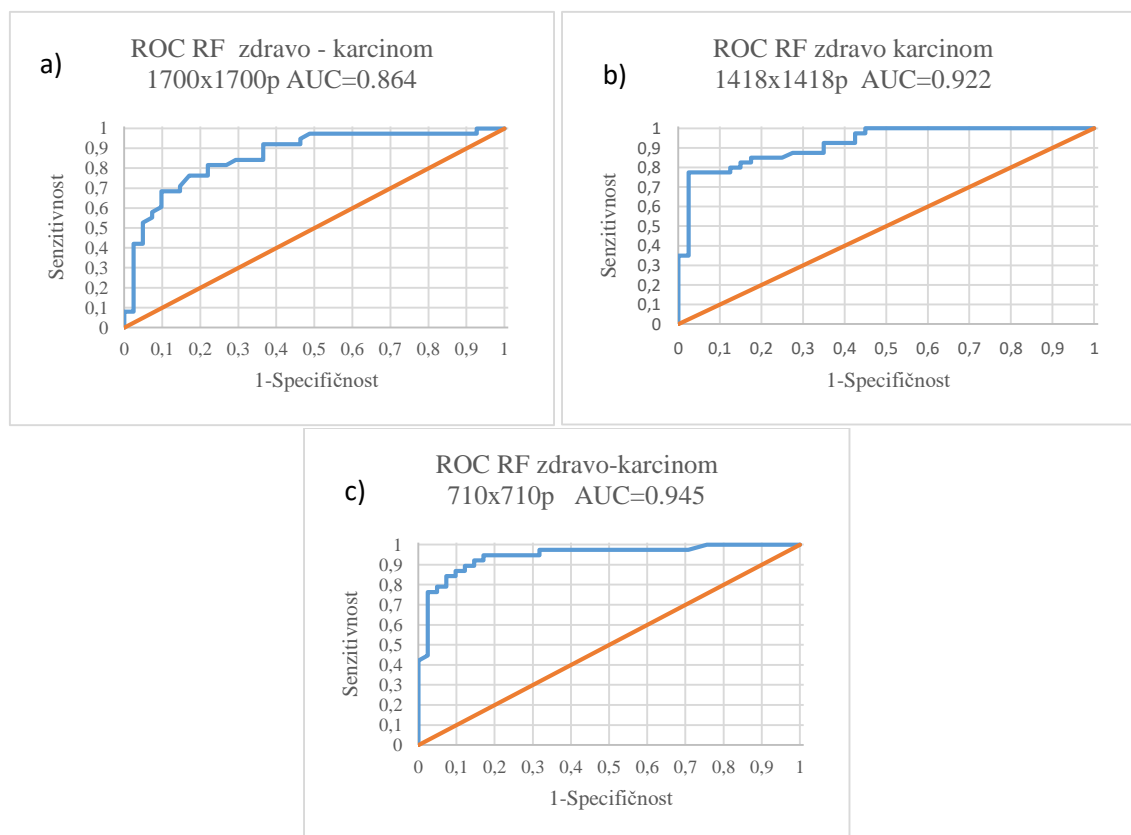
u slučaju zdravog tkiva u kombinaciji sa tkivom pored tumora ROC kriva mnogo bliža dijagonalnoj liniji (kada se ROC kriva poklapa sa dijagonalnom linijom klasifikator vrši potpuno nasumičnu klasifikaciju).

Tabela 7.3. Dobijeni rezultati Random forest klasifikatora za tip tkiva: zdravo i tumorsko tkivo. Veličine isecanja: 1700x1700 piksela, 1418x1418 piksela i 710x710 piksela.

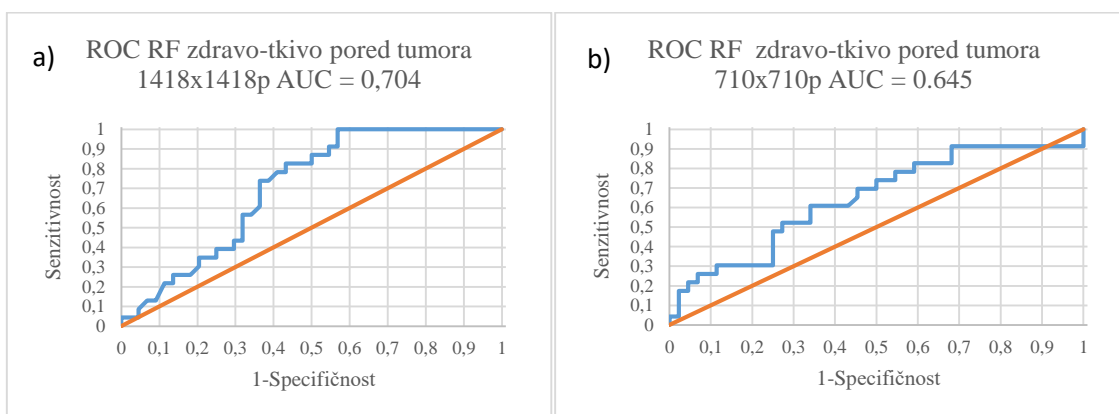
Random Forest	Cela slika 1700x1700 piksela Zdravo - karcinom	Centralni krop 1418 x 1418 piksela Zdravo - karcinom	Zona od interesa 710 x 710 piksela Zdravo - karcinom
Senzitivnost %	84.21	87.50	84.21
Specifičnost %	63,41	72.50	90.24
Tačnost %	73.42	80.00	87.34

Tabela 7.4. Dobijeni rezultati Random forest klasifikatora za tip tkiva: zdravo i zdravo pored tumora. Veličine isecanja: 1418x1418 piksela i 710x710 piksela.

Random Forest	1418 x 1418 piksela Zdravo – tkivo pored tumora	710 x 710 piksela Zdravo – tkivo pored tumora
Senzitivnost %	73,91	43.48
Specifičnost %	63,64	75,00
Tačnost %	67.16	64.18



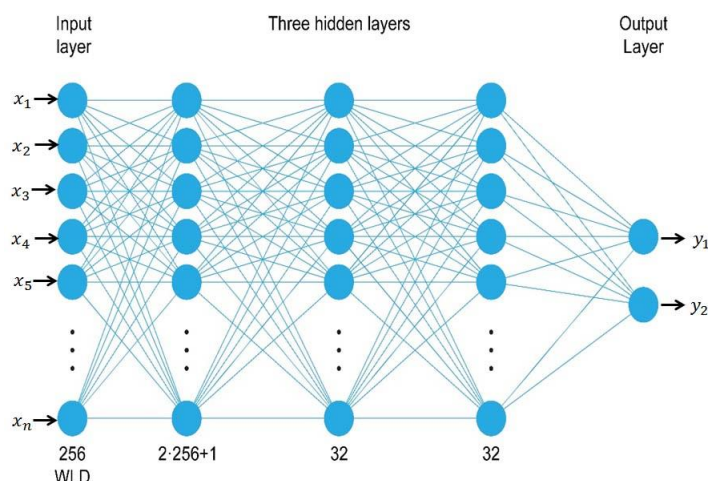
Slika 7.21. ROC kriva za tri vrste klasifikacije pomoću Random Forest klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1700x1700 piksela (Sl. 7.1c), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličina isecanja 1418x1418 piksela (Sl. 7.2c), klasifikacija zdravog tkiva i karcinoma, veličine isecanja 710x710 piksela (Sl. 7.3c).



Slika 7.22. ROC kriva za dve vrste klasifikacije pomoću Random Forest klasifikatora: klasifikacija zdravog tkiva i tkiva u blizini tumora, Sl. 7.2 - veličina isecanja od 1418x1418 piksela i Fig. 7.3 - veličina isecanja od 710x710 piksela.

Kao treći klasifikator, jednostavan, a ujedno snažan i dovoljno složen da obuči model za klasifikaciju različitih tipova tkiva korišćen je višeslojni perceptron. Za pronalaženje optimalnih parametara primenjen je postupak pretraživanja mreže. Tokom pretraživanja mreže pronađene su sve kombinacije parametara, a svaka kombinacija obučena je kao jedinstveni model krosvalidacijom. Zatim je model testiran i izračunate su parametri neophodni za ocenu kvaliteta. Na samom kraju su rangirane najbolje kombinacije i najbolji model je potpuno obučen i testiran. U proceduri pretraživanja mreže korišćeni su sledeći parametri: broj skrivenih slojeva, broj neurona unutar skrivenih slojeva, brzina učenja i impuls brzine učenja (smanjivanje varijacije kod gradijenta greške). Izabrana mreža imala je pet slojeva, pri čemu je prvi sloj bio ulazni, tri srednja sloja su bila skrivena, a poslednji je bio izlazni sloj. Prvi sloj imao je 256 ulaznih neurona ili čvorova, koji su predstavljali vrednosti intenziteta kod 256 razlika talasnih dužina. Među skrivenim slojevima prvi je imao 513, a druga dva po 32 čvora. Broj čvorova prvog sloja dobijen je narednim proračunom, dva puta broj ulaznih čvorova plus jedan dodatni čvor, iz razloga pravljenja više kombinovanih parametara za obuku modela. Sledeća dva sloja su imala po 32 čvora kako bi se suzio broj do najvažnijih parametara. Izlazni sloj imao je samo dva čvora, pri čemu je prvi predstavljao zdravo stanje tkiva (ne-rizično), a drugi predstavlja karcinom (rizično), slika. Ova dva izlazna čvora su izlazne klase. Analizirani uzorak pripada klasi čiji čvor u završnom sloju uma veću vrednost. Vrednost stope učenja i učestalosti stope učenja bile su 0,35 odnosno 0,45. Izabrani parametri i dobijena struktura prilikom mrežnog pretraživanja najbolju kefikasnost su imali u izabranom slučaju.

Model se trenira kroz iteracije i sa svakom novom iteracijom izračunati vrednosti izlaza za svakog pacijenta se porede sa njegovim realnim stanjem. Ako se rezultati na izlazu poklapaju sa željenim vrednostima za svakog, srednja kvadratna greška se smanjuje a težinski koeficijenti se zadržavaju za odgovarajući neuron. A u slučaju gde se izlaz ne poklapa sa realnim stanje, algoritam ažurira težinske koeficijente kako je objašnjeno u poglavlju 5 i prilogu 1. Dakle, model prolazi kroz iteracije sve dok kvadrat greške ne postane 0. U pogledu korišćenih podataka, odnos podele je bio 90-10, što je značilo da je 90 procenata podataka bilo u obuci, a 10% u setu za testiranje. Ovaj postupak je korišćen kod pretraživanja mreže. Nakon dobijanja optimalnih parametara korišćena je unakrsna validacija da bi se ispitalo u kom stepenu podele je trenirani model najefikasniji i pokazalo se da je taj odnos 82,5-17,5%.



Slika 7.23. Skica primenjene višeslojne perceptronske neuronske mreže, prilagođena Kolmogorovom Mapirajućom neuronskom mrežom prema referenci [35]. Intenzitet WLD (256) je ulazni sloj (x_1, x_2, \dots, x_n), prvi skriveni sloj ima 513 veštačkih neurona ($2 \times 256 + 1$), dok drugi i treći skriveni sloj imaju 32 veštačka neurona. Izlazni sloj ima dve vrednosti y_1 (ne-rizično ili zdravo) i y_2 (rizično ili karcinom) [65].

Predstavljeni rezultati u Tabelama 7.5 i 7.6 pokazuju smanjenje tačnosti. Najniža, 30%, primećena je za osetljivost upotrebom višeslojne neuronske mreže za isecanje 710x710p. Ovo ukazuje da je OMIS metoda osetljiva na veličinu i lokaciju isečenog regiona. Zbog toga će lekari biti u mogućnosti da prilikom korišćenja ove metode odluče koja veličina područja će se ukloniti.

Tabela 7.5. Dobijeni rezultati višeslojne perceptron neuronske mreže za tip tkiva: zdravo i tumorsko tkivo. Veličine isecanja: 1700x1700 piksela, 1418x1418 piksela i 710x710 piksela [65].

Višeslojna perceptron neuronska mreža	Cela slika	Centralni krop	Zona od interesa
	1700 x 1700 piksela	1418 x 1418 piksela	710 x 710 piksela
	Zdravo - karcinom	Zdravo - karcinom	Zdravo - karcinom
Senzitivnost %	71.43	82.14	96.30
Specifičnost %	85.19	77.78	88.89
Tačnost %	78.54	80.00	92.59

Tabela 7.6. Dobijeni rezultati višeslojne perceptron neuronske mreže za tip tkiva: zdravo i zdravo pored tumora. Veličine isecanja: 1418x1418 piksela i 710x710 piksela [65].

Višeslojna perceptron neuronska mreža	1418 x 1418 piksela	710 x 710 piksela
	Zdravo – tkivo pored tumora	Zdravo – tkivo pored tumora
Senzitivnost %	42.86	30.00
Specifičnost %	88.89	96.30
Tačnost %	68.75	68.09

7.2.3 Novi algoritam za pred obradu podataka

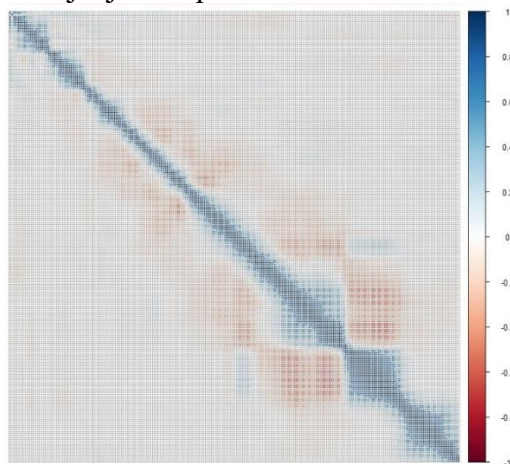
Primenom prethodnog algoritma obezbeđuje se da se postigne maksimalna tačnost klasifikatora međutim broj promenljivih koje algoritam odredi je i dalje relativno veliki (preko 50 promenljivih koje zavise od vrste OMIS dijagrama, odnosno veličine slike). Suština novog algoritma sastoji se u tome da se smanji broj promenljivih tako što će se pronaći one koje imaju najviše uticaja na rad klasifikatora. Polazna pretpostavka u svakoj obradi podataka je da su promenljive koje opisuju neki proces (u ovom slučaju WLD) međusobno nezavisne [83,84].

U slučajevima gde se neka od promenljivih menja zajedno sa nekom drugom među njima postoji jasna povezanost i može se reći da dve promenljive nose istu informaciju o posmatranom procesu (npr. visina čoveka i dužina njegovih ruku, ako je čovek veći onda su mu i ruke duže). Ovakve promenljive su korelisane i promena jedne uslovljava promenu druge (važi i obrnuto). U slučajevima gde ne postoji korelacija između promenljivih može se zaključiti da su promenljive nezavisne, stoga se obe moraju analizirati kako bi se dobila potpuna slika posmatranog procesa.

Kod OMIS podataka, za određivanje korelacije između promenljivih upotrebljen je korelacioni koeficijent definisan jednačinom ispod (videti prilog 1) [91]. Uz pomoć korelacionog koeficijenta analizira se da li između promenljivih postoji linearna veza pri čemu vrednosti koeficijenta mogu da se kreću od -1 do 1. Kada su vrednosti 1 ili -1 dve promenljive u potpunosti linearno zavise jedna od druge, dok su u slučaju kada je koeficijent 0 promenljive međusobno linearno nezavisne [95,96].

$$COR(X, Y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad [7.1]$$

Kod algoritama, kao što je algoritam za klasifikaciju Naive Bayes, polazi se od pretpostavke da su promenljive međusobno nezavisne. Uvođenjem ovakve pretpostavke može se značajno smanjiti broj promenljivih koje je neophodno analizirati, a samim tim i kompleksnost modela. Drugim rečima se traži minimalni broj promenljivih koje jednoznačno opisuju posmatrani proces. Primenom metode korelacionih koeficijenta na OMIS rezultate dobijeno je da postoje veliki korelacioni koeficijenti između susednih promenljivih što se može videti na slici 7.24. Ovakve vrednosti korelacionog koeficijenta govore da talasne dužine linearno zavise jedna od druge, stoga je moguće pa čak i neophodno da se eliminišu sve one koje imaju visoku korelaciju odnosno zajedno nose istu informaciju, što bi dovelo do smanjenja kompleksnosti modela.



Slika 7.24. Korelacioni koeficijenti između WLD. Međusobna korelacija je predstavljena „matrično“ gde je intenzitet korelacije prikazan pomoću intenziteta boje.

Potrebno je naglasiti da se u slučaju prethodnog algoritma korištenjem „*rfe()*“ funkcije nisu eliminisale zavisno promenljive već je algoritam isključivo pratio uticaj svake promenljive na tačnost

klasifikatora. U ovom slučaju su eliminisane sve promenljive koje smanjuju njegovu tačnost, dok sam algoritam *rfe()* ne prati korelaciju između WLD. Analizirajući rezultate i broj promenljivih ostavljenih nakon primene *rfe()* algoritma (Tabele 7.7 i 7.8) vidi se da se u različitim slučajevima klasifikacije broj WLD koje se koriste za obuku klasifikatora značajno razlikuje. Detaljnijom analizom rezultata, nakon primene ovakvog algoritma, jasno se uočava da je veliki broj preostalih WLD za klasifikaciju i dalje značajno korelisan sa svojim susedima, što je posebno izraženo u slučajevima gde je ostavljeno preko 100 WLD.

U literaturi se mogu pronaći razni modeli bazirani na analizi korelacije promenljivih i njihovom uticaju na ishod klasifikacije. Ovi algoritmi se sastoje u određivanju „važnih promenljivih“, putem njihovog rangiranja na osnovu nekog kriterijuma, a zatim analizom njihove korelacije i eliminacijom redundantnih komponenata. [96, 97]. Već postojeća funkcija koju u svom radu koristi i *rfe()* algoritam se bazira na određivanju važnosti promenljivih na osnovu AUC koji se dobija kada se ROC kriva odredi za svaku promenljivu posebno. [94]. Ovako određena ROC kriva predstavlja dobar pokazatelj uticaja svake pojedinačne promenljive na rezultat klasifikacije [96].

Za potrebe analize OMIS dijagrama razvijen je novi algoritam baziran na određivanju važnosti promenljivih pomoću površine ispod ROC krive (AUC) i analizom međusobne korelacije promenljivih baziranoj na primeni korelacionog koeficijenta (Videti prilog 2). Algoritam se može opisati u nekoliko koraka:

1. Sve WLD su rangirane na osnovu ROC krive gde je najvažnija ona sa najvećom AUC. Za ovaj deo algoritma iskorišćena je već postojeća funkcija „*filterVarImp()*“ iz „CARET“ paketa koja računa ROC i AUC za svaku pojedinačnu WLD tako da se odrede specifičnost i senzitivnost pomerajući granicu odsecanja, ako bi se vršila klasifikacija samo sa osnovu jedne WLD [94]. (Slika 7.25)

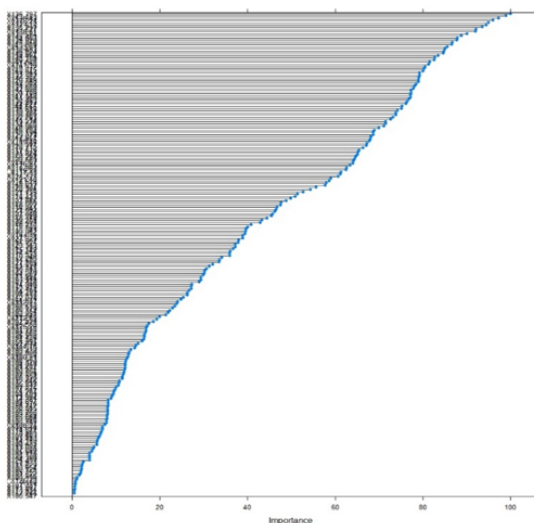
2. U Sledećem koraku se bira promenljiva koja ima najveću važnost odnosno AUC i sa kojom se porede sve ostale, a eliminišu se one koje sa njom imaju korelacioni koeficijent veći od unapred zadate vrednosti.

3. Kada se eliminišu sve promenljive koje su korelisane sa prvom onda se, bira druga promenljiva sa najvećom AUC, a koja je preostala u skupu nakon eliminacije.

4. Sada se druga promenljiva poređi sa svim ostalim (sem sa prethodnom, jer sa njom već ima nisku korelaciju) kako bi se eliminisale promenljive koje sa njom imaju koeficijent korelacije veći od zadate vrednosti.

5. Ovo se ponavlja sve dok se ne eliminišu sve promenljive sa visokim korelacionim koeficijentima.

6. Nakon primene ovog metoda vrši se obuka klasifikatora na preostalim promenljivim.

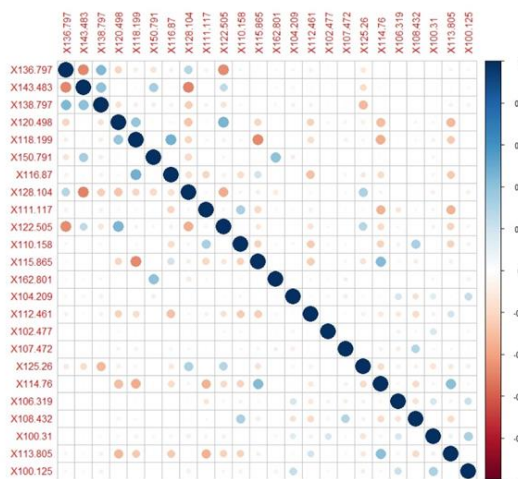


Slika 7.25. Važnost promenljivih, nakon primene *filterVarImp()*.

Primenom ovog metoda za predobradu podataka smanjuje se broj WLD koje se koriste za klasifikaciju sa polaznih 220 na 10-40 talasnih dužina u zavisnosti od granice za maksimalni koeficijent korelacije (Slika 7.26). Druga posledica ovog algoritma je da nove talasne dužine nemaju ni jednu međusobnu vrednost koeficijenta korelacije veću od unapred definisane. Primenjujući ovakav metod dobijeni rezultati klasifikatora se razlikuju za nekoliko procenata u odnosu na one koji su dobijeni pomoću „*rfe()*“ algoritma međutim osnovna prednost sastoji u tome što je broj promenljivih i do 5-10 puta niži u odnosu na polazni broj WLD i što su eliminisane sve linearno korelisane promenljive. Oba klasifikatora (NB i RF) su testirana u 3 različita slučaja za maksimalne korelacione koeficijente (0,75, 0,5 i 0,25), za sve kombinacije uzoraka i rezultati su prikazani u tabeli 7.7 u slučaju NB i tabeli 7.8 za RF. Dobijeni rezultati su pokazali da je najmanji broj promenljivih kod maksimalnog korelacionog koeficijenta od 0,25 i raste sa porastom korelacionog koeficijenta. Broj WLD kod *rfe()* uglavnom se kretao između 100 i 200 WLD neophodnih za klasifikaciju sa najvećom tačnošću dok je u jednom slučaju njihov broj pao na 18, a kod novog algoritma ovaj broj WLD nije prešao 40 za vrednost koeficijenta 0,75 i 10-15 WLD-a za vrednost od 0,25. Tačnost NB klasifikatora opada sa smanjenjem broja WLD koje se koriste za klasifikaciju, u slučaju RF klasifikatora njegova tačnost je u nekim slučajevima bila čak i veća od one dobijene nakon primene *rfe()*. Interesantno je napomenuti da je WLD = 136.797 izdvojena kao dominantna za sve tipove podatka.

Tabela 7.7. Tačnost klasifikatora u slučaju primene Naive bayes-a sa prethodnom obradom podataka pomoću *rfe()* i novog algoritma za različite vrednosti maksimalno dopuštenog korelacionog koeficijenta. Kao dodatna informacija u efikasnosti novog algoritma za predobradu podataka u zagradama su navedeni i broj promenljivih koje su učestvovalе u klasifikaciji.

Maksimalna Korelacija	1700p	1418p Z-K	710p Z-K	1418p Z-	710p Z-TPT
1 (<i>rfe()</i>)	78.54%	80.00%	92.59% (125)	68.75%(137)	68.09%(18)
0,75	74,68%(114)	78,75%(33)	87.34% (39)	67,16%(31)	68.66% (36)
0,5	69,62%(100)	82,5%(19)	82.28% (24)	67,16% (24)	71,64% (23)
0,25	69,62%(100)	80,00%(10)	78.48% (15)	64,18 % (11)	65,68% (13)



Slika 7.26. Korelacioni koeficijent nakon primene novog algoritma za maksimalnu vrednost koeficijenta korelacije od 0,75. WLD = 136.797 predstavlja dominantnu promenljivu dobijenu tokom primene algoritma na svim tipovima uzoraka.

Tabela 7.8. Tačnost klasifikatora u slučaju primene Random Forest-a sa prethodnom obradom podataka pomoću *rfe()* i novog algoritma za različite vrednosti maksimalno dopuštenog korelacionog

koeficijenta. Kao dodatna informacija u efikasnosti novog algoritma za predobradu podataka u zagradama su navedeni i broj promjenljivih koje su učestvovalе u klasifikaciji.

Maksimalna korelacija	1700p Z-K	1418p Z-K	710p Z-K	1418p Z-TPT	710p Z-TPT
1	73.42%(140)	80.00%(201)	89.87 (114)	67.16% (127)	64.18%(175)
0,75	78.48%(34)	78,75%(33)	86.08% (39)	62.69%(31)	65.67% (36)
0,5	82.28%(21)	78.75%(19)	87.34% (24)	64.18% (24)	64,18% (23)
0,25	79.75%(11)	77.5 %(10)	87.34% (15)	68.66 %(11)	65,68%(13)

7.3 JR-6A Spinner Magnetometar

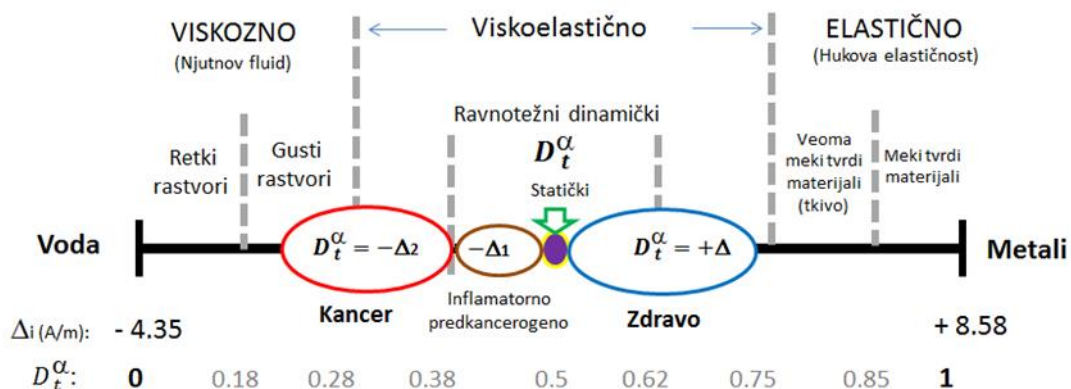
Kao što je već spomenuto, JR-6A instrument, sa tačnošću od 2.4 [μA] ili [3pT], korišćen je za merenje preostalog magnetizma kod 76 uzoraka. Za uzorke tkiva korišćeni su zasebni kontejneri, veličine prečnika 25,4 mm i dužine 22 mm. Svaki uzorak je meren pet puta da bi se smanjile greške u merenju i izračunata je prosečna vrednost. Dobijene vrednosti pokazuju razliku između normalne sluznice i kolorektalnog karcinoma i potvrđuju postojanje razlika u merenju paramagnetnih i opto-magnetnih svojstava zdravog i kanceroznog tkiva. Rezultati su predstavljeni u tabeli 7.9, a podeljeni su prema TNM klasifikaciji u tabeli 6.1.

Tabela 7.9. Rezultati izmerenih uzoraka normalne mukoze i CRC koristeći JR-6A, i klasifikovani su prema TNM klasifikaciji i klasifikaciji faza.

Stadijum kolorektalnog karcinoma	Broj uzorka	Primarni tumor T	Zdravog tkiva (10 ⁻³ [A/m])	Vrednost kolorektalnog karcinoma (10 ⁻³ [A/m])	Razlika 10 ⁻³ [A/m])
1	2	3	4	5	6 = 4-5
Stadijum I	1.	T1	0,0352	0,0350	2.0
	2.	T2	0,0707	0,0433	27.4
	3.	T2	0,1915	0,0273	164.2
	4.	T2	0,0794	0,0447	34.7
	5.	T2	1.3647	0.3455	1019.2
	6.	T2	8.5420	0.9301	7611.9
	7.	T3b	1,6876	0,1013	1586.3
Stadijum II	8.	T3b	0,1514	0,0473	104.1
Stadijum IIA	9.	T3b	0,1451	0,0430	102.1
	10.	T3a	0,0750	0,0570	18
	11.	T3	1,4120	0.0412	1370.8
Stadijum III	12.	T3b	0,1482	0,0795	68.7
	13.	T3b	0,0692	0,0273	41.9
	14.	T3c	0,1389	0,0491	89.8
	15.	T3c	0,0920	0,0202	71.8
	16.	T3a	0,0696	0,0392	30.4
	17.	T4a	1.7968	0.8168	1080
Stadijum IIIA	18.	T2b	0,2951	0,0526	242.5

Stadijum IIIB	19.	T2b	0,1282	0,0588	69.4
	20.	T3b	0,1926	0,0661	126.5
	21.	T3b	0,1022	/	/
	22.	T3b	0.8778	0.7602	117.6
	23.	T3c	9.0313	1.2720	7759.3
	24.	T3a	0,1083	0,0815	26.8
	25.	2T	0,1550	0,0383	116.7
	26.	T3d	0,2315	0,0245	207
Stadijum IIIC	27.	T3c	0,0483	0,0466	1.7
	28.	T4b	1,4146	0,0621	1352.5
Stadijum IV	29.	T4a	0,1736	0,0915	82.1
	30.	T4	0,1304	0,0478	82.6
Stadijum IVA	31.	T3c	0,1448	0,0293	115.5
	32.	T3c	0,2651	0,0276	237.5

Na bazi parametarskog frakcionog modela ($D_t^\alpha : 0 < \alpha < 1$) datog u Poglavlju 5, ravnotežni frakcioni izvod za tkivo nije jedna vrednost, jer tkivo je dinamički sistem kod koga se odnos nesparenih i sparenih elektrona u vremenu menja, pa zbog toga vrednosti paramagnetizma i dijamagnetizama osciluju. Kako je zdravo tkivo *harmonično usklađeno* [98,99] to je onda njegova vrednost ~ 0.62 ($0.61803\dots$) u sistemu $0 < \alpha < 1$. Prelomna tačka kada se tkivo ne može iz poremećenog stanja vratiti u normalno (zdravo) je kvadrat navedene vrednosti, tj. 0.38 , jer $0.62 + 0.38 = 1$. Ako 0.62 obeležimo sa ϕ , a 0.38 sa ϕ^2 , tada dobijamo jednačinu $\phi^2 + \phi = 1$, odnosno $\phi^2 + \phi - 1 = 0$. Rešenja ove jednačine su $(\sqrt{5} - 1)/2$ i $-(\sqrt{5} + 1)/2$, što predstavlja ϕ i $-\Phi$, odnosno 0.61803 i -1.61803 . Kako je $|\phi| \times |\Phi| = 1$ to se D_t^α može primeniti i sa inverznim preslikavanjem $1/\phi = \Phi$. Ovo ukazuje da kancer može biti i u formi veoma mekog tvrdog materijala, tj da su vrednosti remanentne magnetizacije kancerogenog tkiva manje od zdravog tkiva (kao što je to eksperimentalno dobijeno, Tabela 7.9).



Slika 7.27. Rezultati biomehanike tkiva na bazi parametarske ocene frakcionog dinamičkog modela. Većina kancerogenog tkiva (preko 85% slučajeva) ima frakcioni izvod manji od 0.38 ($0.22 < D_t^\alpha < 0.38$) i oko 15% ima frakcioni izvod $0.75 < D_t^\alpha < 0.88$, dok zdravo tkivo ima frakcioni izvod $0.50 < D_t^\alpha < 0.75$, a inflamatorno $0.38 < D_t^\alpha < 0.05$.

Dobijeni rezultati u većini slučajeva (preko 85% slučajeva) pokazuju veće vrednosti frakcionog izvoda za zdravo tkivo. Oduzimajući vrednosti između dve grupe (zdrave / kancerogene), najveća razlika u dobijenim podacima je u fazi I, a kasnije, kako faza CRC raste, razlike u vrednostima

sesmanjuju. Upoređujući rezultate JR-6A i OMIS, može se primetiti da obe metode jasno razlikuju zdravo tkivo od kanceroznog tkiva.

8 DISKUSIJA

Kolorektalni karcinom je značajan zdravstveni problem širom sveta, a skoro 55% slučajeva se javlja u industrijski razvijenijim zemljama. U nekim zemljama se beleži ukupno smanjenje incidencije kolorektalnog karcinoma kolonoskopskim uklanjanjem premalignih lezija, tj. kolorektalnih adenoma [100]. Prevedeno u statistiku, 85% kolorektalnog karcinoma razvija se iz kolorektalnih polipa [101], a obično im je potrebno od 8 do 10 godina za malignu transformaciju [26]. Histološki, najčešća malignost debelog creva je adenokarcinom (90%) sa rektalnom i sigmoidnom lokalizacijom (75%), zatim slepo crevo i ascendentno debelo crevo (15%), međutim poslednjih decenija primećen je pomak ka proksimalnim segmentima debelog creva korišćenjem kolonoskopija [102]. Preostalih 10% slučajeva obuhvataju druge histološke vrste karcinoma debelog creva, kao što su karcinoid, anaplastični karcinom i skvamozni karcinom, kao i različite vrste limfoma [103] i melanomi [104]. Pored otkrivanja i lečenja premalignih lezija, kolonoskopija je „zlatni standard“ za otkrivanje kolorektalnog karcinoma [105, 106], ali su se druge optičke metode uspešno primenjivale u otkrivanju i diferencijaciji lezija debelog creva.

Optička svojstva zdravog i obolelog ljudskog tkiva su neophodna ako želimo koristiti optičke metode za medicinsku primenu u dijagnostici i terapiji. Danas se koriste različite tehnike za otkrivanje ljudskih lezija [107-110]. Najčešće korišćene optičke metode su Ramanova spektroskopija, NIR spektroskopija, Fourier-ova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIR) i difuzna spektroskopija. Ramanova spektroskopija je pogodna za dijagnostiku malignosti zbog svoje osetljivosti na otkrivanje malih molekularnih promena tipičnih za rak, kao što su odnos proširenog jedra i citoplazme, neorganizovani hromatin, povećana metabolička aktivnost i promene nivoa masti i proteina [111]. Prvi *in vivo* Ramanov spektar ljudskog gastrointestinalnog tkiva prijavljen je 2000. godine i pokazao je izvodljivost Ramanove spektroskopije optičkim vlaknima za klasifikaciju bolesti tokom *in vivo* kliničke gastrointestinalne endoskopije [112]. Molckovski i dr. [113] prvi su koristili Raman *in vivo* u debelom crevu da bi diferencirali normalne polipe tkiva, hiperplastike i adenomatoze. Koristili su prilagođenu vlakno-optičku sondu ("Visioneek", Enviva Raman Probes, Visionek Inc.), u početku na uzorcima *ex vivo*. Analizom 54 spektra *ex vivo* uzoraka polipektomije (20 hiperplastičnih polipa i 34 adenom uzetih od 5 pacijenata) bili su u stanju da razlikuju adenom sa osetljivošću od 91% i specifičnošću od 95%, koristeći dugačka vremena akvizicije podataka od 30 sekundi. Opširnija *ex vivo* merenja izveli su Vidjaja i dr. [114] u 2008. godini. 156 Ramanovih spektara izmereno je na 105 uzoraka tkiva kod 59 pacijenata, uključujući 41 uzorak normalnog tkiva, 18 hiperplastičnih polipa i 46 uzoraka tkiva koji sadrže kolorektalni adenokarcinom. Adenomi, potencijalno prekarcinozni polipi, nisu uključeni u ovo istraživanje. Koristeći vremena akvizicije od 5 sekundi, razvili su dijagnostičke algoritme koji su identifikovali normalno tkivo sa 98,8–99,8% osetljivosti i 100% specifičnosti, hiperplastični polipi sa 100% osetljivošću i 100% specifičnošću i kancerozno tkivo sa 100% osetljivošću i 98,1–99,7% specifičnost. Nedavni rad Short i dr. ispitao je moguću upotrebu ramana visoke frekvencije u debelom crevu, merući talasne tačke od 2050 do 3100 cm^{-1} [115]. Iako su karakteristični vrhovi uglavnom otkriveni na nižim talasnim brojevima, merenje u ovom većem opsegu smanjuje efekte autofluorescencije tkiva i emisije u kateteru koji sadrži optička vlakna, za šta je potrebna post-obrada i skupi optički filtri. Ovo malo istraživanje *ex vivo* uzoraka svežeg tkiva pokazalo je da je moguća diferencijacija patoloških podtipova karcinoma korišćenjem ovih talasa sa vremenom akvizicije od 1 sekunde.

FTIR spektroskopija *in vitro*, meri apsorpciju infracrvenog zračenja hemijskim vezama u funkcionalnim grupama molekula. Frekvencijski rasponi apsorpcije molekula su u korelaciji sa strukturom ovih molekula [116]. Difuzna refleksna spektroskopija [117] takođe se koristi za razlikovanje tumora od zdravog tkiva karakterizacijom svakog sloja sa pet histoloških parametara: zapreminski udeo u krvi, zasićenje hemoglobinom, veličina raspršenih čestica [118], uključujući kolagen, zapreminski udeo čestica raspršivanja i debljina sloja i tri optička parametra: faktor anizotropije, indeks loma materijala i indeks loma čestica raspršivanja [119]. Studija iz 2004. godine sprovedla je FTIR preslikavanje uzorka rektalnog uzorka raka i procenila metode analize podataka za

interpretaciju [120]. Upoređeno je nekoliko metoda računске analize, uključujući fuzzi-C, znači: grupisanje (FCM), k-sredstvo klasteriranja (KMC) i aglomerativno hijerarhijsko (AH) grupisanje, i utvrđeno je da AH daje najbolju diferencijaciju strukture tkiva. Kallenbach-Thieltges et al. istraživali su FTIR u kombinaciji sa imunohistohemijskim bojenjem. Deparafinizirani preseki tkiva analizirani su transfleksionim režimom FTIR, a podaci su analizirani klasifikatorom slučajnih stabala. Nakon spektralnog merenja, izvršeno je bojenje imunohistohemije (IHC), najpre za strukture vezivnog tkiva i mucin, a zatim mrlje da bi se istakla kancerозна ili proliferativna aktivnost (p53, Ki-67). Ova studija je pokazala dobru povezanost FTIR-a i IHC-a u identifikovanju regiona aktivnosti raka [121,65].

Kraft i svi u 2009. godini pokazali su prve Ramanove i CARS podatke debelog creva, koji mogu definisati buduće trendove spektralnog snimanja [122]. CARS slike su snimane u različitim Stokesovim pomacima između 1000 i 3100 cm^{-1} . Selektivne proteinske i lipidne trake su rezonantno ispitivane. Sve slike CARS-a dobro su povezane sa fotomikrografima, jer su nerezonantni signali pružili značajne morfološke informacije. Takođe, slike su dobro povezane sa Ramanovim slikama. Dobijanje i obrada Ramanovih slika bila je mnogo teža čak za tri reda veličine, a i mnogo više vremena je potrebno dobijanje slike nego za dobijanje CARS slika [65].

Prema minimalno invazivnoj detekciji malignog tkiva debelog creva, Bindig i ostali su uporedili pacijentove spektre svežeg, normalnog i malignog tkiva dobijenih upotrebom nekontaktnog IR-mikroskopa i kontaktne optičke sonde u vidu vlakna. Najbolji rezultati dobijeni su eksperimentalnom postavkom u kojoj su pobuđivanje i detekcija vlakana imali ugao pada 60,8. Udaljenost vlakna do tkiva koja se koristi kod nekontaktnog IR-mikroskopa održavana je na 0,5 mm. U poređenju sa rezultatima IR mikroskopa, spektralne karakteristike sonde optičkih vlakana bile su konzistentne i kompaktne. Još važnije, dozvoljene su spektralne informacije za razlikovanje normalnog i malignog tkiva debelog creva [65].

Pored toga, spektri nesušenog tkiva dobijenih IR mikroskopom mogu se verifikovati u poređenju sa IR merenjima uzoraka osušenog tkiva dobijenim interferometrom na bazi optičkih vlakana. Ovi rezultati pokazali su da je moguće dobiti korisne spektre sa minimalnim ometanjem vode u blizini površine tkiva. Utvrđeno je da se „preslikavanje“ optičkih vlakana može izvesti na dehidratatisanom tkivu debelog creva i da može da razlikuje normalno i tumorsko tkivo kod pacijenata. Pored toga, ova studija je pokazala da ako su dostupne manje sonde, moguće je izvršiti pouzdana i prediktivna merenja in vivo [123, 65].

Rezultati prethodno predstavljenih spektroskopskih metoda otvorili su vrata za razvoj novih, metoda, a jedna od njih neinvazivna OMIS metoda, predstavljena je u ovoj disertaciji. Sprovedeno istraživanje, zasnovano na kropovanim slikama dve grupe (normalna mukoza / tumor; normalna mukoza / tkivo u blizini tumora), pokazalo je različite vrednosti osetljivosti, specifičnosti i tačnosti. Objašnjenje ovog rezultata je prisustvo zdravih i tumorskih ćelija u uzorku. Ovaj problem se može rešiti isecanjem i odvajanjem nezdrave regije od zdrave, bez obzira koliko one bile male, čak i veličine od 24 piksela, što je jednako kvadraturi 75x75 μm . Iako bi ovaj „obrazac“ rezultirao mnogo većom tačnošću, način da se to postigne još uvijek nije poznat.

Za klasifikaciju podatka dobijenih OMIS metodom korišćeno je nekoliko različitih veličina slika koje su uzorkovane tako da pokriju određen deo uzorka. Veličina 1700p izabrana je tako da se dobije slika koja će pokriti što veću površinu snimljenog uzorka. Zatim, veličina kropa 1418p birana je tako da tako da se fokusira na određeni deo uzorka koji je značajan, a da pri tome obuhvati što veću površinu, dok je veličina kropa 710p korišćena da se fokusira na određeni deo slike od značaja.

Analizom rezultata može se uvideti da je najveća tačnost (oko 90% uzoraka je ispravno klasifikovano u test setu) klasifikacije postignuta kod veličine kropa od 710p, dok je najmanja tačnost postignuta na test setovima sa veličinom slike od 1700p. Najveća tačnost klasifikacije postignuta je kod podele na zdravo tkivo i karcinom gde je jasno fokusiran karcinom sa najmanjom veličinom kropovane slike, a sa porastom veličine kropa tačnost opada, i kod 1700p je oko 15% niža u odnosu na 710p. U slučaju „graničnih“ segmenata tkiva „tkivo pored tumora“ i njegovog poređenja sa zdravim, rezultati su pokazali da je tačnost dosta niža (oko 20% i više) u poređenju sa podelom na zdravo i bolesno. Ove rezultate prate i rezultati dobijeni pomoću ROC krivih gde se jasno vidi da je

pri podeli na zdravo i bolesno AUC je mnogo veći nego kod klasifikacije na zdravo i zdravo pored tumora, što govori da je ROC kriva bliža dijagonalnoj liniji u kojoj bi se slučaju podaci nasumično klasifikovali [84, 124]. Ovakvi rezultati pokazuju da su manji kropovi dosta precizniji, odnosno da se manjim kropovima mogu dosta preciznije obuhvatiti bolesno tkivo. Sa povećanjem veličine krova postoji mogućnost da je i pored bolesnog tkiva u analizu sa OMIS metodom obuhvaćen i deo zdravog tkiva oko kancera koji može da dovede do pogrešnog klasifikovanja uzorka. Kao dodatna potvrda ove pretpostavke su rezultati (pogotovo oblik ROC krive) dobijeni pri analizi zdravog i tkiva pored tumora, gde je vrednost AUC veoma niska (oko 0,7 i manja), što dovodi do zaključka da su tkiva slične prirode odnosno da postoji naznaka da je u pitanju tkivo izmenjenih karakteristika (slike tkiva pored tumora) u odnosu na zdravo, ali da nije u potpunosti zahvaćeno karcinomom. Na ovaj način je jasno pokazano da primenjeni metod OMIS i algoritam klasifikacije daje pouzdane rezultate pri detekciji karcinoma debelog creva.

U okviru analize OMIS dijagrama razvijen je i novi algoritam koji predstavlja kombinaciju dva popularna metoda za pred obradu slika baziranih na određivanju važnosti promenljivih i analizi njihove međusobne linearne korelacije [96,97]. Visoka linearna korelacija govori da promena jedne promenljive utiče na promenu druge, odnosno da dve promenljive zajedno nose istu informaciju te stoga nije neophodno da se analiziraju [125]. Novi algoritam je omogućio da se izbacе sve promenljive koje imaju korelaciju veću od izabranog praga za vrednost stepena korelacije (0,25, 0,50, i 0,75), a da se prva promenljiva odredi na takav način da ima najveći uticaj na performanse klasifikacije (ima najveću važnost). Kao metrika „važnosti“ iskorišćena je AUC kod ROC krivih za svaku pojedinačnu WLD. Primenom ovog algoritma pokazano je da je u svim slučajevima najdominantnija WLD 136,797. Tačnost klasifikacije dobijena nakon primene ovog algoritma pokazuje da se mogu zadržati navedene pretpostavke o klasifikaciji kod različitih kombinacija (zdravo – bolesno) i za različite veličine slike, međutim pokazan je pad tačnosti kako je smanjivan prag odsecanja za korelacioni koeficijent. Ovaj pad u tačnosti je posebno izražen kod NB klasifikatora dok je kod RF klasifikatora razlika značajno manja. Pokazani rezultati mogu da potvrde dobre performanse klasifikacije samog algoritma u smanjenju broja potrebnih WLD (sa preko 100-200 za većinu klasifikatora na 30-40 za maksimalnu korelaciju od 0,75; 20-30 WLD kod korelacione vrednosti od 0,5; i 10-15 za korelaciju manju od 0,25). Iz navedenog se može zaključiti da je primenom ovakvog algoritma za klasifikaciju moguće značajno uprostiti kompleksnost klasifikacije OMIS dijagrama uz relativno malu „cenu“ smanjenja tačnosti klasifikacije, međutim na osnovu rezultata se vidi da je ovakav algoritam doprineo i u povećanju tačnosti u nekim pojedinačnim slučajevima.

Takođe, od 76 prikupljenih uzoraka (32 zdrava / 31 CRC), za merenje JR-6A, iz rezultata je isključeno 13 (7 zdravih / 6 tumora): dva uzorka nisu adenokarcinom (vrsta posmatranih kolorektalnih karcinoma), a ostalih pet pokazali su suprotne vrednosti, tabela 7, u poređenju sa merenjima u tabeli 4. Objašnjenje za ovih pet slučajeva može biti promenjeno stanje tkiva pod uticajem hemoterapije ili širenje nekroze tkiva izazvane stadijem kolorektalnog karcinoma.

Tabela 8.1. Rezultati uzoraka zdravog tkiva i tkiva karcinoma isključeni iz analize merenja JR-6A. u tabeli 7.9.

Stadijum kolorektalnog karcinoma	Broj uzorka	Primarni tumor T	Zdravog tkiva(10^{-3} [A/m])	Vrednost kolorektalnog karcinoma (10^{-3} [A/m])	Razlika 10^{-3} [A/m])
1	2	3	4	5	6 = 4-5
Stadijum II	1.	T3b	0,0346	0,0434	-8.8
Stadijum III B	2.	T3c	0,1374	0,4795	-342.1

Stadijum IIIC	3.	T4a	0,0515	0,6954	-18.04
	4.	T4b	0,0285	0,0668	-38.3
Stadijum IV	5.	T3b	0,0482	0,2799	-231.7
Ne-adenokarcinomi					
Hodgkinov limfom	6.	/	0.0808	0.0678	13
Tubularni adenom – sigmoidni deo debelog creva	7.	Dysplasia epitheliali gravis Gradus II-III	0.8394	/	/

Zašto JR-6A na bazi remanentne magnetizacije, koji meri svu zapreminu tkiva, daje tačnost 86.1%, a OMIS koji meri površinske slojeve tkiva 92.6%.. Odgovor mozemo naći u parametarskom modelu, jer kako se Hukov zakon koji je jednoparametarski model (parametar α), tako se i drugi modeli mogu uopštavati dodavanjem izraza koji sadrže izvode napona i deformacije proizvoljnog reda, što dovodi do višeparamaterskog opšteg modela:

$$\sigma(t) + a_0 D_t^\alpha \sigma(t) = b_0 \varepsilon(t) + c_0 D_t^\beta \varepsilon(t) \quad [8.1]$$

Ovaj izraz se može pojednostaviti jer kod većine materijala je $\alpha = \beta$, pa je opšti model ustvari umesto petoparametarskog, četvoroparametarski model. Ako bi primenili ovaj četvoroparametarski model frakcionog računa dobila bi se i bolja tačnost razvrstavanja zdravo/bolesno, ali za to su potrebni dodatni eksperimentalni podaci koji se nisu mogli dobiti iz remanentne magnetizacije.

Dobijeni dijagrami su upoređeni sa histopatološkim izveštajima i unutar svake grupe T-stadijuma (faze T0, T1, T2, T3 i T4) utvrđene su sličnosti i razlike. Razlike pokazuju prisustvo podskupina unutar T grupe (T1a, T1b, T1c T4c).

OMIS metoda je neinvazivna jer je energija vidljive bele svetlosti i energija valentnih elektrona (tkiva) ista (od 1,8 eV do 2,6 eV) i omogućava proces ispitivanja koji se može ponoviti onoliko puta koliko je neophodno i bez ikakvog rizika od oštećenja tkiva. Uređaj u ovoj studiji je prenosiv i može se koristiti u hirurškim operativnim salama. Rezultati se mogu dobiti u roku od 7-10 minuta i nije potrebna posebna priprema uzoraka. Još jedna od prednosti je i u tome da je metoda jeftinija od drugih optičkih metoda (UV-VIS-NIR, FTIR, Ramanova i dr).

9 ZAKLJUČAK

U savremenom svetu karcinomi su oboljenja koja su postala jedan od glavnih uzročnika prerane smrti kod svih generacija. Efikasni lekovi za ovaj tip oboljenje ne postoje pa je zbog toga jedino dovoljno dobro (mada ne apsolutno sigurno) rešenje odstranjivanje obolelog tkiva iz organizma. Najbolje rešenje za ovakav tip oboljenja je prevencija koja se sastoji od inicijalnih (skrining) i redovnog praćenja (monitoring). Lekari se koriste raznim metodama i tehnikama (endoskopski pregledi, razne tehnike za akviziciju medicinske slike i dr.) kako bi mogli da daju procenu biofizičkog stanja tkiva upoređujući to sa histopatološkom nalazom tkiva. Jedna od metoda koja daje dobre laboratorijske rezultate su i spektroskopske tehnologije, međutim njihova primena je u velikoj meri ograničena jer su uređaji koji su potrebni za njihovu primenu nepraktični za klinički rad sa stanovišta medicinskih radnika. Pored toga sistem obrazovanja ne daje medicinskom osoblju znanja neophodna za obradu signal, mašinsko učenje i tumačenje rezultata. Moderne računarske tehnologije i algoritmi omogućuju mašinama da uče na osnovu postojećih podataka i da na osnovu naučenog izvrše klasifikaciju odnosno odrede biofizičko stanje tkiva, organa ili organizma.

Saglasno postavljenim ciljevima istraživanjima i očekivanim rezultatima glavni zaključci do kojih se došlo u ovoj doktorskoj disertaciji su:

1. Na uzorku od 596 slučajeva izvršeno je snimanje zdravog i kancerogenog tkiva kolona i rektuma pomoću optomagnetne imaging spektroskopije (OMIS) i u svim slučajevima dobijene su validne OMIS spektralne karakteristike tkiva.

2. Na bazi dobijenih OMIS spektara pomocu tri klasifikatora, Naïve-Bayes, Random foresta i višeslojna perceptron neuronske mreže izvršena je automatska klasifikacija epitelnog tkiva rektuma: zdravo/kancerogeno i dobijeni su sledeći rezultati tačnosti razvrstavanja: Naïve-Bayes 89.87%, Random forest 87,34% i neuronska mreža 92.59%, čime je pokazano da je OMIS metoda validna za skrining i monitoring biofizičkog stanja epitelnih tkiva (debelog creva).

3. Na uzorku od 63 ispitanika analizirane su mehaničke osobine zdravog i kancerogenog tkiva (tečno-viskoelastično-tvrdo) na osnovu podataka o remanentnom magnetizmu tkiva i pokazano je sa tačnošću 86.1% da zdravo tkivo ima bolja mehanička (viskoelastična) svojstva nego kancerogeno tkivo, što je u saglasnosti sa eksperimentalnim biohemiskim rezultatima kod kojih je pokazano da kancerogeno tkivo, u odnosu na zdravo, ima oko 21% više vode.

4. Da je doktorska disertacija otvorila mogućnosti za razvoj tehnika / metoda ne samo za skrining i monitoring već i za ranu, neinvazivnu dijagnostiku karcinoma debelog creva na bazi kombinacije OMIS metode i kolonoskopa.

Glavni rezultat ove doktorske disertacije su rezultati primene Opto-magnetne imidžing spektroskopije na analizu karcinoma i zdravog tkiva na bazi razvijenog algoritama. Izvršena je dodatna analiza performansi klasifikatora primenom ROC krivih koje su pokazale veoma dobre vrednosti površina ispod krivih (AUC) (preko 0,85) što potvrđuje dobijene vrednosti rezultata odnosno mogućnosti da klasifikatori sa visokom sigurnošću mogu klasifikovati obolela i zdrava tkiva.

U prilog metodi idu i rezultati koji su dobijeni kada su upoređivana zdrava tkiva i deo tkiva koji je snimljen odmah pored tumora. Ovi rezultati su pokazali značajno manju tačnost i AUC kod ROC krivih što indirektno potvrđuje kvalitet metode za analizu tkiva. Još jedna indirektna potvrda je primena manjih slika, odnosno kropovanih regija od interesa gde je izdvojen samo tumor, gde su metode mašinskog učenja pokazale tačnost mnogo veću nego kada je veća slika gde postoji mogućnost da je na slikama uhvaćeno i zdravo tkivo.

Drugi eksperiment urađen je primenjujući JR-6A automatizovani uređaj za merenje remanentne magnetizacije. Sposobnost ovog uređaja da meri veoma male promene magnetnog polja uzorka sa tačnošću $\pm 3\text{pT}$. Zahvaljujući velikoj preciznosti ovog instrumenta izvršeni su eksperimenti gde su snimana zdravi i bolesni uzorci tkiva. Dobijeni rezultati su pokazali da postoji razlika između zdravog i bolesnog tkiva gde su vrednosti magnetizma veće kod bolesnog nego kod zdravog, dok se razlika smanjuje kod tkiva koja su zračena. Ovako ponašanje se može objasniti sa kompaktnijom strukturom

kod zdravog tkiva nego kod bolesnog koje sadrži i više vode. Ove nalaze potvrđuju i greške pri merenju koje nastaju u toku procesa rada JR-6A gde se meri pravac i intenzitet vektora magnetnog polja procesom rotacije uzorka unutar izolovanih kalemova. Usled rotacije manje kompaktni uzorci imaju tendenciju da se njihovi „delovi“ relativno kreću jedan u odnosu na drugi i da kao takvi menjaju pravac vektora remanentne magnetizacije što za posledicu ima veću grešku merenja.

Jedan od rezultata disertacije predstavlja i potvrdu metoda i tehnika koje se mogu primeniti za unapređenje kolonoskopije. Kako je OMIS metoda bazirana na RGB slici danas skoro svi moderni kolonoskopi poseduju digitalne kamere za beleženje vizuelnih stanja tkiva. Uz minimalne modifikacije moguće je razviti uređaj OMIS-kolonoskop baziran na beleženju biofizičkih stanja tkiva i primenom predstavljenih metoda mašinskog učenja tako da se analiza lezije može izvršiti *in vivo* u toku samog kolonoskopskog pregleda.

Predstavljeni rezultati sugerišu da OMIS može brzo razlikovati normalno od kancerogenog debelog creva, potencijalno omogućavajući upotrebu u realnom vremenu. Daljim poboljšanjem, OMIS može omogućiti „optičku biopsiju“ kolorektalnog tkiva u realnom vremenu, što bi dijagnostičke i terapijske intervencije moglo usmeriti na ciljana područja neobičnog rasta sluzokože. Iako sama tehnologija nije direktno lečenje, jedna od njenih potencijalnih budućih primena je procena nove strategije lečenja karcinoma rektuma „sačekaj i pazi“ koja omogućava onima koji leče bez preostalog karcinoma bezbedno praćenje slikanjem, umesto hirurškom intervencijom i zbog toga čuva njihov kvalitet života.

Istraživanja sprovedena u disertaciji doprinela su novim saznanjima o: (1) interakciji epitelnog tkiva sa difuznom i polarizovanom svetlošću, (2) primeni algoritama mašinskog učenja u klasifikaciji zdravo/bolesno tkivo, i (3) mogućnosti korišćenja prethodno navedenih standardnih metoda (kolonoskopije) i nove OMIS spektroskopije za projektovanje novog uređaja za *in vivo* rad kod utvrđivanja biofizičkog stanja tkiva debelog creva.

Naučni dopinosi ostvareni u doktorskoj disertaciji se mogu sumirati kao:

1. Novi algoritam za *in vitro* dijagnostiku karcinoma epitelnog tkiva rektuma (zdravo/bolesno) OMIS (opto-magnetne imidžing spektroskopije) sa tačnošću 92.6%
2. Odeđivanje mehaničkih osobina epitelnih tkiva (tečno-viskoelastično-čvrsto), kao i stepen viskoelastičnosti na bazi vrednosti remanentnog magnetizma tkiva sa tačnošću 86.1%
3. Saznanje o mogućnosti novog rešenja uređaja za *in vivo* dijagnostiku karcinoma epitelnog tkiva rektuma na bazi eksperimentalnih rezultata istraživanja ostvarenih u ovoj doktorskoj disertaciji, postojećih kolonoskopskih rezultata i teoretskih modela biofizičkih osobina epitelnog tkiva rektuma.

Stručni dopinosi su dva tehnička rešenja:

1. Predlog novog rešenja na osnovu konstrkcionih karakteristika kolonoskopa i OMIS metode moguće je izvršiti na dva načina (dve modifikacije) kako bi se OMIS metod implementirao za *in vivo* preglede pacijenata:

- a) Prema prvom rešenju moguće je izvršiti snimanje difuznom i polarizovanom svetlošću uz dodatni izvor polarizovane svetlosti koji bi se postavio u kanal za biopsiju, a za difuznu svetlost bi se iskoristio postojeći izvor svetlosti. Postojećim CCD senzorom bi se izvršila akvizicija slika. Na ovaj način kroz kanal za sukciju provukla bi se jedna LED koja bi osvetljavala željeni region pod Brusterovim uglom. Međutim, ovo rešenje bi zahtevalo da se omogući orijentisanje pravca osvetljenja LED i razdaljine uzorka od objektiva CCD senzora, tako da se ispoštuju geometrijske karakteristike OMIS osvetljenja.

- b) Kod drugog rešenja predlaže se modifikacija vrha sonde koja bi sadržala sistem osvetljenja OMISa, odnosno LED za difuznu svetlost i LED za polarizovanu svetlost, a već postojeći CCD senzor bi se iskoristio kao uređaj za akviziciju. Ovakvo rešenje bi zahtevalo povećanje prečnika kolonskopske sonde što bi dodatno otežalo sam pregled.

- c) Izrada prototipova uređaja pod *a)* i *b)*, sa tehničkim organičenjima pokazaće koji od navedenih predloga će se pokazati svrsishodnijim.

Značajan naučni i praktično medicinski doprinos postići će se razvojem nove, neinvazivne metode koja će na bazi podataka dobijenih u *in vitro* uslovima i biofizičkog modela epitelnog tkiva rektuma omogućiti projektovanje aparata za *in vivo* rad.

10 LITERATURA

1. World Health Organization, Cancer, <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>
2. Latest global cancer data, Press Release N 263, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>
3. GLOBOCAN 2018, Population fact sheet, World, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
4. GLOBOCAN 2018, Population fact sheet, Europe, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-fact-sheets.pdf>
5. Cancer tomorrow – International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>
6. J Ferlay, M Colombet, I Soerjomataram, T Dyba, G Randi, M Bettio, A Gavin, O Visser, F Bray, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018, *Eur J Cancer*, 2018, 103:356-387. doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005
7. The economic burden of cancer, The cancer atlas, <https://canceratlas.cancer.org/taking-action/economic-burden/>
8. Iris Lansdorp-Vogelaar, Marjolein van Ballegooijen, Ann G. Zauber, J. Dik F. Habbema, Ernst J. Kuipers, Effect of Rising Chemotherapy Costs on the Cost Savings of Colorectal Cancer Screening, *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101(20): 1412–1422, doi: 10.1093/jnci/djp319
9. Thomas Hofmarcher, Gunnar Bradvik, Christer Svedman, Peter Lindgren, Bengt Jonsson, Nils Wilking, IHE Report 2019:7, Comparator report on cancer in Europe 2019 – disease burden, costs and access to medicines, European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations – EFPIA
10. Pawan Kumar, Rajveer Pawaiya, *Advances in Cancer Diagnostics*, *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 3(2):141-152, 2010
11. Hardeep Singh, Gordon D Schiff, Mark L Graber, Igho Onakpoya, Matthew J Thompson, The global burden of diagnostic errors in primary care, *BMJ Qualitz & Saffety*, Volume 26/6, <http://dx.doi.org/10.1136/bmjqs-2016-005401>, 2016
12. Diagnostic Errors, Patient Safety Primer, <https://psnet.ahrq.gov/primer/diagnostic-errors>
13. Diagnostic Errors More Common, Costly And Harmful Than Treatment Mistakes, *Johns Hopkins Medicine*, 2013, https://www.hopkinsmedicine.org/news/media/releases/diagnostic_errors_more_common_costly_and_harmful_than_treatment_mistakes
14. Artificial Inteligence: Healthcare's new nervous system, Accenture, <https://www.accenture.com/sg-en/insight-artificial-intelligence-healthcare>
15. AI and healthcare: A giant opportunity, *Forbes*, Issue 4, <https://www.forbes.com/sites/insights-intelai/2019/02/11/ai-and-healthcare-a-giant-opportunity/#5f83d14d4c68>
16. Top 12 Ways Artificial Intelligence Will Impact Healthcare, *Health IT Analytics*, <https://healthitanalytics.com/news/top-12-ways-artificial-intelligence-will-impact-healthcare>
17. GLOBOCAN 2018, Colorectal cancer, https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf
18. Zoran Krivokapić, *Karcinom debelog creva*, *Zavod za udžbenike i Srpska akademija nauka i umetnosti*, Beograd 2018, ISBN 978-86-17-19893-8
19. Melina Arnold, Mónica S Sierra, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, *BMJ* 2016, 10.1136/gutjnl-2015-310912
20. GLOBOCAN 2018, Colorectal cancer, Serbia fact sheets, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheets.pdf>

21. Vasa Petrović, Uticaj znanja, stavova, ponašanja i modela skrininga na učešće u skriningu raka debelog creva, doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, 2016
22. Uredba o Nacionalnom programu ranog otkrivanja kolorektalnog carcinoma, "Službeni glasnik RS", br. 73/2013 od 16.08.2013. godine, http://www.domzdravljanis.co.rs/documents/Uredba_kolorektalni_karcinom-lat.pdf
23. Europe's beating cancer plan: Let's strive for more, European Commission, https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/QANDA_20_153
24. Karl-Hubertus Gruber, In vitro diagnostics: transformation of the largest segment in MedTech, MedTech Strategist & Digital Health, <https://www.linkedin.com/pulse/vitro-diagnostics-transformation-largest-segment-medtech-gruber/>
25. Marković V., Dragičević A., Postojeće metode i tehnike dijagnostikovanja kancera epitelnog tkiva debelog creva, u knjizi Rana dijagnostika kancera epitelnog tkiva Papić-Obradović M., Don Vas Beograd, 2012, 101-115, ISBN 978-86-87471-24-5
26. Zoran Krivokapić, Karcinom rektuma, Zavod za udžbenike, Beograd 2012, ISBN 978-86-17-17967-8
27. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, et al, Screening for colorectal neoplasms with fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Canc Inst* 2007, 99:1-9
28. Halloran SP, Launoy G, Zappa M, International Agency for Research on Cancer, European guidelines and diagnosis. First Edition – Faecal occult blood testing. *Endoscopy* 2012, 44 Suppl 3:SE65-87
29. Lee JK, Liles EG, Bent S, et al. Accuracy of faecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014, 160:171-6
30. Van Rossum LG, Van Rijn AF, Lahij RJ, et al. Random comparison of guaiac and immunochemical faecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology* 2008, 135:82-90
31. European Colorectal cancer screening guidelines working group. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy* 2013, 45(1):51-9
32. Hundt S, Haug U, Brenner H. Comparative evaluation of immunochemical faecal occult blood tests for colorectal adenoma detection. *Ann Intern Med* 2009, 150:162-69
33. Ahlquist DA, Zou H., Domanico M., et al. Next generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology* 2012, 142:248-256
34. Bailey JR, Aggarwal A, Imperiale TF, Colorectal Cancer Screening: Stool DNA and Other Noninvasive Modalities, *Gut Liver* 2016, 10(2):204-11
35. Vilkin A, Rozen P, Levi Z, Waked A, Maoz E, Birkenfeld S, Niv Y. Performance characteristics and evaluation of an automated-developed and quantitative, immunochemical, fecal occult blood screening test. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:2519–2525.
36. Amaninder Dhaliwal, Panagiotis j Vlachostergios, Katerina Oikonomou, Yitzchak Moshenyat, Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives, *World J Gastrointest Oncol* 2015, 7(10): 178-183
37. Anderson JC, Shaw RD. Update on colon cancer screening: recent advances and observations in colorectal cancer screening. *Curr Gastroenterol Rep.* 2014;16:403.
38. Shah R, Jones E, Vidart V, Kuppen PJ, Conti JA, Francis NK. Biomarkers for early detection of colorectal cancer and polyps: systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*
39. Song K, Fendrick AM, Ladabaum U. Fecal DNA testing compared with conventional colorectal cancer screening methods: a decision analysis. *Gastroenterology.* 2004;126:1270–1279.
40. Skally M, Hanly P, Sharp L. Cost effectiveness of fecal DNA screening for colorectal cancer: a systematic review and quality appraisal of the literature. *Appl Health Econ Health Policy.* 2013;11:181–192.

41. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014;20:6786–6808.
42. Neurological Diagnostic Tests and Procedures Fact Sheet, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Neurological-Diagnostic-Tests-and-Procedures-Fact>
43. Johnson CD, Chen M-H, Toledano AY, et al. Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancers, *N Engl J Med* 2009, 301:2453-61
44. Friedel D, Modazil R, Stavropoulos S. Colon Capsule Endoscopy: Review and Perspectives, *Gastroenterol Res Pract*. 2016
45. Adrian-de-Ganzo Z, Alarcon-Fernandez O, Ramos L, Gimeno-Garcis A, et al. Uptake of Colon Capsule Endoscopy vs Colonoscopy for Screening Relatives of Patients with Colorectal Cancer, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015, 2293-2301
46. Glukhovsky, A. (2003). Wireless capsule endoscopy. *Sensor Review*, 23(2), 128–133. doi:10.1108/02602280310468233
47. Elmunzer BJ, Hayward RA, Schoenfeld PS, et al. Effect of flexible sigmoidoscopy-based screening on incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Plos Medicine* 2012, 9(12), doi: 10.1371/journal.pmed.1001352.e1001352
48. Schoenfeld P, Cash B, Flood A, et al. Colonoscopic screening of average – risk women for colorectal neoplasia. *N Engl J Med* 2005, 352:2061-68
49. HoffG, Grotmol T, Skovlund E, et al. Norwegian Colorectal Cancer Prevention Study Group Risk of Colorectal cancer seven years after flexible sigmoidoscopy: randomized controlled trial, *BMJ* 2009, 338:b1846
50. Paraskevas Gkolfakis, Georgios Tziatzios, George D Dimitriadis, Konstantinos Triantafyllou, New endoscopes and add-on devices to improve colonoscopy performance, *World J Gastroenterol*. 2017, 23(21): 3784–3796, doi: 10.3748/wjg.v23.i21.3784
51. Jonathan D Litten, JungHun Choi, David Drozek, Development of a colonoscopy add-on device for improvement of the intubation process, *Med Devices (Auckl)*. 2011; 4: 197–208, doi: 10.2147/MDER.S27728
52. Arvind J. Trindade, et al. Devices and methods to improve colonoscopy completion (with videos), *Gastrointestinal endoscopy*, 2018, 87(3):625-634
53. Marina De Rosa Ugo Pace Daniela Rega Valeria Costabile Francesca Duraturo Paola Izzo Paolo Delrio, Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review), *Oncology Reports*, 2015, pp. 1087-1096, <https://doi.org/10.3892/or.2015.4108>
54. Kar-Yan Su, Wai-Leng Lee, Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Cancer Screening and Diagnostic Tool: A Review and Prospects, *Cancers* 2020, 12(1), 115; <https://doi.org/10.3390/cancers12010115>
55. Enrique Quintero, Cesare Hassan, Carlo Senore, Yutaka Saito, Progress and Challenges in Colorectal Cancer Screening, *Gastroenterol Res Pract*. 2012; doi: 10.1155/2012/846985
56. Won Gun Kwack, Yun Jeong Lim, Current Status and Research into Overcoming Limitations of Capsule Endoscopy, *Clin Endosc*. 2016, 49(1): 8–15, doi: 10.5946/ce.2016.49.1.8
57. Emanuele Rondonotti, Juan Manuel Herrerias, Marco Pennazio, Angel Caunedo, Miguel Mascarenhas-Saraiva, Roberto de Franchis, Complications, limitations, and failures of capsule endoscopy: a review of 733 cases, *Gastrointest Endosc*. 2005 Nov;62(5):712-6; quiz 752, 754. doi: 10.1016/j.gie.2005.05.002
58. Gandon Y, Screening for colorectal cancer: The role of CT colonography, *Diagnostic and Interventional Imaging*, 95(5), 2014, pp. 467-474, <https://doi.org/10.1016/j.diii.2014.03.012>
59. Krivokapic Z, Markovic V, Dragicevic A, Citologija epitelnog tkiva debelog creva, u knjizi Rana dijagnostika kancera epitelnog tkiva, Papić-Obradović M., Don Vas Beograd, 2012, 34-58, ISBN 978-86-87471-24-5

60. Fenoglio at all, Distribution of human colonic lymphatics in normal, hyperplastic, and adenomatous tissue, *Gastroenterology*, 64(1):51-66, 1973, [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(73\)80091-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(73)80091-5)
61. Smith at all, Lymphatic vessel distribution in the mucosa and submucosa and potential implications for T1 colorectal tumors, *Dis Colon Rectum*, 54(1):35-40, 2011, doi: 10.1007/DCR.0b013e3181fb0e7a
62. Ros H, *Hystology: a text and atlas*, sixth edition, Lippincott&Wilkins, 2010
63. Bumbasirevic V, et al. *Histologija, Medicinski fakultet u Beogradu*, Beograd 2015
64. Koruga, D., Tomic, A. System and method for analysis of light-matter interaction based on spectral convolution. US Patent Pub. No. 2009/0245603, Pub. Date: Oct. 1, 2009.
65. A. Dragicevic, L. Matija, Z. Krivokapic, I. Dimitrijevic, M. Baros, D. Koruga, Classification of Healthy and Cancer States of Colon Epithelial Tissues Using Opto-magnetic Imaging Spectroscopy, *Journal of Medical and Biological Engineering*, pp. 1-14, DOI: 10.1007/s40846-018-0414-x, 2018.
66. Koruga, D., Tomic, A. Method and algorithm for analysis of light-matter interaction based on spectral convolution. US Pat. App. No.61/061,852, 2008, PCT/US2009/030347, Publication No: WO/2009/089292, Publication Date: 2009-07-16.
67. Matija, L., Jeftic, B., Nikolic, G., Dragicevic, A., Mileusnic, I., Muncan, J., Koruga, D. (2014). Nanophysical approach to diagnosis of epithelial tissue using Opto-magnetic imaging spectroscopy. In A. Seifalian, A. Mel, D. M. Kalaskar (Ed.), *Nanomedicine* (pp. 156-186). UK: One Central Press.
68. Koruga, Đ., et al., Water hydrogen bonds study by opto-magnetic fingerprint technique. *Acta Physica Polonica-Series A General Physics*, 2010. 117(5): p. 777.
69. J. Pokorný, poglavlje Spinner magnetometer, *Encyclopedia of geomagnetism and paleomagnetism*, urednici D. Gubbins, E. Herrero-Bervera, str. 920-922, Springer Netherlands, 2007
70. S. Chikazumi, *Physics of ferromagnetism*, str. 118, Oxford: Oxford University Press, 2009
71. A. Dragičević, L. Matija, Z. Krivokapić, A. Ilanković, Đ. Koruga, Remanent Magnetism on Nano and Pico Tesla Level of Biological Tissues, *Book of abstracts, 3rd International Translational Nanomedicine Conference*, Miločer, str. 23, 2015
72. Spinner magnetometer JR6/JR6A, User's manual Ver. 2.1 May 2004., AGICO, Brno, Republika Češka
73. Liu, F., Burrage, K. Parameter estimation for fractional dynamical models in biological systems. *Proceedings of 4th IFAC Workshop on Fractional Differentiation and Its Applications*, 2010.
74. Kilbas, A.A., Srivastava, H.M., Trujillo, J.J. *Theory and Applications of Fractional Differential Equations*. Elsevier, Amsterdam, 2006
75. Podlubny, I. *Fractional Differential Equations*, volume 198 of *Mathematics in Science and Engineering*. Academic Press, San Diego, 1999.
76. Kumar S., *Liquid Crystals: Experimental Study of Physical properties and Phase Transitions*, Cambridge University Press, 2001, Cambridge.
77. Nye, J., *Physical Properties of Crystals*, Oxford Press, Oxford, 1957.
78. Carlin, R. L. *Magnetochemistry*, Springer, Berlin, 1986
79. Duck, A.F., *Physical properties of tissue*, Academic Press, London, 1990
80. Pariwat Ongsulee, *Artificial Intelligence, Machine Learning and Deep Learning*, Fifteenth International Conference on ICT and Knowledge Engineering, 2017, DOI:10.1109/ICTKE.2017.8259629
81. Samson Saju, *Cognitive Computing – The Possibilities*, <https://www.mindtree.com/blog/cognitive-computing-possibilities>
82. Branislava Jeftić, *Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopijske*, Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet, 2017.

83. Pedro Domingos, Michael Pazzani, On the optimality of the simple Bayesian classifier under zero-one loss, *Machine Learning*, 29:103–130, 1997
84. Max Kuhn, Kjell Johnson, *Applied Predictive Modelling*, Springer 2013
85. Thomas M. Mitchell. 1997. *Machine Learning* (1st. ed.). McGraw-Hill, Inc., USA.
86. Zoran Miljković, Dragan Aleksendrić, „Veštačke neuronske mreže“ zbirka rešenih zadataka sa izvodima iz teorije, Univerzitet u Beogradu Mašinski fakultet, 2009.
87. I.N. da Silva, D.H. Spatti, R.A. Flauzino, L.H.B. Liboni, and S.F. dos Reis Alves, *Artificial neural networks: A practical course*, Springer International Publishing, 2016.
88. Wiesner, W., Mortelé, K. J., Ji, H., Ros, P. R., (2002). Normal Colonic Wall Thickness at CT and Its Relation to Colonic Distension, *Journal of Computer Assisted Tomography*, 26(1):102–106.
89. Dragicevic A., Primena optomagnetne spektroskopije u ranoj sijagnostici kancera debelog creva, u knjizi Rana dijagnostika kancera epitelnog tkiva Papić-Obradović M., Don Vas Beograd, 2012, 325-354, ISBN 978-86-87471-24-5
90. A. Dragičević, G. Nikolic, B. Jeftić, Z. Krivokapić, V. Marković, I. Dimitrijević, Đ. Koruga, L. Matija, Comparison between different types of colon cancer using Opto-magnetic imaging spectroscopy, *Journal of the Academy of Science and Arts of the Republic of Srpska, Contemporary materials, Academy of Sciences and Arts of the Republic of Srpska*, 2013
91. James, G., et al., *An introduction to statistical learning*. Vol. 6. 2013: Springer
92. Robert S. Witte, John S. Witte, *Statistics*, Wiley 2017
93. Singh, Dalwinder & Singh, Birmohan. (2019). Investigating the impact of data normalization on classification performance. *Applied Soft Computing*. 105524. 10.1016/j.asoc.2019.105524
94. <https://topepo.github.io/caret/recursive-feature-elimination.html>
95. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg*. 2018;126(5):1763-1768. doi:10.1213/ANE.0000000000002864
96. Yu, Lei & Liu, Huan. Feature Selection for High-Dimensional Data: A Fast Correlation-Based Filter Solution. *Proceedings, Twentieth International Conference on Machine Learning*, 2:856-863, 2003
97. Chen, Xue-wen & Wasikowski, Michael. FAST: A roc-based feature selection metric for small samples and imbalanced data classification problems. *Proceedings of the ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, pp. 124-132, 2012, doi:10.1145/1401890.1401910
98. Rakočević, M., The genetic code as a Golden mean determined system, *BioSystems*, 46:283.291,1998
99. Koruga,Đ., *Hiperpolarizovana svetlost : osnove nanobiomedicinske fotonike*, Zpter Book World, Beograd, 2017
100. Winawer, S. J., Zauber, A. G., Ho, M. H., et al. (1993). The National Polyp Study Workgroup. Prevention of colorectal cancer by colonoscopy polypectomy. *N Engl J Med*, 329(27), 1977–1981.
101. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 2010. American Cancer Society; <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index>
102. Mamazza, J., Gordon, P. H. (1982). The changing distribution of large intestinal cancer. *Dis Colon Rectum*, 25, 558-562.
103. Endocrine Tumour-Risk Factors-Cncer.net., <http://www.cancer.net/node/19207>. Accessed 27 May 2016.
104. Koruga, Đ., Miljković, S., Ribar, S., Matija, L., Kojić, D. (2010). Water hydrogen bonds study by opto-magnetic fingerprint technique. *Acta Physica Polonica A*, 117(5), 777-781.
105. Rex, D. K. (2000). Colon tumours and colonoscopy. *Endoscopy*, 32(11), 874–833.
106. Rex, D. K., Johnson, D. A., Lieberman, D. A., Burt, R. W., Sonnenberg, A. (2000), *Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of*

- Gastroenterology. American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol*, 95(4), 868-877.
107. Pitris, C., Jesser, C., Boppart, S. A., Stamper, D., Brezinski, M. E., Fujimoto, J. G. (2000). Feasibility of optical coherence tomography for high-resolution imaging of human gastrointestinal tract malignancies. *Journal of Gastroenterology*, 35(2), 87–92.
 108. Kong, K., Kendall, C., Stone, N., Notingher, I. (2015). Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 89:121-134.
 109. Lasch, P., Haensch, W., Naumann, D., Diem, M. (2004). Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1688(2), 176–186.
 110. Li, Q. B., Xu, Z., Zhang, N. W., Zhang, L., Wang, F., Yang, L. M., Wang, J. S., Zhou, S., Zhang, Y. F., Zhou, X. S., Shi, J. S., Wu, J. G. (2005). In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy. *World Journal of Gastroenterology*, 11(3), 327-30.
 111. Mavarani, L., Petersen, D., El-Mashtoly, S. F., Mosig, A., Tannapfel, A., Kötting, C., Klaus, G. (2013). Spectral histopathology of colon cancer tissue sections by Raman imaging with 532 nm excitation provides label free annotation of lymphocytes, erythrocytes and proliferating nuclei of cancer cells. *Analyst*, 138(14), 4035-4039.
 112. Shim, M. G., Wong Kee Song, L. M., Marcon, N. E., Wilson, B. C. (2000). In vivo near-infrared raman spectroscopy: Demonstration of feasibility during clinical gastrointestinal endoscopy. *Photochemistry and Photobiology*, 72 (1), 146–150.
 113. Molckovsky, A., Wong Kee Song, L. M., Shim, M. G., Marcon, N. E., Wilson, B. C. (2003). Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the colon: differentiating adenomatous from hyperplastic polyps. *Gastrointestinal Endoscopy*, 57(3), 396–402.
 114. Widjaja, E., Zheng, W., Huang, Z. (2008). Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines. *International Journal of Oncology*, 32(3), 653–662.
 115. Short, M.A., Tai, I.T., Owen, D., Zeng, H. (2013). Using high frequency Raman spectra for colonic neoplasia detection, *Optics Express*, 21(4), 5025–5034.
 116. Argov, S., Ramesh, J., Salman, A., et al. (2002). Diagnostic potential of Fourier-transform infrared microspectroscopy and advanced computational methods in colon cancer patients. *Journal of Biomeica. Optics*, 7(2), 248–254.
 117. Swartling, J., Dam, J. S., Andersson-Engels, S. (2003). Comparison of spatially and temporally resolved diffuse-reflectance measurement systems for determination of biomedical properties. *Applied Optics*, 42(22), 4612–4620.
 118. Mourant, J. R., Hielscher, A. H., Eick, A. A., Johnson, T. M., Freyer, J. P. (1998). Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells. *Cancer Cytopathology*, 84(6), 366–374.
 119. Hidovic-Rowe, D., Claridge, E. (2005). Modelling and validation of spectral reflectance for the colon. *Physics in Medicine and Biology*, 50, 1071–1093.
 120. Old, O. J., Fullwood, L. M., Scott, R., Lloyd, G. R., Almond, L. M., Shepherd, N. A., Stone, N., Barr, H., Kendall, C. (2014). Vibrational spectroscopy for cancer diagnostics. *Analytical Methods*, 6(12), 3901-3917.
 121. Kallenbach-Thieltges, A., Großeruschkamp, F., Mosig, A., Diem, M., Tannapfel, A., Gerwert, K. (2013). Immunohistochemistry, histopathology and infrared spectral histopathology of colon cancer tissue sections. *Journal of Biophotonics*, 6(1), 88–100.
 122. Krafft, C., Ramoji, A. A., Bielecki, C., Vogler, N., Meyer, T., Akimov, D., Rosch, P., Petersen, M. I., Stallmach, A., Popp, J. (2009). A comparative Raman and CARS imaging study of colon tissue. *Journal of Biophotonics*, 2(5), 303–312.

123. Mackanos, M. A., Contag, C. H. (2010). Fiber-optic probes enable cancer detection with FTIR spectroscopy. *Trends in Biotechnology*, 28(6), 317-323.
124. Jane V. Carter, Jianmin Pan, Shesh N. Rai, Susan Galandiuk, ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves, *Surgery*, Volume 159, Issue 6, 2016, Pages 1638-1645, ISSN 0039-6060, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.12.029>
125. Schober P, Boer C, Schwarte LA., Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg.* 2018, 126(5):1763-1768, doi:10.1213/ANE.0000000000002864

11 BIOGRAFIJA

Aleksandra Lj. Dragičević rođena je 29.09.1980. godine u Beogradu. Gimnaziju u Mladenovcu, prirodno-matematički smer, završila je 1999. godine sa odličnim uspehom. Diplomirala je 2011. godine na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za mašinske konstrukcije i mehanizaciju odbranivši rad na temu „Analitičko određivanje parametara statičke stabilnosti nadgradnje rotornog bagera SchRs 350 nakon redizajna rotora sa pogonom“ sa ocenom 10 (deset). Prosečna ocena tokom studija je iznosila 8.14 (osam i 14/100). Pre upisa na Mašinski fakultet, kandidatkinja je završila dve godine Medicinskog fakulteta Univerzitet u Beogradu, sa ukupno 11 položenih ispita. Rešenjem 3454/1 od 05.11.2003. godine odobren joj je status mirovanja usled teške porodične situacije nakon čega 2004.godine upisuje Mašinski fakultet.

Doktorske studije na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Modulu za Biomedicinsko inženjerstvo, pri Katedri za Automatsko upravljanje kandidat upisuje 2011/12. godine. Od 03.01.2012. godine Aleksandra Lj. Dragičević je zaposlena na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, da bi odlukom br. 21-232/4 Istraživačko-stručnog veća Mašinskog fakulteta sa sednice održane 21.03.2013. godine dobila istraživačko zvanje istraživač saradnik. Odlukom Nastavno-naučnog veća Mašinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 21-1113/6 od 29.08.2016. godine kandidatkinja biva reizabrana u zvanje istraživač saradnik. U periodu od 2012. godine do danas, kao saradnik u nastavi, učestvovala je u izvođenju nastave na više predmeta na Osnovnim i Master akademskim studijama na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Modulu, a zatim na Katedri za Biomedicinsko inženjerstvo: Rana dijagnostika kancera i melanoma, Sistemska anatomija i fiziologija čoveka, Biomehanika tkiva i organa, Medicinsko mašinstvo, Osnove kliničkog inženjerstva i Kliničko inženjerstvo.

U dosadašnjem stručnom i istraživačkom radu učestvovala je na naučno-istraživačkom projektu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III 41006 pod nazivom „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“, kao i na projektu TEMPUS, 530423-2012, pod nazivom “Studies in Bioengineering and Medical Informatics - BioEMIS”, u periodu 2012-2015.godina. Takođe, bila je koordinator nekoliko projekata i studija proisteklih iz saradnje sa privredom.

Aleksandra Lj. Dragičević govori tečno engleski jezik, a služi se ruskim i španskim jezikom. Od 2014. godine član je tima za promociju i marketing Mašinskog fakulteta. Autor je i koautor na više od 30 radova koji su prezentovani na naučnim skupovima ili objavljeni u časopisima različitih kategorija, kao i tri monografije i dva patentna rešenja. Tokom studija nagrađivana je na međunarodnim konferencijama dva puta za najbolji rad i usmeno izlaganje:

1. Remanent Magnetism on Nano and Pico Tesla Level of Biological Tissues, ITNANO2015 - 3rd International Translational Nanomedicine Conference, 21-26. jun. 2015., Miločer, Crna Gora

2. Structural Health Monitoring of the Colon Epithelial Tissue Using Opto-magnetic Imaging Spectroscopy, 31st Danubia-Adria Symposium on Advances in Experimental Mechanics, 24-27.septembar. 2014., Kempten, Nemačka;

i dva puta za najbolju poster prezentaciju:

1. Nano-magnetochemistry in colon cancer detection by spinner magnetometer, 2nd International Translational Nanomedicine Conference – ITNANO 2014, College of Engineering Northeastern University, Boston Massachusetts, Sjedinjenj Američke Države, 25-27. jul. 2014.,

2. In vitro colorectal cancer investigation by Opto – magnetic spectroscopy, V International conference Contemporary Materials 2012, Banja Luka , 05-07. jul.2012.

Takođe, kandidat je bila član tima koji je januara 2015.godine osvojio nagradu za najbolju novootvorenu kompaniju „Tumour Trace Ltd” u Velikoj Britaniji, u okviru razvojnog programa „Next Business Generation Programme“, BioCity - Medicity, Notingem. Kao član stručnog tima „Tumour Trace Ltd” boravila je dva puta u Indiji i nekoliko puta u Velikoj Britaniji radeći na istraživanjima rane dijagostke kancera grlića materice, usne duplje i prostate.

12 PRILOG

12.1 PRILOG 1 – Osnovni pojmovi statistike i mašinskog učenja

12.1.1 Centriranje i skaliranje podataka

Jedne od najjednostavnijih operacija nad podacima su centriranje i skaliranje tih podataka. Metodom centriranja svaka vrednost podatka se oduzme od njeje srednje vrednosti tako da se dobije promenjiva koja se posmatra ima nultu srednju vrednost. Kod metode skaliranja sve vrednosti podataka se podele sa svojom standardnom devijacijom što dovodi do toga da svaka promenjiva ima standardnu devijaciju jednaku 1. Zajednička formula za ove metode je prikazana u nastavku i u literaturi se ova metoda može pronaći i pod nazivom Z-Skor (Z-score). Primenom ovih metoda postiže se poboljšanje numeričke stabilnosti algoritama dok neki određeni modeli imaju posebne benefiti od primene centriranja i skaliranja jer mnogo povoljniji slučaj kada su relativne promene vrednosti promenjivih iste veličine (npr. mala promena jedne promenjive je ± 1000 dok je za drugu promenjivu velika promena $\pm 0,1$). Centriranje i skaliranje se posebno primenjuju u slučaju kada se želi uporediti uticaj dve promenjive koje imaju različitu fizičku prirodu i koje je nemoguće uporediti dok se ne svedu na istu skalu. Jedina mana ovih metoda je da se nakon njihove primene gubi fizička smisao i ne mogu se podaci jednostavno tumačiti. [Max Kuhn, Kjell Johnson, Applied Predictive Modelling, Springer 2013, Robert S. Witte, John S. Witte, Statistics, Wiley 2017]

U nastavku je prikazana formula za skaliranje podataka:

$$x' = \frac{x - \bar{X}}{\sigma} \quad [12.1]$$

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n} \quad [12.2]$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n}} \quad [12.3]$$

Gde je x' - skalirana vrednost podatka, \bar{X} - srednja vrednost posmatrane promenjive, σ - njena standardna devijacija i n - ukupan broj podataka odnosno uzoraka [Robert S. Witte, John S. Witte, Statistics, Wiley 2017].

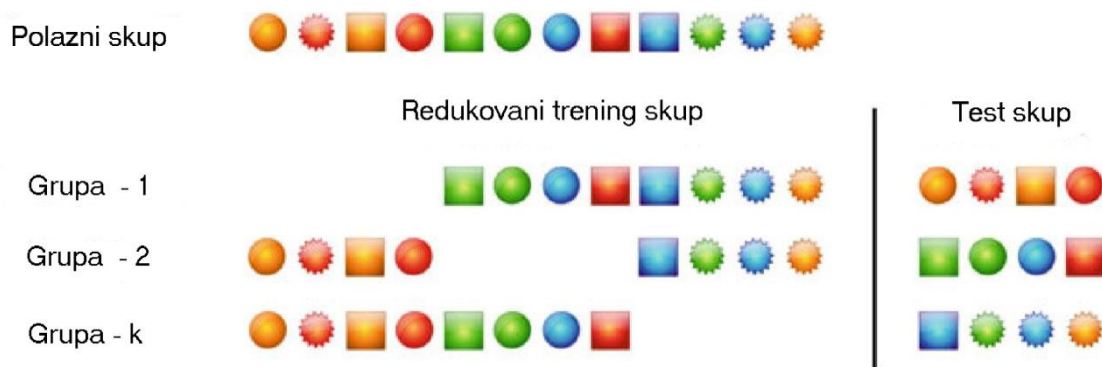
12.1.2 Krosvalidacija

Krosvalidacija je tehnika koja se koristi za kao metod za procenu efikasnosti klasifikatora gde se polazni skup trening podata deli prema unapred definisanom pravilu (npr. 90%-10%) na skup za obuku i skup za proveru efikasnosti. Suštinski se trening skup deli na trening set i test set kao i kod provere rada klasifikatora samo što se u slučaju krosvalidacije koriste svi podaci iz trening seta i to po principu da se trening i test setovi menjaju tako da svi podaci barem jednom učestvuju u test setu a rezultat ispitivanja efikasnosti dobija se kao suma (srednja vrednost) svih dobijenih rezultata.

Jedna od najprimenjivanijih metoda krosvalidacije je podela polaznog skupa trening podataka na „ k “ jednakih delova (eng. Fold – prevod je u duhu našeg jezika) odnosno podskupova sa istim brojem članova. Nakon podele na podskupove ispitivanje se dalje vrši na sledeći način: jedan skup se odvoji a na ostalih $k-1$ se vrši obuka klasifikatora. Posle obuke klasifikatora, na izostavljenom skupu se vrši testiranje pri čemu se dobija rezultat efikasnosti klasifikatora (kao tačnost, ROC kriva, AUC...). Zatim se bira sledeći skup po redu koji se izostavlja iz obuke klasifikatora a podskup iz prve iteracije se pridružuje ostatku za treniranje (pogledati sliku 12.1). Na ovom novom trening skupu se

vrši obuka klasifikatora i testira se na novom izostavljenom. Nakon ponavljanja procedure za k broj skupova izračunava se ukupan rezultat koji predstavlja efikasnost klasifikatora.

U praksi se najčešće koristi krosvalidacija kada je $k=10$ ili 5, ali ne postoji pravilo po kojem se bira vrednost k , međutim pristrasnost (eng. Bias – razlika između procenjenje i stvarne efikasnosti) rezultata se smanjuje kako „ k “ raste, drugim rečima pouzdanost rezultata ce biti veća ako je veće „ k “. [Max Kuhn, Kjell Johnson, Applied Predictive Modelling, Springer 2013]



Slika 12.1 Primer kros validacije [Max Kuhn, Kjell Johnson, Applied Predictive Modelling, Springer 2013]

12.1.3 Mašinsko učenje i veštačka inteligencija

Od kako je čovek napravio prvu mašinu postalo je jasno da će mašine polako zameniti čoveka u skoro svim oblastima ljudske delatosti. Prve mašine koje je čovek osmislio bile su jednostavne alatke koje su mu pomagale da olakša i ubrza svoje rad (npr. kramp, lopata, ašov i dr.). Kako se civilizacija razvijala mašine koje je čovek pravio i koristio postajale su sve složenije i mogle su da izvršavaju sve složenije poslove. U dvadesetom veku mašine su postale dovoljno kompleksne da su u nekim oblastima industrije u potpunosti zamenile čoveka. Međutim sve te mašine nisu mogle da odlučuju o poslu koji su obavljale niti su mogle da nauče bolje načine da obave neki posao od onih za koje su bile napravljene. Sve što je takva mašina mogla da odradi moralo je biti u napred smišljeno od strane inženjera i projekatana. Ovakav tim mašina zamenjivao je čovekov *rutinski manuelni rad* i u mnogome je doprineo ubrzanom razvoju industrije u poslednjih 100 godina.

Krajem XX veka i početkom XXI došlo je do zamene ljudskog *rutinskog umnog rada* računarima koji su postali dostupni velikom broju ljudi a samim tim i internetu koji je kao tehnologija postala sastavni deo savremenog društva. Broj ljudi koji su koji su svakodnevno povezani na internet prevazilazi stotine miliona.

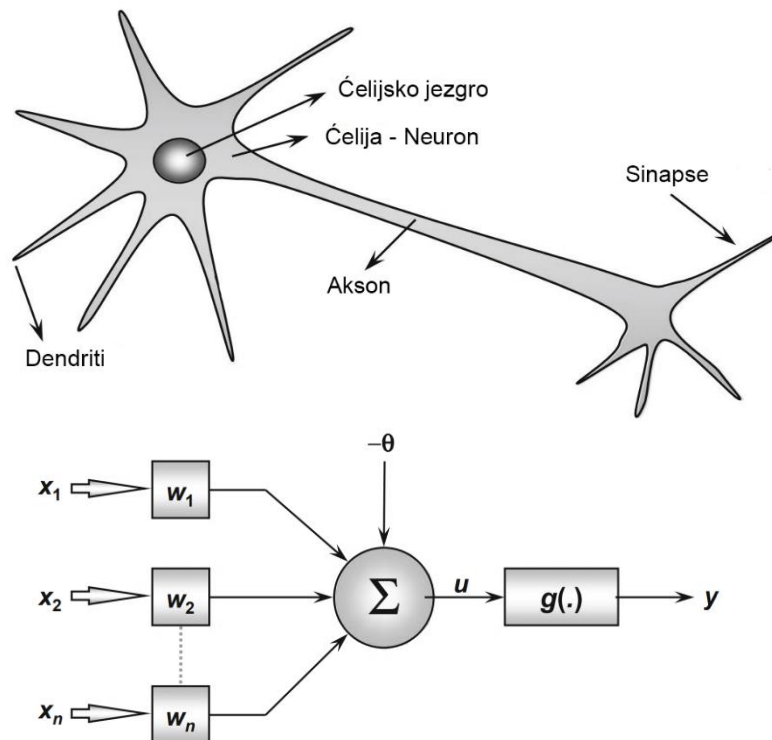
Ovako velik broj korisnika raznih usluga na internetu sa svim njihovim zahtevima skoro je nemoguće ispratiti od strane ljudi koji bi proveravali i čitali svaki od njihovih zahteva. Obrada velikog broja zahteva, odnosno podataka, koji se svakodnevno generišu na internetu zahteva alate odnosno mašine koje mogu samostalno da odlučuju. Sposobnost mašina da samostalno donose zaključke može biti unapred isprogramirana ili naučena. Mašine koje su isprogramirane mogu samo da odlučuju o stvarima koje su unapred definisane od strane inženjera i programera i u slučaju neke promene podataka doći će do greške u njihovom odlučivanju. Sa druge strane postoje mašine odnosno kompjuterski programi koji pre svega mogu da samostalno nauče da li neki podatak zadovoljava zahtevane kriterijume ili ne, na osnovu velikog broja primera koji su se već dogodili ili da prepoznaju određene obrasce unutar podataka posmatrajući veliki broj podataka. Ovaj proces „obučavanja“ mašina da nešto samostalno urade odnosno da samostalno odlučuju o nekom događaju naziva se *mašinsko učenje*. Pod pojmom mašinskog učenja se podrazume samostalno i iterativno podešavanje parametara algoritma na takav način koji omogućava algoritmu nakon obučavanja da samostalno

prepoznaje određene podatke i da osnovu toga odlučuje o njihovoj daljoj obradi. Zamena *umnog kreativog* ljudskog rada (donošenje odluka) mašinskim je početak treće tehnološke revolucije.

12.1.4 Višeslojna perceptronska neuralna mreža (MLP)

U ovoj studiji se za funkciju aktiviranja koristi logistička sigmoidna funkcija.

Veštački neuron predstavlja pojednostavljeni model stvarnog neurona (Slika 12.2). Poređenjem stvarnog neurona sa njegovim modelom koji se koristi u veštačkim neuronskim mrežama mogu se uočiti određeni zajednički elementi: ulaz u veštački neuron – dendriti, aktivaciona funkcija i bias – telo ćelije, izlaz – akson.



Slika 12.2. Prikaz stvarnog neurona (gore) i model veštačkog neurona (dole)

Ulazi u veštački neuron predstavljeni su vektorom promenljivih veličina (x_1, x_2, \dots, x_n) . Svaka od ulaznih veličina se množi (skalira) sa odgovarajućim težinskim koeficijentima (w_1, w_2, \dots, w_n) koji predstavlja pandan sinapsi između aksona i dendrita narednog neurona. Ovakvi ulazi se sumiraju sa i „upoređuju“ sa aktivacionim pragom θ , nakon čega se ulazi prosleđuju aktivacionoj $g()$ funkciji koja ima ulogu da ograniči izlaz y neurona. Rad veštačkog neurona može da se opiše formulom:

$$u = \sum_{k=0}^n w_k \cdot x_k - \theta \quad [12.4]$$

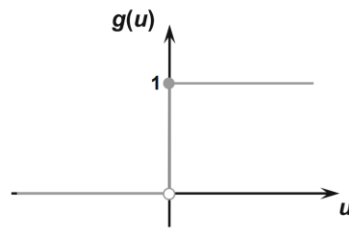
$$y = g(u) \quad [12.5]$$

U okviru oblasti neuronski mreža primenjuju se razne aktivacione funkcije, izbor tih funkcija zavisi od zadatka koji se pokušava rešiti (npr. u velikom broju problema klasifikacije može biti dovoljno da se primenjuju odskočne funkcije sa dve vrednosti, međutim ne mora da znači da će dobijene performanse biti dobre). Aktivacione funkcije koje se koriste mogu se podeliti u delimično diferencijabilne (funkcije sa prekidima) i diferencijabilne.

Neke od najčešće korištenih delimično diferencijabilnih funkcija, hevisajdova odskočna funkcija (slika 12.3), signum funkcija (slika 12.4), i linearna funkcija sa ograničenjem (slika 12.5). Dok

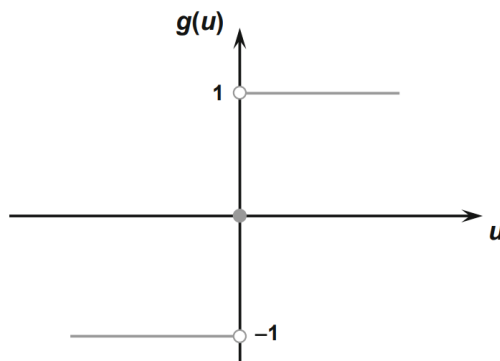
diferencijabilnih funkcija se najčešće koristi familija sigmoidalnih funkcija od kojih su dve najpoznatije logistička funkcija (slika 12.6) i hiperbolički tangens (slika 12.7).

$$g(u) = \begin{cases} 1, & u \geq 0 \\ 0, & u < 0 \end{cases} \quad [12.6]$$



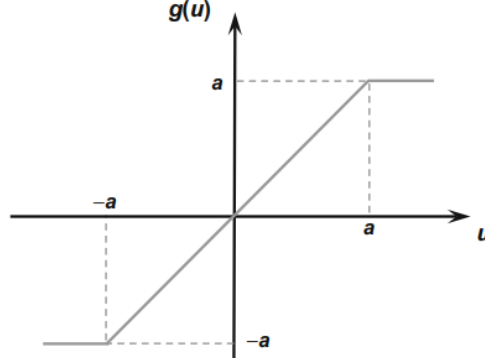
Slika 12.3. Odskočna hevisajdova funkcija

$$g(u) = \begin{cases} 1, & u \geq 0 \\ 0, & u = 0 \\ -1, & u \leq 0 \end{cases} \quad [12.7]$$



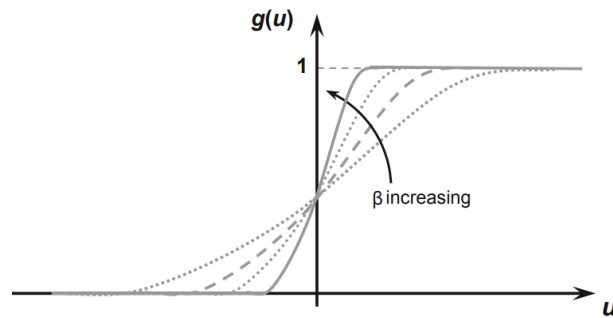
Slika 12.4. Signum funkcija

$$g(u) = \begin{cases} a, & u > a \\ 0, & a \leq u \leq a \\ -a, & u < a \end{cases} \quad [12.8]$$



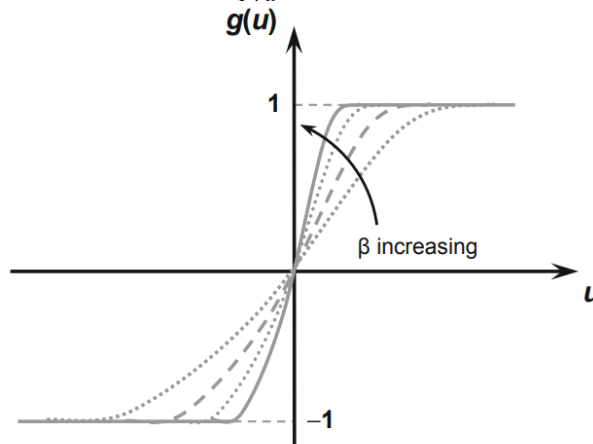
Slika 12.5. Linearna funkcija sa ograničenjem

$$g(u) = \frac{1}{1+e^{-\beta u}} \quad [12.9]$$



Slika 12.6. Logistička funkcija

$$g(u) = \frac{1 - e^{-\beta u}}{1 + e^{-\beta u}} \quad [12.10]$$



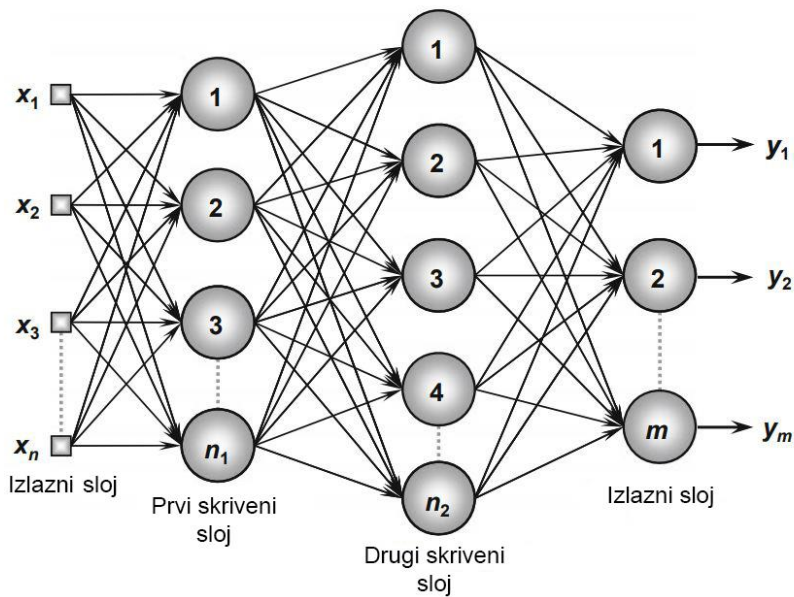
Slika 12.7. Hiperbolički tangens

12.1.5 Arhitektura neuronskih mreža

U osnovi se svaka neuronska mreža može podeliti u 3 osnovna dela (sloja):

- Ulazni sloj, ovaj sloj služi za prijem signala koji se dovode u neuronsku mrežu u kontekstu ove doktorske disertacije u ovaj sloj se dovode WLD:
- Skriveni slojevi, ovih slojeva može biti više i u njima se nalaze neuroni koji služe za pronalaženje obrazaca u podacima. U ovom sloju se izvodi najveći deo obrade podataka.
- Izlazni sloj, u njemu se nalaze neuroni koji služe za izračunavanje finalnog izlaza neuronske mreže

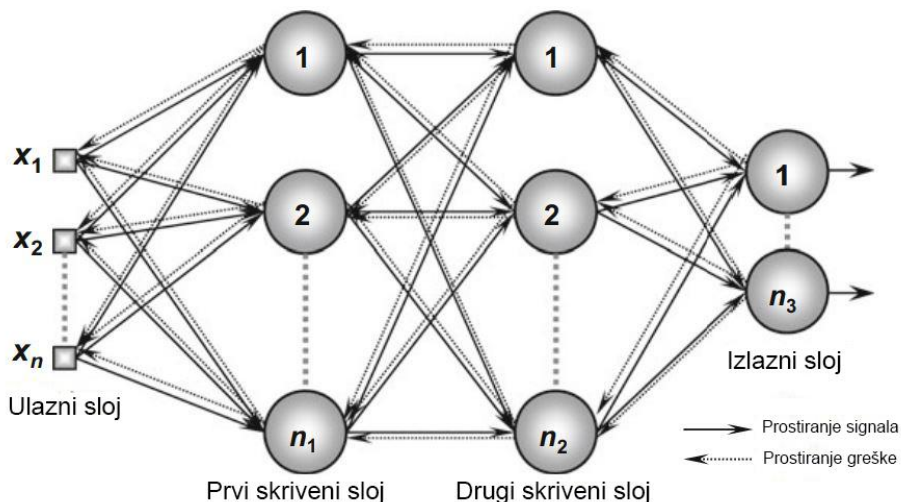
Na osnovu broja slojeva i njihove međusobne interakcije neuronske mreže se mogu podeliti: jednoslojne i višeslojne neuronske mreže sa prostiranjem signala u napred (gde spada i višeslojni perceptron, videti sliku 12.8), rekurzivne neuronske mreže gde se izlaz iz neuronske mreže vraća na ulaz u mrežu i „mreže“ neuronskih mreža gde se isti ulazi vode na različite mreže.



Slika 12.8. Primer vešeslojne neuronske mreže sa prostiranjem signala u napred sa dva skrivena sloja.

Da bi se kreirana neuronska mreža mogla da se koristi potrebno je podesiti njenje težinske funkcije u praksi ne najčešće susreću dva principa za obučavanje algoritama mašinskog učenja, to su supervizijsko učenje (učenje gde su za date ulaze poznati i njihovi izlazi), u nesupervizijsko učenje (učenje gde nisu poznati izlazi a algoritam pokušava pronaći obrasce u polaznom setu), kao treće tip obučavanja je kombinacija ova dva koji je u literaturi poznat pod nazivom “reinforcement” učenje.

U ovoj studiji koristi se višeslojna perceptronska mreža sa logističkom sigmoidnom funkcijom. Ovaj tip neuronske mreže se može obučavati primenom algoritma gde se greška prostire u nazad (eng. Backpropagation), odnosno greška za dati ulaz izračunava prvo u izlaznom sloju pa zatim u sloju koji njemu prethodi i sve tako redom do ulaznog sloja (pogledati sliku 12.9). U literaturi se ovaj algoritam može pronaći i pod nazivom „delta“ pravilo.



Slika 12.9. Povratno prostiranje greške kod MLP

12.1.6 Algoritam sa povratnim prostiranjem greške

Da bi se objasnio algoritam za obučavanje sa povratnim prostiranjem greške neophodno je usvojiti određene pojmove, ovi pojmovi će biti definisani za slučaj troslojne neuronske mreže prikazane na slici 12.10, međutim ovaj algoritam je jednostavno proširiti na proizvoljan broj slojeva:

$W_{ij}^{(L)}$ - težinski koeficijent između j -tog neurona iz sloja L i i -tog neurona iz sloja $L - 1$ (pogledati sliku 12.10)

$I_j^{(L)}$ – suma svih ulaza u j -ti neuron pomnoženih sa odgovarajućim težinskim koeficijentima.

$$I_j^{(1)} = \sum_{i=0}^n W_{ij}^{(1)} \cdot x_i \quad [12.11]$$

$$I_j^{(2)} = \sum_{i=0}^n W_{ij}^{(2)} \cdot Y_j^{(1)} \quad [12.12]$$

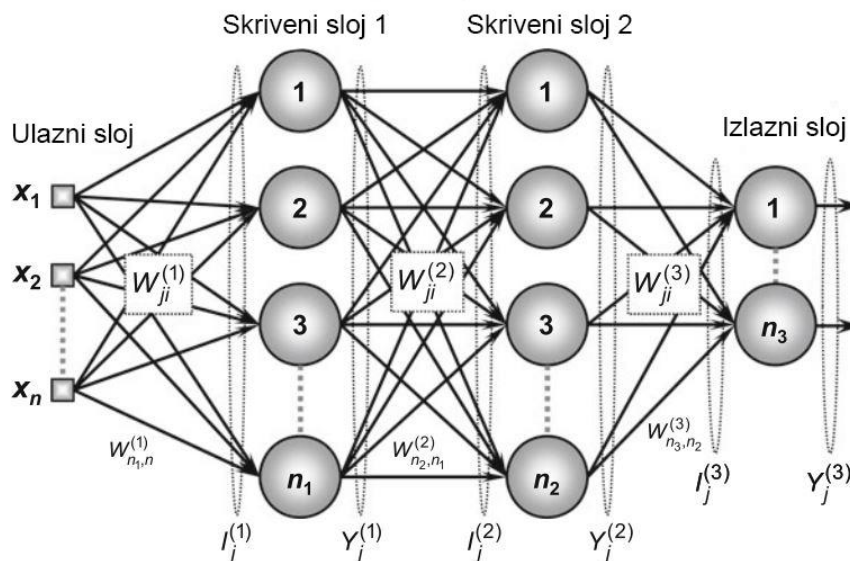
$$I_j^{(3)} = \sum_{i=0}^n W_{ij}^{(3)} \cdot Y_j^{(2)} \quad [12.13]$$

$Y_j^{(L)}$ – izlaz iz j -tog neurona u sloju L (pogledati sliku 12.11).

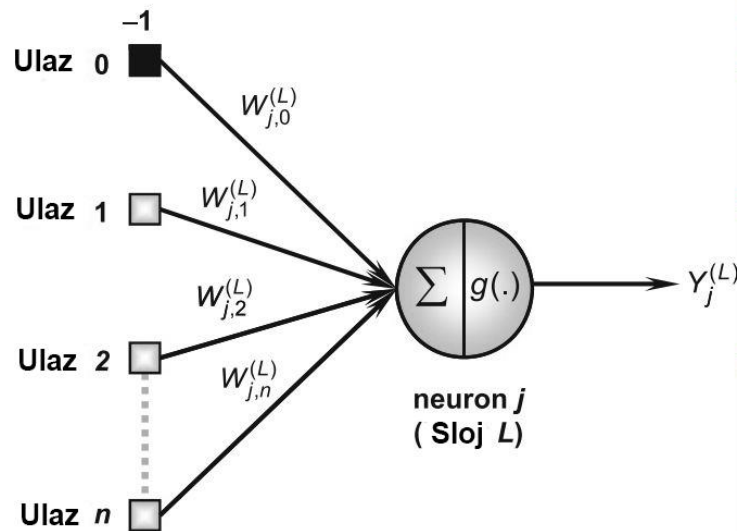
$$Y_j^{(1)} = g(I_j^{(1)}) \quad [12.14]$$

$$Y_j^{(2)} = g(I_j^{(2)}) \quad [12.15]$$

$$Y_j^{(3)} = g(I_j^{(3)}) \dots [12.16]$$



Slika 12.10. Težinski koeficijenti i slojevi kod neuronske mreže



Slika 12.11. Model neurona sa definisanim promenljivima

$E(k)$ - funkcija greške, ovom funkcijom se određuje odstupanje izlaza neurona od njegove željene vrednosti.

$$E(k) = \frac{1}{2} \sum_{j=0}^{n_3} (d_j(k) - Y_j^{(3)}(k))^2 \quad [12.17]$$

Gde je $Y_j^{(3)}(k)$ - vrednost izlaza neurona iz izlaznog sloja za k -ti uzorak, a $d_j(k)$ - željena vrednost tog izlaza.

12.1.7 Podešavanje težinskih koeficijenata

Da bi se minimizovala greška koja nastaje na izlazu neurona neophodno je odrediti njen gradijent u odnosu na težinske koeficijente (parametre koji se mogu podešavati)

$$\nabla E^{(3)} = \frac{\partial E}{\partial W_{ij}^{(3)}} = \frac{\partial E}{\partial Y_j^{(3)}} \cdot \frac{\partial Y_j^{(3)}}{\partial I_j^{(3)}} \cdot \frac{\partial I_j^{(3)}}{\partial W_{ij}^{(3)}} \quad [12.18]$$

$$\frac{\partial I_j^{(3)}}{\partial W_{ij}^{(3)}} = Y_j^{(2)} \quad [12.19]$$

$$\frac{\partial Y_j^{(3)}}{\partial I_j^{(3)}} = g'(I_j^{(3)}) \dots [12.20]$$

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^{(3)}} = -(d_j - Y_j^{(3)}) \dots [12.21]$$

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}^{(3)}} = -(d_j - Y_j^{(3)}) \cdot g'(I_j^{(3)}) \cdot Y_j^{(2)} \quad [12.22]$$

Kako bi se smanjila greška u sledećoj iteraciji neophodno je da se $W_{ij}^{(3)}$ menja suprotno od gradijenta:

$$\Delta W_{ij}^{(3)} = -\eta \frac{\partial E}{\partial W_{ij}^{(3)}} = -\eta \left(-(d_j - Y_j^{(3)}) \cdot g'(I_j^{(3)}) \cdot Y_j^{(2)} \right) \quad [12.23]$$

$$\Delta W_{ij}^{(3)} = \eta \cdot \delta_j^{(3)} \cdot Y_j^{(2)} \dots [12.24]$$

Gde je $\delta_j^{(3)}$ - lokalni gradijent prema j -tom neuronu u izlaznom sloju. Zatim se ova jednačina može prikazati u obliku koji pogodan za iterativni algoritam

$$W_{ij}^{(3)}(t+1) = W_{ij}^{(3)}(t) + \eta \cdot \delta_j^{(3)} \cdot Y_j^{(2)} \dots [12.25]$$

Primenjujući prethodni postupak za dugi skriveni sloj vazi:

$$\nabla E^{(2)} = \frac{\partial E}{\partial W_{ij}^{(2)}} = \frac{\partial E}{\partial Y_j^{(2)}} \cdot \frac{\partial Y_j^{(2)}}{\partial I_j^{(2)}} \cdot \frac{\partial I_j^{(2)}}{\partial W_{ij}^{(2)}} \dots [12.26]$$

$$\frac{\partial I_j^{(2)}}{\partial W_{ij}^{(2)}} = Y_j^{(1)} \dots [12.27]$$

$$\frac{\partial Y_j^{(2)}}{\partial I_j^{(2)}} = g'(I_j^{(2)}) \quad [12.28]$$

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^{(2)}} = \sum_{k=1}^{n_3} \frac{\partial E}{\partial I_j^{(3)}} \cdot \frac{\partial I_j^{(3)}}{\partial Y_j^{(2)}} = \sum_{k=1}^{n_3} \frac{\partial E}{\partial I_j^{(3)}} \cdot \frac{\partial (\sum_{i=0}^n W_{ij}^{(1)} \cdot Y_j^{(2)})}{\partial Y_j^{(2)}} = \quad [12.29]$$

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^{(2)}} = \sum_{k=1}^{n_3} \frac{\partial E}{\partial I_k^{(3)}} \cdot W_{kj}^{(3)} \quad [12.30]$$

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^{(2)}} = \sum_{k=1}^{n_3} \delta_j^{(3)} \cdot W_{kj}^{(3)} \quad [12.31]$$

Smenom prethodnih rezultata u polaznu jednačinu za gradijent greške u prvom sloju dobija se:

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ji}^{(2)}} = \left(\sum_{k=1}^{n_3} \delta_j^{(3)} \cdot W_{kj}^{(3)} \right) \cdot g(I_j^{(2)}) \cdot Y_i^{(1)} \quad [13.32]$$

$$\Delta W_{ij}^{(2)} = -\eta \frac{\partial E}{\partial W_{ij}^{(2)}} = \quad [13.33]$$

$$\Delta W_{ij}^{(2)} = \eta \cdot \delta_j^{(2)} \cdot Y_j^{(1)} \quad [13.34]$$

Gde je $\delta_j^{(2)}$ definisano kao:

$$\delta_j^{(2)} = -\left(\sum_{k=1}^{n_3} \delta_j^{(3)} \cdot W_{kj}^{(3)} \right) \cdot g(I_j^{(2)}) \quad [13.35]$$

Analizom poslednje jednačine vidi se da $\delta_j^{(2)}$ zavisi od vrednosti lokalnog gradijenta iz izlaznog sloja $\delta_j^{(3)}$

$$W_{ij}^{(2)}(t+1) = W_{ij}^{(2)}(t) + \eta \cdot \delta_j^{(2)} \cdot Y_j^{(1)} \quad [13.36]$$

Za prvi skriveni sloj se može ponoviti isti postupak kao i prethodni gde se sada dobija da greška u ovom sloju zavisi od greške u drugom skrivenom sloju:

$$\delta_j^{(1)} = -\left(\sum_{k=1}^{n_3} \delta_j^{(2)} \cdot W_{kj}^{(2)} \right) \cdot g(I_j^{(2)}) \quad [13.37]$$

$$W_{ij}^{(1)}(t+1) = W_{ij}^{(1)}(t) + \eta \cdot \delta_j^{(1)} \cdot x_i \quad [13.38]$$

U poslednjoj jednačini postoji razlika u odnosu na ostale jer je ulaz u prvi sloj ulaz u neuronsku mrežu x_i . Analizom ovako definisanog algoritma obučavanja greška u nekom sloju zavisi od greške u sloju posle njega odnosno da se greška prostire u nazad (od izlaza ka ulazu) [I.N. da Silva, D.H. Spatti, R.A. Flauzino, L.H.B. Liboni, and S.F. dos Reis Alves, Artificial neural networks: A practical course, Springer International Publishing, 2016]

12.1.8 Naive Bayes klasifikator

U tekstu disertacije definisan definisaj je Naive Bayes klasifikator, u nastavku prikazan je jednostavne klasifikacije pomoću Naive bayes klasifikatora. Ulazni podaci su dati tabelarno (videti tabelu 12.1.), u kojoj je dato 10 primera pacijenata kojima je izvršena dijagnostika kancera, kao dodatne informacije koje su mogle dovesti do razvoja kancera uzete su porodična anamneza (da li je neko u prodici pacijenta bolovao od kancera), da li je pacijent pušač i u kojem se starosnom dobu pacijent nalazi. Da bi mogla da se izvrši klasifikacija najčešće se koristi pravilo za procenu maksimalne verovatnoće „maximum a posteriori“ ili MAP pravilo [Thomas M. Mitchell. 1997. Machine Learning (1st. ed.). McGraw-Hill, Inc., USA.]. Na osnovu ovog pravila se vrši klasifikacija tako što događaj klasifikuje u onu klasu za koju ima najveću verovatnoću na osnovu bajesove teoreme. Radi jednostavnijeg objanjenja u ovom primeru se primenjuje redukovana formula gde se imenilac zanemaruje odnosno njegova vrednost je 1.

Na osnovu prethodne tabele 12.1 određujemo uslovne verovatnoće za svaki od atributa (dodatnih informacija i pacijentu). U tabeli 12.2 data je učestanost kod koliko je ljudi dijagnostifikovan kancer u zavisnosti od toga da li je isti dijagnostikovao kod nekog člana njegove porodice kao i prateće verovatnoće.

Tabela 12.1. Polazni podaci u primeru NB klasifikatora

Pacijent	Porodična anamneza – kancer	Pušenje	Doba	Dijagnoza kancer (klase: da i ne)
1	Da	Da	Srednje	Da
2	Ne	Da	Mlado	Ne
3	Da	Da	Mlado	Da
4	Da	Ne	Mlado	Ne
5	Ne	Ne	Staro	Ne
6	Ne	Ne	Staro	Ne
7	Ne	Ne	Staro	Da
8	Da	Da	Staro	Ne
9	Da	Da	Staro	Da
10	Da	Da	Srednje	Ne

Tabela 12.2. Učestanost pojave kancera i prateće verovatnoće koje su dobijene na osnovu polazne tabele 12.1. Određena je verovatnoća da li pacijent ima kancer ako je neko iz njegove porodice imao kancer.

$P(PorAna - K Kanc)$	Učestanost		Verovatnoća u klasi	
Porodična anamneza:	Kancer - DA	Kancer - NE	Kancer - DA	Kancer - NE
Da	3	3	3/4	3/6
Ne	1	3	1/4	3/6
Ukupno	4	6		

Tabela 12.3. Uticaj pušenja na pojavu kancera na osnovu podataka iz tabele 12.1.

$P(\text{Pušenje} \text{Kanc})$	Učestanost		Verovatnoća u klasi	
Pušenje	Kancer - Da	Kancer - Ne	Kancer - Da	Kancer - Ne
Da	3	3	3/4	3/6
Ne	1	3	1/4	3/6
Ukupno	4	6		

Tabela 12.4 Uticaj starosnog doba na razvoj kancera i prateće verovatnoće.

$P(\text{Doba} \text{Kanc})$	Učestanost		Verovatnoća u klasi	
Doba	Kancer - Da	Kancer - Ne	Kancer - Da	Kancer - Ne
Mlado	1	2	1/4	2/6
Srednje	1	1	1/4	1/6
Staro	2	3	2/4	3/6
Ukupno	4	6		

Tabela 12.5 Verovatnoća da li kancer postoji ili ne na osnovu polaznih podataka (Tabela 12.1).

$P(\text{Kancer})$	Učestanost		Verovatnoća u klasi	
dijagnoza	Kancer - Da	Kancer - Ne	Kancer - Da	Kancer - Ne
	4	6	4/10	3/10
	10			

Na osnovu prethodnih tabela imamo sve neophodno da izračunamo verovatnoću da li novi pacijent ima kancer ili nema. Sada je potrebno ispitati pacijenta za kojeg nemamo određenu dijagnozu a poznate su nam karakteristike date u tabeli 12.6.

Tabela 12.5. Novi pacijent

Pacijent	Anamneza	Pušenje	Doba	Kancer
Novi pacijent	Ne	Da	Srednje	?

$$\begin{aligned}
 P(\text{Kancer} = \text{DA}|\text{Novi pacijent}) &= P(\text{PorAna} = \text{K}|\text{Kancer} = \text{DA}) \cdot P(\text{Pušenje} = \text{DA}|\text{Kancer} = \text{DA}) \\
 &\cdot P(\text{Doba} = \text{Srednje}|\text{Kancer} = \text{DA}) \cdot P(\text{Kancer} = \text{DA})
 \end{aligned}$$

$$P(\text{Kancer} = \text{DA}|\text{Novi pacijent}) = \frac{1}{4} \cdot \frac{3}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{4}{10} = \mathbf{0,01875}$$

$$\begin{aligned}
 P(\text{Kancer} \rightarrow \text{NE}|\text{Novi pacijent}) &= P(\text{PorAna} = \text{K}|\text{Kancer} = \text{NE}) \cdot P(\text{Pušenje} = \text{DA}|\text{Kancer} = \text{NE}) \\
 &\cdot P(\text{Doba} = \text{Srednje}|\text{Kancer} = \text{NE}) \cdot P(\text{Kancer} = \text{NE})
 \end{aligned}$$

$$P(\text{Kancer} = \text{DA} | \text{Novi pacijent}) = \frac{3}{6} \cdot \frac{3}{6} \cdot \frac{1}{6} \cdot \frac{6}{10} = 0,02499$$

I na osnovu vrednosti verovatnoća zaključujemo da pacijent nema kancer jer je izračunata veća verovatnoća da ispitanik sa datim karakteristikama pripada klasi Kancer=Ne (Tabela 12.6.).

Tabela 12.6. Rezultat.

Pacijent	Anamneza	Pušenje	Doba	Kancer
Novi pacijent	Ne	Da	Srednje	<u>Ne</u>

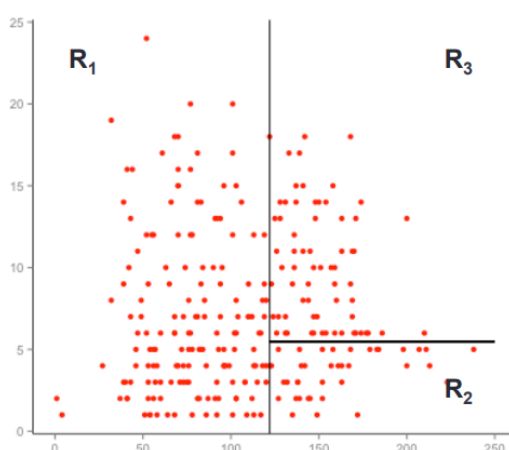
12.1.9 Klasifikaciona stabla

Veoma jednostavno klasifikaciono drvo može da se definiše kroz sledeći primer:

- Ako je promenjiva A ≥ 122 onda
 - o Ako je promenjiva B $\geq 5,5$ onda je rezultat pripada R_3
 - o Inače je rezultat R_2
- Inače rezultat je R_1

U slučaju dvodimenzionalnog prostora atributa moguće je izvršiti podelu prostora izlaza na 3 regiona kao u primeru iznad (videti sliku 12.12).

Stabla koja su napravljena tako da imaju maksimalnu veličinu mogu dovesti do „overfitting“-a što suštinski znači da će skup podataka na kojem se vrši obuka biti idealno klasifikovan drugim rečima doćiće do prevelikog poklapanja podataka za trening. Međutim, idealna klasifikacija trening skupa podataka ne znači da će i novi podaci biti idealno klasifikovani, odnosno može se reći da je ovakav klasifikator „specifičan“ za set podataka na kojem je obučavan. Ovo za posledicu ima da i mala odstupanja u vrednostima podataka (koja mogu nastati kao posledica šuma) od onih na kojima je klasifikator obučavan mogu dovesti do pogrešne klasifikacije. Da bi se dobio klasifikator koji je neosetljiv na mala odstupanja potrebno je izvršiti orezivanje stabala („Tree pruning“). Da bi se odredilo koliko je potrebno orezati stablo neophodno je koristiti neki kriterijum za definisanje veličine stabla, obično se ovo postiže krosvalidacijom tako što se određuje veličina stabla koja ima najmanju grešku.



Slika 12.12. Podela prostora izlaza uz pomoć klasifikacionog stabla.

12.1.10 Skupovi stabala (bagged trees – bag of trees)

Ova metoda klasifikacije bazira se na primeni na slučajnog uzorkovanja i zamenom podataka iz originalnog skupa (bootstrap), pri čemu nema ograničenja ponavljanja uzoraka u novom skupu. Za neki skup podataka deo uzoraka u procesu „bootstrap-a“ će biti izabran da ostane u skupu dok će drugi deo uzoraka biti izbačen iz skupa a njihovo mesto će zauzeti kopije uzoraka koje su ostale u skupu. Klasifikator koji se gradi na ovaj način će se obučavati na novonastalom skupu podataka sa a testiraće se na onim podacima koji su izbačeni iz skupa.

Primenom tehnike „bootstrap-a“ na nekom klasifikacionom modelu dobijamo metodu „Bagging-a“ tog klasifikatora. U slučaju stabala odlučivanja formira se orezano stablo za svaki skup koji je nastao tehnikom „bootstrap-a“ a zatim se kao finalni rezultat dobija srednja vrednost rezultata svih stabala. Ovaj metod dovodi do smanjenja varijanse rezultata u zavisnosti od izabranog trening seta [82].

12.2 PRILOG 2

Kodovi primenjeni u ovo disertaciju napisani su uz pomoć programskog jezika „R“ pri čemu je korišten IDE (Integrated development environment) „R-Studio“. U osnovi kodovi su slični za svaki tip klasifikatora i menjani su samo neophodni delovi. Kod se može podeliti u nekoliko segmenata:

- U prvom segmentu se vrši učitavanje i formiranje podataka na takav način da se koji zahtevaju funkcije koje se koriste za obučavanje klasifikatora.
 - o U početnom delu učitavaju se sve neophodne biblioteke
 - o Zatim željeni podaci u omis diogramima – ovi podaci se nalaze u CSV fajlovima kao nizovi podataka za svaku WLD.
 - o Zatim se uklanjaju sve vrednosti WLD koje nemaju nikavu promenu (njihova vrednost je konstantno nula)
 - o Pre dalje obrade svi podaci se „centriraju“ i „skaliraju“ tako svi WLD imaju indentičan interval (0-1) za promenu vrednosti bez obzira na minimalne i maksimalne vrednosti u polaznom skupu.
 - o Nakon toga se svi podaci (i zdravi i bolesni) spajaju u jednu grupu gde se zatim nasumično uniformno „izmešaju“ i razdvoje se na dve različite grupe za trening (75% podataka) i test (25% podataka)
- U narednom segmentu su izdvojeni kodovi za obradu promenjivi odnosno njihovu eliminaciju i smanjenje broja promenjivih koje utiču u klasifikaciji. U ovom segmentu se primenjuju dve varijantne koda, jedna varijanta koristi „*rfe()*“ funkciju koja je sastavni deo CARET paketa, a druga novo razvijeni kod za određivanje važnosti promenjivih baziranih ROC krivama i na njihovim korelacionim koeficijentima.
- Sledeći segment predstavlja kod za novi algoritam za određivanje važnosti i smanjivanje dimenzionalnosti podataka na osnovu vrednosti AUC i međusobne korelacije promenjivih. Ovde se kao podesivi parametar koristi maksimalna vrednost korelacije (0,25; 0,50; i 0,75;)
- Nakon toga se primenjuje kod za obuku klasifikatora, ovaj kod je prilično jednostavan i zahteva implementaciju jednostavne funkcije „*train()*“ koja se koristi za obuku izabranog klasifikatora. Prema dokumentaciji za svaki klasifikator postoji određeni broj parametara koji mogu da poboljšaju tačnost klasifikatora i granice promene tih parametara su definisane funkcijom „*trainControl()*“ i „*grid()*“. Svaki od parametara se menja dok se ne postigne maksimalna tačnost klasifikatora.
- Nakon svega navedenok pomoću funkcija „*predict()*“ i „*ConfusionMatrix()*“ ispituje se tačnost klasifikatora na test setu i ispisuju dobijeni rezultati u obliku konfuzione matrice.
- Na kraju postoje i dodatni kodovi za izračunavanje ROC krive kod rezultata dobijenih testiranjem klasifikatora

PRIMENJENI KODOVI U DOKTORSKOJ DISERTACIJI

- PRVI SEGMENT KÔDA – učitavanje i sortiranje podataka (OMIS dijagrama)

```
library(lattice) #dodatna biblioteka koja je potrebna CARET paketu
library(ggplot2) #dodatna biblioteka koja je potrebna CARET paketu
library(klaR) #dodatna biblioteka koja je potrebna CARET paketu
library(MASS) #dodatna biblioteka koja je potrebna CARET paketu
library(caret) #Ucitavanje CARET biblioteke (biblioteka koja je sadrzi klasifikatore)

library(parallel) #biblioteke koje su potrebne za paralelno procesiranje na procesorima sa
vise jezgara
library(iterators) #biblioteke koje su potrebne za paralelno procesiranje na procesorima sa
vise jezgara
library(foreach) #biblioteke koje su potrebne za paralelno procesiranje na procesorima sa
vise jezgara
library(doParallel) #biblioteke koje su potrebne za paralelno procesiranje na procesorima sa
vise jezgara

library(dplyr) # Dodatna biblioteka koju koristi CARET
library(pROC) # Dodatna biblioteka koju koristi CARET

registerDoParallel(4) # Registracija broja jezgara koji ce se koristiti paralelno procesiranje
getDoParWorkers() # Provera da li postoji navedeni broj jezgara

## Ucitavanje podataka
BOL = read.csv("TUMOR 710x710p.csv",TRUE,",")
ZDR = read.csv("ZDRAVO 710x710p.csv",TRUE,",")

# Uklanjanje nultih vrednosti na kraju dijagrama (pozicija od 221-256 u nizu vrednosti koje
dijagram prestavlja)
nule = c(221:256) #pozicije vrednosti koje je potrebno ukloniti iz dijagrama
BOL = BOL[,-nule] #uklanjanje u dijagramima za tumor
ZDR = ZDR[,-nule] #uklanjanje u dijagramima za zdravo tkivo

#pridruzivanje klasa za svaki tip dijagrama
BOL = cbind(tip="bolesno", BOL) # klasa za dijagrame tumora "bolesno"
ZDR = cbind(tip="Zdravo", ZDR) # klasa za dijagrame zdravog tkiva "Zdravo"

# predobrada podataka
podaci1 = rbind(BOL,ZDR) #formiranje tabele svih podataka sa pridruzenim klasama

podaci2 = podaci1[,-1] #dodatna promenjiva koja se koristi za randomizaciju podataka gde
je uklonjena klasa kako bi se izvršila cetriranje I skaliranje podataka
tip = podaci1[,1] # promenjiva koja sadrzi klase za svaki dijagram
naslovi = variable.names(podaci1) # promenjiva gde su sacuvane vrednosti talasnih duzina

podaci3 = scale(podaci2) # centriranje I skaliranje podataka [od svakog atributa (WLD) se
oduzme srednja vrednost i podeli se sa varijansom tog atributa (WLD) ]
```



```
podaci3 = data.frame(podaci3) # pretvaranje matrica podataka u dataframe format radi lakseg porcesiranja u klasifikatoru
```

```
podaci = cbind(tip,podaci3) # pridruzivanje klasa centriranim I skaliranim podacima
```

```
# Randomizacija podataka
```

```
set.seed(12345) # postavljanje seed-a (polaznog broja) za generator random brojeva
```

```
g = runif(nrow(podaci)) # Generisanje random brojeva sa uniformnom distribucijom
```

```
podaci_R = podaci[order(g),] # slaganje dijagrama prema rasporedu random brojeva
```

```
# Priprema train i test uzoraka
```

```
smp_size = floor(0.75 * nrow(podaci_R)) # odrejivanje velicine uzorka (75% se koristi za treniranje a 25% za testiranje)
```

```
train_P = podaci_R[seq_len(smp_size),] # izdvajanje trening seta podataka
```

```
test_P = podaci_R[-seq_len(smp_size),] # izdvajanje test seta podataka
```

```
# razdvajanje trening podataka na WD i klase
```

```
x_train = train_P[,-1] # izdvajanje WD
```

```
y_train = train_P$tip # izdvajanje klasa
```

```
# mora se primeniti ovakav pristup tako da bi svaki niz WD imao svoju odgovarajucu klasu nakon randomizacije podatak
```

```
# prvo se svakom dijagramu (nizu WD) pridruzi odgovarajuca klasa zatim se izvrsi
```

```
randomizacija pa se te klase opet odstrane
```

```
# u posebne promenjive, Vazno je primetiti da redosled klasa i dijagram je isti nakon randomizacije u x_train i y_train
```

```
# razdvajanje test podataka na WD i klase
```

```
x_test = test_P[,-1] # izdvajanje WD
```

```
y_test = test_P$tip # izdvajanje klasa
```

- PRIMENA "rfe()" FUNKCIJE (NAÏVE BAYES)

```
## Odredjivanje i izdvajanje talasnih duzina koje su najpogodnije za klasifikaciju
```

```
set.seed(12345) # postavljanje seed-a (polaznog broja) za generator random brojeva
```

```
control <- rfeControl(functions=nbFuncs, method="cv", number=10) # kontrolni parametri za algoritam za odredjivanje talasnih duzina najpogodnijih za klasifikaciju
```

```
# pod najpogodnijim parametrima smatraju se oni koji su najuticajnji na tacnost klasifikacije
```

```
# algoritam rangira WD prema uticaju na tacnost klasifikacije a zatim ispituje koji broj tih parametara daje najveću tacnost
```

```
# kontrolni paramettri su: klasifikator za koji se testira je NAIVE BAYES
```

```
"functions=nbFuncs", nacin testiranja tacnosti je kros validacija
```

```

# "method="cv"" sa 10 preklapanja "number=10"

results <- rfe(x_train, y_train, sizes=c(1:220), rfeControl=control) # funkcija koja pokrece
algoritam za odredjivanje najutiacajnih WD
print(results) # prikaz rezultata
predictors(results) # prikaz izabranih talasnih duzina
plot(results, type=c("g", "o")) # prikaz rezultata na dijagramu (zavisnost tacnosti od broja
WD)

# izdvajanje WD koje je algoritam pronasao na osnovu svih datih WD
rem = predictors(results)

xr_train = subset(x_train, select = rem) # izdvajanje za trening set
xr_test= subset(x_test, select = rem) # izdvajanje za test set

```

- **PRIMENA "rfe()" FUNKCIJE (RANDOM FOREST)**

```

## Odredjivanje i izdvajanje talasnih duzina koje su najpogodnije za klasifikaciju

set.seed(12345) # postavljanje seed-a (polaznog broja) za generator random brojeva

control <- rfeControl(functions=rfFuncs, method="cv", number=10) # kontrolni parametri
za algoritam za odredjivanje talasnih duzina najpogodnijih za klasifikaciju

# pod najpogodnijim parametrima smatraju se oni koji su najutiacajni na tacnost
klasifikacije
# algoritam rangira WD prema uticaju na tacnost klasifikacije a zatim ispituje koji broj tih
parametara daje najveću tacnost
# kontrolni parametri su: klasifikator za koji se testira je RandomForest "functions=rf",
nacin testiranja tacnosti je kros validacija
# "method="cv"" sa 10 preklapanja "number=10"
set.seed(12345)
results <- rfe(x_train, as.factor(y_train), sizes=c(1:220), rfeControl=control) # funkcija
koja pokrece algoritam za odredjivanje najutiacajnih WD
print(results) # prikaz rezultata
predictors(results) # prikaz izabranih talasnih duzina
plot(results, type=c("g", "o")) # prikaz rezultata na dijagramu (zavisnost tacnosti od broja
WD)

# izdvajanje WD koje je algoritam pronasao na osnovu svih datih WD
rem = predictors(results)

xr_train = subset(x_train, select = rem) # izdvajanje za trening set
xr_test= subset(x_test, select = rem)# izdvajanje za test set

```

- **NOVI ALGORITAM ZA PRED OBRADU PODATAKA I SMANJENJE DIMENZIONALNOSTI PODATAKA**

```

#funkcija koja odredjuje ROC krive za svaku promenjivu i izracunava AUC
modelfree = filterVarImp(x_train, as.factor(y_train))

```

```

#parametri neophodni za inicijalizaciju "while" petlje
k=2;
j=1;
n=0;

#kod za soritranje promenljivih prema vrednosti AUC iz varimp
nazivi_1 = modelfree; #importance$importance;
#nazivi_1 = importance$importance;
nazivi_2 = nazivi_1[rev(order(nazivi_1$bolesno)),];
nazivi = attributes(nazivi_2)$row.names
nazivi1 = nazivi
izbac = c(nazivi[1])
# petlja koja poredi vrednosti korelacije za najvazniju promenjivu sa ostalima I izbacuje sve
one koji imaju vrednost vecu od definisane granice
while (k<length(nazivi1)){
  for(i in k:length(nazivi1)){

    kor=abs(cor(x_train[nazivi1[k-1]],x_train[nazivi1[i]]))
    # ovde se definise vrednost maksimalne korelacije
    if(kor<0.25)
    {
      izbac[i] = nazivi1[i]
      j=j+1;
    }

    if(k>2){
      #readline(prompt="Press [enter] to continue 22222")
      #print(izbac)

    }
  }
  nazivi1=c(na.omit(izbac))

  #print(nazivi1)
  #readline(prompt="Press [enter] to continue")
  izbac = c(nazivi1[1:k])
  k=k+1
  #break
}

# odredjivanje redukovanog seta podataka i prikaz matrice korelacije novog seta u z pomoc
funkcije corrplot
xrc_train = subset(x_train, select = c(na.omit(izbac)))
testc=cor(xrc_train)
library(corrplot)
corrplot(testc)

```

- **OBUKA KLASIFIKATORA (NAÏVE BAYES)**

set.seed(12345) # postavljanje seed-a (polaznog broja) za generator random brojeva

```

# postavljan je uvek isti seed kako bi rezultati bili ponovljivi

grid = expand.grid(fL=0, adjust=1, usekernel=TRUE) # kontrolni podaci za NAIVE
BAYES klasifikator

model = train(xr_train,y_train,method =
"nb",trControl=trainControl(method='cv',number=10), tuneGrid = grid) # treniranje NAIVE
BAYES klasifikatora

model # prikaz modela

```

- **OBUKA KLASIFIKATORA (RANDOM FOREST)**

```

grid = expand.grid(mtry=(c(1:220))) # kontrolni podaci za RANDOM FOREST
klasifikator

set.seed(12345)

model = train(xr_train,as.factor(y_train),method =
"rf",trControl=trainControl(method='cv',number=10), metric = 'Accuracy', tuneGrid = grid)
# treniranje RANDOM FOREST klasifikatora

model # prikaz modela

```

```

pred1=predict(model$finalModel,xr_test)#$class # testiranje modela pomocu funkcije
"predict" i test seta podataka

```

TESTIRANJE KLASIFIKATORA

```

pred1=predict(model$finalModel,xr_test)$class # testiranje modela pomocu funkcije
"predict" i test seta podataka

```

```

#####
### 710K1 ###
#####
## ZDR-BOL ##
#####

```

```

confusionMatrix(pred1,y_test,positive = "bolesno") #prikaz konfuzione matrice i
odredjivanje specifcnosti i senzitivnosti modela.

```

- **KOD ZA RAČUNANJE ROC KRIVIH I AUC I ČUVANJE U EXCELL FAJLU**

```

#potrebne veličine za ROC krivu za funkciju roc() kod RF
predclass = predict(model$finalModel,xr_test, type = 'class')
predprob = predict(model$finalModel, xr_test, type = 'prob')

library(pROC)
#library(ROCR)
kriva_roc = roc(y_test,predprob[,1],
               levels = rev(levels(predclass)))

```

#potrebne veličine za ROC krivu za funkciju roc() kod NB

```
pred = predict(model$finalModel,xr_test)
kriva_roc = roc(y_test,pred$posterior[,1],
               levels = rev(levels(pred$class)))
#racunanje AUC i uspis u excel tabelu podataka iz roc()
```

```
auc(kriva_roc)
```

```
exll = kriva_roc
ex_sen = exll$sensitivities
ex_spe = exll$specificities
ex_auc = exll$auc
ex_auc
ex = cbind(ex_sen,ex_spe,ex_auc)
write.xlsx(ex,"RF3_ZDR-ZPT 710p.xlsx")
```

- **PRIMER REZULTATA DOBIJENIH POMOĆU FUNKCIJE „confusionMatrix()“ i „predict()“**

Confusion Matrix and Statistics

Reference
Prediction bolesno Zdravo
bolesno 35 5
Zdravo 3 36

Accuracy : 0.8987
95% CI : (0.8102, 0.9553)
No Information Rate : 0.519
P-Value [Acc > NIR] : 5.061e-13

Kappa : 0.7976
Mcnemar's Test P-Value : 0.7237

Sensitivity : 0.9211
Specificity : 0.8780
Pos Pred Value : 0.8750
Neg Pred Value : 0.9231
Prevalence : 0.4810
Detection Rate : 0.4430
Detection Prevalence : 0.5063
Balanced Accuracy : 0.8996

'Positive' Class : bolesno

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александра Драгичевић

Број индекса Д06/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биомеханичка и оптичка карактеризација епидермалног ткива“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 18.09.2020.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Драгичевић

Број индекса Д06/11

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада „Биомеханичка и оптичка карактеризација епидермалног ткива“

Ментор Проф. др. Лидија Матија

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 18.09.2020.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биомеханичка и оптичка карактеризација епидермалног ткива“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 18.09.2020.

1. Ауторство. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прерада. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.