

UNIVERZITET U BEOGRADU

Damjan Stojić

**EVALUACIJA SLIKA NEURONA I ASTROCITA
GLAVNOG MASLINASTOG JEDRA ČOVEKA -
NJIHOVA ANALIZA, KLASIFIKACIJA I
PRAĆENJE POMOĆU GEOMETRIJSKIH I
FRAKTALNIH PARAMETARA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

Damjan Stojić

**IMAGE EVALUATION OF NEURONS AND
ASTROCYTES IN THE HUMAN PRINCIPAL
OLIVARY NUCLEUS - THEIR ANALYSIS,
CLASIFICATION AND AGE FOLLOW UP
USING GEOMETRICAL AND FRACTAL
PARMETERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Mentori:

dr Mihailo Rabasović, viši naučni saradnik, Institut za fiziku u Beogradu

dr Andrej Korenić, naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

- prof. dr Zoran Nikolić, redovni profesor,
Fizički fakultet, Univerzitet u Beogradu
- dr sci. med. Saša Radovanović, naučni savetnik,
Institut za Medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu
- doc. dr Darko Ćirić, docent,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: 23.1.2024.

Zahvalnica

Nekolicini ljudi dugujem svoje poštovanje i zahvalan sam zato što je ova disertacija započeta i realizovana.

Na prvom mestu profesoru Nebojši T. Miloševiću koji mi je dao početne numeričke vrednosti i podržao u novom pristupu analizi slike kojim je iniciran pokušaj klasifikacije iz drugog ugla.

Doc. dr Dragani Radošević sa katedre za anatomiju sa novosadskog Univerziteta koja je realizovala slike sa timom anatoma i prosledila ih Medicinskom fakultetu u Beogradu na dalju analizu.

Profesoru Pavlu Anđusu koji mi je puno pomogao da finalne delove na studijama sprovedem u delo.

Profesoru Zoranu Todoroviću na iskrenom zalaganju i svesrdnoj pomoći da istrajem u radu na svojoj tezi.

Profesorki Mirjani Platiši na pravovremenoj spremnosti da me u svakom trenutku posavetuje i da me podrži.

Posebno se zahvaljujem mojim mentorima, višem naučnom saradniku dr Mihailu Rabasoviću i naučnom saradniku dr Andreju Koreniću, kao i članovima komisije, prof. dr Zoranu Nikoliću, naučnom savetniku dr sci. med. Saši Radovanoviću i doc. dr Darku Ćiriću.

“If you thought that science was certain - well, that is just an error on your part.” – Richard Feynman

Evaluacija slika neurona i astrocita glavnog maslinastog jedra čoveka - njihova analiza, klasifikacija i praćenje pomoću geometrijskih i fraktalnih parametara

Sažetak

U regionu produžene moždine čoveka nalazi se glavno maslinasto jedro koje pripada donjem maslinastom kompleksu. Taj deo ima ključnu ulogu u procesu sprovođenja finih motoričkih pokreta iz centralnog nervnog sistema usmerenih ka perifernom nervnom sistemu. Danas se smatra da populaciju neurona u glavnom maslinastom jedru čine multipolarni neuroni.

Iz glavnog maslinastog jedra posle prirodne smrti realizovane su slike neurona i astrocita iz pomenutog regiona. Razmatrani su multipolarni neuroni i dve vrste astrocita, fibrozni i protoplazmatični. Njihova morfološka struktura analizirana je pomoću geometrijskih i fraktalnih parametara.

U cilju određivanja najinformativnijih parametara koji daju najkvalitetniji opis na datim slikama morfologije neurona i astrocita u svakoj grupi, svi parametri su podeljeni na 4 morfološke grupe. Podela je izvršena za oba tipa ćelija. Zatim se pomoću analize glavnih komponenti i njoj srodnih alata određuje samo jedan najdeskriptivniji parametar sa datih slika iz svake morfološki distinktno grupe. Po sprovođenju ove procedure i za neurone i za astrocite iz svake od grupa dobija se po jedan najinformativniji parametar što se ogleda preko ukupno 8 parametara koji daju dovoljno dobru sliku opisa morfologije glavnog maslinastog jedra čoveka. Na ovo se nadovezuje starosna analiza neurona i starosna evaluacija za astrocite, korišćenjem *Pearson*-ovih koeficijenata. Razmatrale su se tri starosne grupe neurona, a starosna evaluacija astrocita se sprovela poredeći drugu grupu maturacije i drugu grupu starenja, pomoću starosnih grupa i preko godina individua. Celokupno istraživanje je izvedeno na uzorcima od 30 ljudi tj. 20 muškaraca i 10 žena. Razmatrana je fraktalna geometrija i revidirana morfološka funkcionalnost kroz evaluaciju simetrije, invarijantnosti na skaliranje i moguće veze sa spontanom narušenjem simetrije u prirodi.

Ključne reči: Analiza slika neurona čoveka, Analiza slika astrocita čoveka, Glavno maslinasto jedro, Analiza glavnih komponenata, Geometrijski parametri, Fraktalni parametri, Poreklo fraktalne geometrije

Naučna oblast: Biofizika

Uža naučna oblast: Morfologija neurona i astrocita čoveka centralnog nervnog sistema

Image evaluation of neurons and astrocytes in the human principal olivary nucleus - their analysis, classification and age follow-up using geometrical and fractal parameters

Abstract

Within the region of the human's medulla oblongata, the main contributor can be found in the section of the principal olivary nucleus as the central part of the Inferior olivary complex. Such domain is responsible for processing fine motoric movements from the central nervous system directed to the peripheral nervous system. Multipolar neurons comprise the population inside the principal olivary nucleus.

From the observed part of the medulla oblongata, the principal olivary nucleus, the images of neurons and astrocytes are obtained post-mortem using an optical microscope. The multipolar neurons are considered, and two types of astrocytes were examined: protoplasmic and fibrous. The further morphological structure was analyzed using geometrical parameters and fractal parameters. The main goal was to determine the most informative set of parameters that can describe the given large number of images and describe ones in the attributed morphological classifications for neurons and astrocytes. According to the given morphology for both cell types, the most informative parameters are divided into four morphological sets for every group or category. Further, using the principal component analysis and its corresponding tools, only one parameter from each group is extracted for application. Through this examination and the procedure for the given images of neurons and astrocytes, the most informative parameter is obtained, and the final set of 8 parameters was created for the end description of the whole region of the principal olivary nucleus. The examination is verified through the statistical comparison concerning three neuron age groups. For astrocytes, two age methods were compared. First, the age group comparison was conducted, and second, the relevant parameter follow-up based on the age of individuals was applied. The images were extracted from 30 persons post-mortem, 20 males and ten females. The physical origin of fractal geometry, its morphological and functional use in the symmetry of described systems, and possible connections with spontaneous symmetry breaking of scale invariance in nature are investigated.

Key words: Human neuron image analysis, Human astrocyte image analysis, Principal olivary nucleus, Principal component analysis, Geometrical parameters, Fractal parameters, Origin of Fractal Geometry

Scientific field: Biophysics

Scientific subfield: Morphology of human neurons and astrocytes of central nervous system

Sadržaj

1	Postavka	1
2	Nervni sistem	4
3	Glijalne ćelije centralnog nervnog sistema	8
4	Opis procedure, metodologija i primenjene tehnike	10
4.1	Analiza glavnih komponenata	12
4.2	Metoda k najbližih srednjih vrednosti	14
4.3	<i>Box-counting</i> metoda	21
5	Opis slika pomoću parametara	26
5.1	Nomenklatura korišćenih parametara pri opisu neurona	26
5.1.1	Veličina neurona	26
5.1.2	Oblik neurona	28
5.1.3	Dužina neurona i kompleksnost neurona	29
5.2	Nomenklatura korišćenih parametara pri opisu astrocita	30
5.2.1	Veličina astrocita	30
5.2.2	Oblik astrocita	32
5.2.3	Kompleksnost	32
5.2.4	Homogenost	33
6	Primena tehnika u opisu slika neurona i astrocita	35
6.1	Evaluacija slika neurona	35
6.2	Praćenje i evaluacija neurona GMJ-a kroz različite starosti primenom istih tehnika	49
6.3	Primena tehnika u opisu slika astrocita	52
6.4	Uticaj starosti i evaluacija astrocita GMJ-a primenom istih tehnika	69
7	Mesto fraktalne geometrije u opisu prirode	71

8 Zaključak	75
9 Prilozi	76
9.1 Prilog A - Analiza glavnih komponenata iz drugog ugla	76
9.2 Prilog B - Upotrebene funkcije u programskom jeziku R za dobijanje rezultata . . .	80
10 Literatura	82

1 Postavka

Unapređenje u pogledu manipulacije podacima danas se ogleda u procesu obrade istih, njihovom segmentacijom i pripremom za sledeći korak u daljoj nameni. Ovo se može podvesti pod nauku o podacima (engl. *data science*) [1] koja može angažovati različite tipove veštačke inteligencije za takvu namenu i dalje pretraživanje. U ovoj tezi elaborira se primena poznatih tehnika u sklopu nove metode u ovoj oblasti na većem skupu numeričkih podataka dobijenih ustaljenom dalje opisanom procedurom za neurone i astrocite korišćenjem izabranih geometrijskih i fraktalnih parametara [2] koji su se pokazali informativnim¹. Iz razloga funkcionalne primene dobijenih rezultata u opisu ovde korišćenih slika u narednim pasusima prođimo kroz postavljene osnove.

Neuronauka danas spaja višestruke oblasti nauke sa istom centralnom figurom nervne ćelije (neurona) kod čoveka. Bliska je evaluiranom materijalu u ovoj disertaciji. Preciznije, neuronauka je grana prirodnih nauka koja se bavi anatomijom, fiziologijom, biohemijom ili molekularnom biologijom nerava i nervnog tkiva, sa posebnim akcentom na njihovu relaciju sa ponašanjem i učenjem [3]. Od posebnog je interesa za čoveka na planeti Zemlji i celu ljudsku vrstu poznatu kao *Homo sapiens*, jedinog primerka iz roda *Homo* [4]. Ljudski mozak je izuzetno složena struktura iz koje se, u cilju proučavanja, izdvajaju anatomske celine sa određenim funkcijama. Karakteriše ga međusobna vremensko-prostorna povezanost njegovih delova i u ranijim ispitivanjima sa parametrima u opisu slika iz raznih regiona je pokazao nedovoljnu korelisanost sa trenutnim znanjem [2, 5–7].

Prvi trag visoke sofisticiranosti kod bioloških organizama postavio je 1944. *Erwin Schrödinger* u svojoj knjizi [8] u kontekstu drugačije organizacije od nežive prirode. Iz nje se nameće zaključak da kod bioloških sistema „život se hrani” tzv. „negativnom entropijom” ali je isto tako i neraskidivo vezan sa proizvodnjom pozitivne entropije i ireverzibilnim procesima [8]. Kasnije je slično stanovište postalo prisutno kada je *Ilya Prigogine*, takođe nobelovac, kroz svoja istraživanja produbio ovo shvatanje i konkretizovao ideju sa unutrašnjim podsistemima sa negativnom promenom entropije, pomoću koje se uspešno održava visoka unutrašnja uređenost [9]. Opis prirode i prisustvo simetrije *Prigogine* je uopštio na nivou kompleksnosti na različitim skalama bioloških sistema pomoću neravnotežne termodinamike i pokazao da kod neravnotežnih procesa uređenost postoji [10]. Na kraju, u drugoj deceniji 21. veka, preciznije, 2019. u svom poglavlju *Paulo Negro* [11] je ponovo to istakao. Tako se može smatrati da se neki stepen unutrašnjeg uređenja postiže na različitim skalama i kod bioloških sistema. Sa primenom unutrašnje segmentacije i usvajanjem nove paradigme, ispostavlja se da je radi svrsishodnosti i preciznijeg opisa praktično koristiti fraktalne parametre pri opisu samog sistema. Upotrebom i fraktalnih parametara osim euklidskih, ovde nazvanih geometrijskih, moguće je detaljnije opisati ćelijsku strukturu [2]. Takva praksa je ranije bila prezentovana, a ovde se ponovo primenjuje sa podrškom nove metodologije [12, 13]. Celokupna pomenuta analiza u okviru bliskog istraživanja je sprovedna sa adekvatnim euklidskim i fraktalnim parametarima, na ćelijskom nivou nervnog tkiva čoveka. Ovaj domen je zapravo domen fizike niskih energija u kojima se manifestuju biološki sistemi, a njihovu kompleksnost težimo da redukujemo radi jasnijeg opisa [10].

¹Pri elaboriranju i kvantifikovanju trenda u opisu celularnog nivoa adekvatnim 2D slikama mogu se koristiti numeričke vrednosti planarnih geometrijskih parametara ili fraktalnih parametara.

Za neurobiologe je sa druge strane oduvek bio jedan od osnovnih ciljeva da imaju što je moguće bolju predstavu o nervnom sistemu nekog organizma na različitim skalama kako bi mogli da pretpostave moguće funkcije i patološka stanja. U tom smislu za čoveka možemo reći da je ova predstavljena neuronaučna disertacija od sličnog pa i od većeg značaja kako bi se stvorila potpunija slika nedovoljno ispitanih delova nervnog tkiva.

Sa ovakvim prethodno prezentovanim ciljem, u ovoj tezi pokušaće se da se iz dobijenog materijala izvuče novim analitičkim pristupom kvalitetan i reprezentativan rezultat koji se može primeniti i na druge delove CNS-a ili čak na druge organizme.

Da bi neuroni uspešno obavljali svoju primarnu funkciju kod čoveka i drugih organizama potrebna im je podrška u više aspekata. Za svoju neophodnu podršku i homeostaznu ulogu su zadužene i glijalne ćelije od čije lokacijske geneze i evolucije zavisi i njihova uloga. U taj skup, morfološki gledano, ulaze astrociti, oligodendrociti i mikroglije, a njihovo okvirno poređenje sa regionom CNS-a, neokorteksom, iznosi redom, 20-40%, 50-75% i 5-10% od ukupne populacije glije u opisanoj oblasti [14]. Sveobuhvatno u modernoj naučnoj literaturi se za ovakvu ulogu koristi termin neuroglija ili neuroglijalne ćelije. Naknadno će se detaljnije ući u samu klasifikaciju i funkciju različitih tipova neuroglijalnih ćelija od kojih su astrociti u ovoj tezi detaljnije ispitivani i opisani.

Analizom precizne i detaljne slike određenog tkiva, počev od njegovog ćelijskog nivoa, možemo izneti manje ili više relevantne zaključke koje dalje upražnjavamo pri formiranju trenutnog suda o delu organizma koji ispitujeemo. U ovoj disertaciji će se predložiti nova metodologija u okviru koje će se za analizu slike koristiti različiti geometrijski (euklidski) i fraktalni parametri pri obradi slika uzoraka tkiva pojedinaca posle smrti (lat. *post mortem*). Kroz različite starosti individua utvrdiće se, sa novopredloženom metodom, najefikasniji parametar koji daje najprecizniji opis aktuelne particije nervnog tkiva iz relevantne slike promatranja. Ovde se nadamo da drugačija morfologija može da skrene uvid na neke nove klase istog tipa ćelija ili pokaže diverzitet u sklopu iste funkcije koju ta grupa obavlja i primećena je ranije.

Dok se ovakva analiza morfologije i funkcionalnosti i daleko ranije sprovodila [15] i zadovoljavajuće precizno primenjivala, sada imamo jednu drugačiju sliku, napredniju, uz korišćenje računara i različitih numeričkih metoda čime kreiramo celinu sa nešto deskriptivnijim različitim morfološkim jedinicama koje zahtevaju skretanje pažnje na njih. Ovim se pravi potencijlan obazir na nešto drugačije morfologije koje možda kreiraju sopstvenu konzistentu celinu unutar istog tipa nervnih ćelija. Unutar istraživanja [12, 13] novijeg datuma i ovog doktorata, izlaže se nova tehnika koja unapređuje prethodne podele i donosi novinu u ovom tipu istraživanja sa novim elementima unutar regiona produžene moždine (lat. *medulla oblongata*) i samog glavnog maslinastog jedra (GMJ-a) u donjem maslinastom kompleksu. Ova tehnika je u nastavku opisana preciznije.

U ovoj disertaciji se posredno, preko numeričkih podataka, analiziraju slike neurona, preciznije multipolarnih neurona, u GMJ-u čoveka i prate se neuroni sa starošću pojedinaca. Drugi tip, na isti način analiziranih slika, predstavljaju slike astrocita, fibroznih i protoplazmatičnih u istom regionu čoveka, koje se takođe razmatraju i u kontekstu starosti individue. U okviru date tematike izložiće se nova tehnika koja se bazira prvenstveno na analizi glavnih komponenata (AGK) u predloženim

grupama odakle će se iz svake grupe birati najinformativniji parametar, pomoću suplementarnih alata AGK, iz većeg skupa parametara, koji se dalje predlažu za upotrebu. Ovo sve prethodno izloženo prati i značajna vizuelna reprezentacija koja potvrđuje predstavljeno. Kao jedan tip verifikacije analize uvešće se koeficijenti koji opisuju kvalitet izabranih parametara i povezanost sa godinama individue tj. *Pearson*-ovi koeficijenti (*Karl Pearson*). Na kraju, razmotriće se budući pravci istraživanja u ovoj tematici koji mogu unaprediti ovu oblast analize slike.

Kako će se u nastavku izložiti, osnovni aspekt ove disertacije je da se na osnovu raspoloživih numeričkih podataka izvrši što je moguće uspešnija analiza dvodimenzionalnih (2D) slika neurona (preciznije, 259 slika neurona) i glijalnih ćelija (tj. 294 slika glijalnih ćelija iz grupe astrocita). Na osnovu rezultata analize će dobiti nova unapređena, ovde predložena, prvenstveno morfološka klasifikacija neurona i astrocita za određeni region ljudskog mozga, konkretno produženu moždinu.

Drugi aspekt i deo predstavljene teze razmatra same procese starenja (i neurona i glijalnih ćelija tj. ovde, konkretno, astrocita) i ireverzibilne procese koji sa njima nastupaju kod zdravih pojedinaca sa godinama i kod neurona i kod astrocita produžene moždine.

Prethodno opisana detaljna analiza [12, 13] slika multipolarnih neurona i astrocita iz produžene moždine i njihova klasifikacija na osnovu predloženih ispitivanih geometrijskih i fraktalnih parametara potiče od slika dobijenih optičkim mikroskopom iz seciranih delova zdravih pojedinaca. Treba imati u vidu da analizirane slike potiču iz produžene moždine. U ovom smislu, morfološke promene ćelija GMJ-a će se pratiti sa izabranim parametrima kroz finalne uzorke iz istog regiona pojedinaca različitih godina (što i jeste metodologija korišćena kroz celu disertaciju). *Pearson*-ovim koeficijentima finalno izabranih parametara kod astrocita će se njihov trend i brzina promene opisati. Kako se posmatraju i fibrozni i protoplazmatični astrociti, kod njih je ovo posebno značajno. Jedan od krajnjih ciljeva ovakve disertacije je svakako što bolji fenomenološki opis stanja morfologije neurona i astrocita zdravih pojedinaca različite starosti i njihova shodna najefikasnija kvantifikacija, primarno po najinformativnijim euklidskim i fraktalnim parametrima. Treba istaći da je celokupna analiza glavnog maslinastog ili olivarnog jedra sprovedena posthumno sa prethodno zdravim pojedincima bez ikakvih patoloških znakova čija su se moždana tkiva secirala radi hvatanja najbolje slike sa optičkim, odnosno svetlosnim mikroskopom. Time za neki pojedini neuron ili glijalnu ćeliju (ovde konkretno astrocit) možemo samo reći da je slika data iz najboljeg mogućeg ugla za koji se anatom sa višegodišnjim iskustvom opredelio, a ne iz neke od uobičajenih ravni (sagitalne, koronalne ili aksijalne) pri sagledavanju mozga, koje standardizuju metodologiju. Za potpuniju predstavu moramo biti strpljivi i nadati se nekim novim tehnologijama ili potencijalnim novim metodološkim pristupima koje bi nam omogućili prostornu reprezentaciju istih sa unifikacijom pristupa.

U slučajevima obrađenih slika neurona u ovoj tezi smatralo se da svaki neuron ima isključivo jedan akson. Neuroni imaju više aksona, ako se tretiraju inhibitorima kinaze glikogen sintaze-3 (GSK-3) [16]. Slično, akson je na datim slikama izostavljen iz analize, a bilo kakva inklinacija ka genezi, koja bi rezultirala slučajevima sa višestrukim aksonima, neće biti ispitivana.

Bitno je imati u vidu da kompletna AGK i pridružene analize u nastavku u sklopu AGK će pomoći da odredimo samo jedan najinformativniji parametar iz date grupe (6.1, 6.3). Naknadno, u analizi četiri izabrana parametara prolazimo prvo kroz metod siluete (potpoglavlje 4.2) koji će nam predložiti

maksimalnu prosečnu debljinu u odnosu na broj klastera. Ovaj broj predstavlja elaborat kompleksnijeg statističkog metoda koji predlaže finalni broj klastera. Sam metod siluete se pokazao kao najpouzdaniji u poređenju sa metodom lakta, koji će se ponovo izložiti detaljnije u nastavku. Kasnije, nakon druge uspešno sprovedene AGK sa četiri parametra sa po jednim izabranim iz svake grupe, dobijaju se konačne vizuelne smernice i reprezentacije mogućih preklapanja klastera (koja uvek prati, zbog statističke nesavršenosti procedure) kao i njihove distribucije u prostoru parametara koje se uklapaju u zavisnosti od broja predloženih klastera (sa najmanjim mogućim preklapanjem koje je neizbežno). Ova reprezentacija klastera će se sprovesti i u dve dimenzije i u tri dimenzije. Takođe, ovo isto će se sprovesti i za neurone i za astrocite.

2 Nervni sistem

U ovom poglavlju 2 proći ćemo kroz podelu nervnog sistema i relevantnog regiona. Nervni sistem ljudi se može anatomski podeliti na CNS i PNS i zajedno čine najkompleksniji sistem u ljudskom organizmu.

Tokom embrionskog razvoja embrionalna nervna cev prolazi kroz transformaciju i diferenciranje različitih svojih delova. Zbog izuzetne usaglašenosti sa endokrinim sistemom, primarno CNS-om i naknadno PNS-om, ostvaruje se krajnja izuzetno bitna homeostaza u organizmu.

Kasno u četvrtoj nedelji embriogeneze, rostralni deo (prema glavi) nervne cevi prolazi kroz savijanje u nivou gde će se formirati srednji mozak [17], odnosno mezencefalon (lat. *Mesencephalon*). Ovde na suženjima se izdvajaju prozencefalon (lat. *Prosencephalon*) budući prednji mozak i rombencefalon (lat. *Rhombencephalon*) budući zadnji mozak. Alarna ploča prozencefalona se širi na obe strane kako bi se formirao telencefalon (lat. *Telencephalon*), a bazalna ploča ostaje na mestu kao diencefalon (lat. *Diencephalon*) ili međumozak. Finalno, optička peteljka iz diencefalona je preteča mrežnjače i optičkog nerva. Tako diencefalon, mezencefalon i rombencefalon zajedno formiraju embrionalno moždano stablo. Kaudalni deo će dati produženu moždinu (lat. *medulla oblongata*) [17].

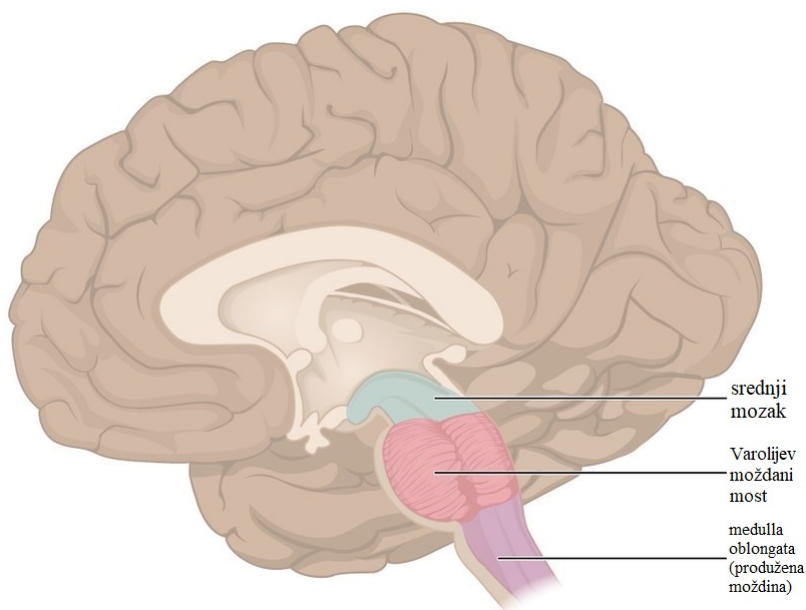
Mezencefalon se dalje „sprovodi” na obod mozga, a rombencefalon se uvija ka sebi čime se inicira romboidna (dijamantska) struktura četvrte komore (šupljine) mozga. Rombencefalon se kasnije razvija i formira *Varolio*-v moždani most (*Costanzo Varolio*) i mali mozak (lat. *cerebellum*) [17].

CNS čoveka se anatomski deli na dva dela, mozak i kičmenu moždinu [18]. PNS sa druge strane čine kranijalni nervi sa pridruženim ganglijama (grupe tela neurona koje se nalaze van CNS-a) i spinalni nervi sa svojim ganglijama [18].

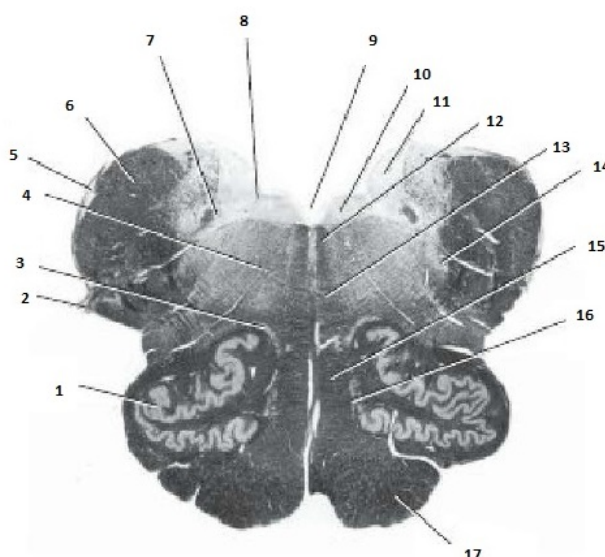
Mali mozak i produženu moždinu je potrebno dodatno preciznije opisati s obzirom da se u njihovoj blizini nalaze strukture analizirane u tezi. *Varolio*-v moždani most povezuje produženu moždinu sa srednjim mozgom. Produžena moždina ima kupasti oblik i kaudalno se nastavlja na kičmenu moždinu, a rostralno se prostire sve do moždanog mosta. Produžena moždina zajedno sa *Varolio*-vim mostom i srednjim mozgom gradi moždano stablo [19].

Produžena moždina prenosi signale od mozga do ostalih delova tela ključnih za disanje, cirkulaciju, gutanje i varenje. Od izuzetne je važnosti za život individue. Ona je jedan od tri dela moždanog stabla uz srednji mozak i Varoliov moždani most koji su locirani ispred malog mozga. Izgrađena je i od bele i od sive mase i u obliku je kupe kako je već istaknuto.

Slika 2.1 ispod to adekvatno oslikava [20], a sledeća slika 2.2 iz [18] daje adekvatan transverzalni presek produžene moždine. Na slici 2.2 brojevima su istaknuti i obeleženi delovi, sve uzimajući u obzir ažuriranu [21] nomenklaturu, čija imena su navedena na strani 6.



Slika 2.1: Moždano stablo [20]



Slika 2.2: Transvezalan presek produžene moždine u nivou sredine maslinastog jedra [18]

1. Nucleus olivaris inferior principalis (Donji maslinasti kompleks)
2. Nervus vestibulocochlearis
3. Nucleus olivaris accessorius dorsalis
4. Formatio reticularis
5. Nucleus cochlearis posterior
6. Pedunculus cerebellaris inferior
7. Nucleus tractus solitarii
8. Nucleus dorsalis n. vagi
9. Pod IV moždane komore
10. Nucleus n. hypoglossi
11. Nucleus vestibularis medialis
12. Fasciculus longitudinalis medialis
13. Tractus tectospinalis
14. Tractus et nucleus spinalis n. trigemini
15. Lemniscus medialis
16. Nucleus olivaris accessorius medialis
17. Pyramids

Donji maslinasti kompleks je najvećim delom čini GMJ čije morfološke karakteristike neurona i astrocita, koji ulaze u njegov sastav i koje u ovoj tezi proučavamo. On je u bliskoj vezi sa prostornom i vremenskom organizacijom planiranih pokreta i motornim učenjem. Generalno, celokupan maslinasto-cerebelarni sistem formira elegantnu mrežu i geometrijsku organizaciju radi transfera senzornih i motornih signala u cerebelarni korteks [5]. Takođe, GMJ obezbeđuje mrežnu projekciju organizacije maslinasto-cerebelarnog sistema i fleksibilnu distribuciju različitih informacija. Ovo sve doprinosi rafiniranosti motoričkih pokreta. Njegov osnovni konstituent su multipolarni neuroni. Bliško ovom, poznato je iz kliničnih studija da se kod pacijenata sa lakšim lezijama na obodu u lateralnim oblastima GMJ-a manifestuju manje motoričke smetnje, dok kod onih sa težim ireverzibilnim lezijama koje se pozicioniraju duž centralne linije koja razdvaja dve polovine GMJ-a, simptomi su teži [5]. Tako vidimo da stariji delovi maslinasto-cerebelarnog sistema kontrolišu primitivnije i merljivije mišićne aktivacije [5]. Skoro svi neuroni u ovom jedru su multipolarni sa kompleksnom dendritskom strukturom i značajnom simetrijom u svom obliku pa na osnovu takvih činjenica su kreirane istraživane morfološke grupe [22–24]. Isto tako sami početci ovakve analize imaju poreklo u istraživanjima sa kraja 8 decenije prošlog veka [25–27].

Početak formiranja GMJ-a se može opaziti u 8. nedelji intrauterinog života (unutrašnje struktuiranje prepoznaje se u 16. nedelji) dok u 14. nedelji dobija prepoznatljiv oblik [19]. Na nivou unutrašnje organizacije (strukture) jedra, kod fetusa starosi 20 nedelja primećuju se stvaranje grupa neurona na mestima budućih jedara dok se dendriti još uvek ne primećuju [19]. U narednim nedeljama, do 40. nedelje, dolazi do formiranja vidljivih dendrita, odnosno multipolarnih neurona i interneurona [19].

Moždano stablo čini produžena moždina, *Varolio*-v most i srednji mozak kako je već pomenuto i ono ima svoju funkciju koju obavlja. Preciznije, kontroliše funkcije autonomnog nervnog sistema kao što su disanje, održavanje krvnog pritiska i temperature tela, cirkulaciju, varenje i stanje budnosti u telu individue. Ovo delovanje se realizuje preko kranijalnih nerava. Ukupno 10 od 12 kranijalnih nerava se nalazi u moždanom stablu. Prva dva u vezi su sa mirisom i vidom čija čula potiču sa viših delova glave. Kranijalni nervi od 3 do 8 dolaze od srednjeg mozga i moždanog mosta, a nervi 9 do 12 potiču od produžene moždine.

Kranijalni nerv 9 je glosofaringealni (jezično-ždrelni živac) koji kontroliše gutanje, ukus i proizvodnju pljuvačke.

Kranijalni nerv 10 je vagus koji ima ulogu u disanju, održavanju srčane funkcije i varenju. Ovde se takođe nalazi centar parasimpatičkog nadražaja koji kontroliše proizvodnju hormona.

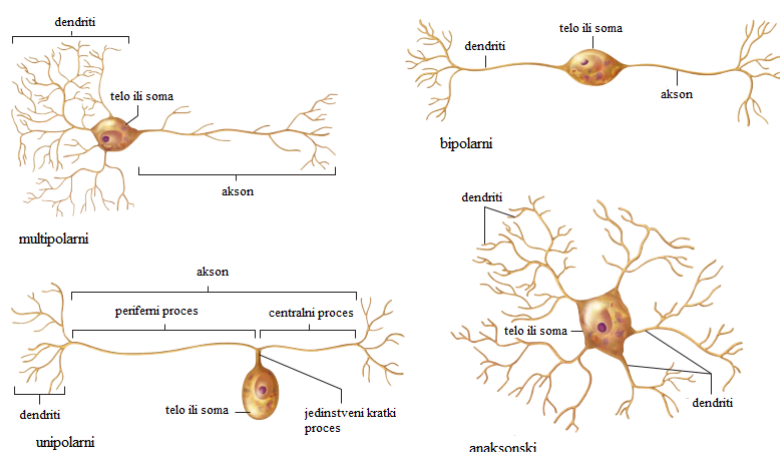
Kranijalni nerv 11 (lat. *n. accesorius*) ostvaruje kontrolu gornjih delova leđa i vrata.

Konačno, kranijalni nerv 12 je hipoglosalni nerv (ili podjezični živac) koji kontroliše pomeranje jezika i esencijalan je za govor i gutanje.

Zajedno svi ovi nervi koji preko produžene moždine uspešno funkcionišu su izuzetno bitni za uspešno sprovođenje osnovnih životnih funkcija.

U medicini su izuzetno važna patološka stanja koja su naknadno prouzrokovana, a blisko je povezana sa produženom moždinom. Takva stanja su *Wallenberg*-ov (medularni) sindrom (ili engl. *Lateral Medullary Syndrome*), *Dejerine-Roussy* sindrom (ili engl. *Medial Medullary Syndrome*) i Bilateralni medialni medularni sindrom (engl. *Bilateral Medial Medullary Syndrome*) [28].

Mogući morfološki oblici neurona (slika 2.3) dati su na ovom mestu. Neuron maslinastog jedra koje ćemo u ovoj tezi analizirati, odnosno njihove slike, su multipolarni neuroni maslinastog jedra [29].



Slika 2.3: Vrste neurona [29]

Sa druge strane, neuroglijalne ćelije se dele u CNS-u na astrocite, oligodendrocite, mikrogliju i endodimske ćelije [20]. U PNS-u ih delimo na satelitske ćelije i *Schwann*-ove ćelije (*Theodor Schwann*) [20]. O tome se nešto opširnije razmatra u narednom poglavlju 3 i kroz rezultat u potpoglavlju

6.3. Danas treba imati u vidu da su prisutni različiti stavovi u medicini i nauci pa zbog toga čitaocce upućujemo na literaturu [30] i aktuelne stavove. U nastavku će se osim kroz slike neurona maslinastog jedra proći i kroz slike dobijene iz uzorka astrocita iz istog regiona CNS-a, koji čine slike fibroznih i protoplazmatičnih astrocita.

3 Glijalne ćelije centralnog nervnog sistema

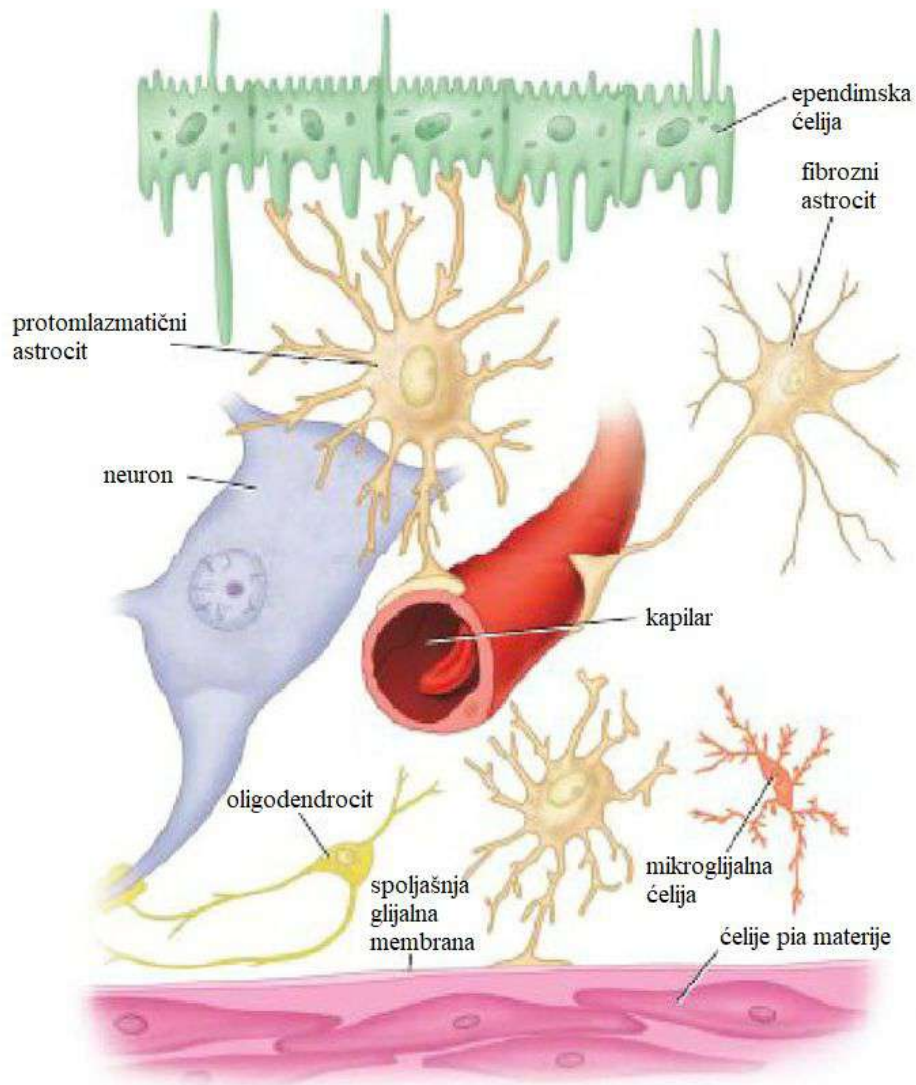
U ovom poglavlju, radi konzistencije u izlaganju, nastavićemo se na inicijalnu analizu glijalnih ćelija (poglavlje 2, Nervni sistem). Proćićemo kroz trenutne osnove i stanovišta u kontekstu podele CNS-a sa osvrtom na njegove konstituente vezane za glijalne ćelije koje ćemo u naknadnim potpoglavljima obraditi kroz primenu istih tehnika za analizu slika astrocita.

Moždano tkivo CNS-a se može podeliti na sivu i belu masu. Bela masa čini okvirno polovinu mozga [31] i zajedno sa sivom masom učestvuje u učenju ili kognitivnim procesima. Poznato je da se sastoji iz miliona aksonalnih svežnjeva koji povezuju neurone u drugim delovima mozga u funkcionalna kola. Bela boja iz naziva potiče od lipidnog materijala, mijelina koji obezbeđuje izolaciju za relativno brzo sprovođenje električnog impulsa. Mijelin je izgrađen do oko 150 slojeva gusto spakovane ćelijske membrane oko aksona i poznato je da njegovo oštećenje kompromituje stabilan prenos nervnog impulsa i time kreira lošiju senzornu, motoričku ili kognitivnu funkciju [31]. Siva masa sa druge strane, se prepoznaje po tamnijem kontrastu u današnjim tehnikama oslikavanja ljudskog organizma (magnetnom rezonancijom, skraćeno, MRI od engl. *Magnetic Resonance Imaging*) za razliku od bele, kao deo nervnog tkiva sa visokim udelom nervnih soma. I bela i siva masa se nalaze u kičmenoj moždini, koja ima važnu ulogu u kontroli pokreta individue [32]. Treba imati u vidu da siva masa CNS-a omogućava individuama svojstvenu kontrolu pokreta, memoriju i emocije [32].

Sivu masu čine tela neurona, a na njima se nalazi dendrijska krošnja (stablo) gde dolaze ulazne informacije (signali), vrši se njihova prostorno-vremenska sumacija na osnovu elektrohemijskog potencijala i ukoliko takav signal pređe prag za genezu akcionog potencijala, taj impuls se dalje prenosi preko aksona, vidljivih kao bela masa. U mozgu postoje unutrašnje oblasti sive mase koje su poznate kao jedra. Jedno takvo jedro je GMJ istraživano u ovoj disertaciji.

Osnovni konstituenti pomoću kojih se ostvaruje ćelijska arhitektura CNS-a su neuroni i različite glijalne ćelije. Tipovi glijalnih ćelija identifikovanih u CNS-u su astrociti, oligodendrociti, mikroglijalne ćelije i endodimske ćelije [18]. Adekvatna ilustracija svih tipova pozajmljena je iz iste knjige [18]. Svoj naziv u 19. veku poprimaju od vodećih neuronaučnika tog vremena (*Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal i Pío del Río-Hortega*). Tada je „glija” bilo preporučeno ime iz nemačkog za „nervni lepak” čime bi se aludiralo i na etiologiju iz starogrčkog imena za gliju koja zapravo znači lepak [30]. Treba uvek imati u vidu da i pored svakodnevnog ažuriranja radi preciznijeg sveobuhvata domena glijalnih ćelija i njihovih podtipova zbog pojedinih jedinstvenih uloga, pitanje kompletnog opisa glijalnih ćelija ostaje nerešeno [30]. U nastavku izložićemo funkcije svake od tipova glijalnih ćelija CNS-a i osnovna morfološka obeležja.

Početna saznanja danas o podstrukturama CNS-a, dobijena su kroz razmatranje pomoću elektronskog mikroskopa i MRI tehnike. Bela masa prisutna u CNS-u isključivo se ogleda u aksonima, mijelinskim omotačima i glijalnim ćelijama [33]. Pored aksona u sklopu bele mase, nalaze se ćelije oligodendrocita u najvećem broju, zatim, ćelije astrocita i mikroglije (kao naredni konstituenti po učestalosti) [33]. S obzirom da mikroglija vodi poreklo iz hematopoeze koja se u ranom embrionalnom razvoju odvija u zidu žumančane kese, koja počinje pre gastrulacije, to je onda specijalan, ekstraembrionalni mezoderm, različit od mezoderma koji predstavlja središnji sloj između ektoderma i endoderma. [34]. Astrociti i oligodendrociti potiču iz ektoderma, preciznije nervne cevi (koja nastaje od ektoderma) [33]. Ovde se jasno vidi embrionalna sličnost u genezi sa neuronima koji takođe nastaju iz ektoderma. Na sledećoj slici [18] 3.1 su ilustrovane glijalne ćelije CNS-a.



Slika 3.1: Glijalne ćelije centralnog nervnog sistema [18]

Danas se smatra da je opšte prihvaćena uloga fibroznih astrocita u beloj masi potporna uloga, uloga električnog izolatora, ograničenje širenja neurotransmitera i oduzimanje viška K^+ jona. Poseduju mala tela i dugačke nastavke, generalno. Dok uloga protoplazmatičnih u sivoj masi je da predstavljaju mesto za skladištenje glikogena, obavljaju ulogu u fagocitozi, zatim, popunjavaju mesto mrtvih neurona [18, 35], sprovode metabolite ili sirove materijale i proizvode tropične supstance. Imaju takođe mala tela i kratke nastavke sa mnogo grana.

Dalje, oligodendrociti formiraju mijelin CNS-a i utiču na biohemiju neurona. Svaki od njihovih nastavaka formira segmente mijelinskog omotača, kako oko različitih aksona, tako i na više mesta u okviru istog aksona.

Mikroglialne ćelije su neaktivne (u odsustvu zapaljenske reakcije u CNS-u) ali dolazi do njihovog aktiviranja i proliferacije tokom bolesti i zajedno sa monocitima učestvuju u procesu fagocitoze. Predstavljaju najmanje glijalne ćelije sa talasastim nastavcima i obitavaju i u sivoj i u beloj masi.

Na kraju, endimске ćelije predstavljaju zid komora i kanala u kojima je cerebrospinalna tečnost i apsorbuju je, a visoko specijalizovane endimске ćelije (horoidnog pleksusa) transportuju supstance, proizvode i sekretuju cerebrospinalnu tečnost. One su postmiotske ćelije i nastaju od ćelija radijalne glije tokom embriogeneze [36].

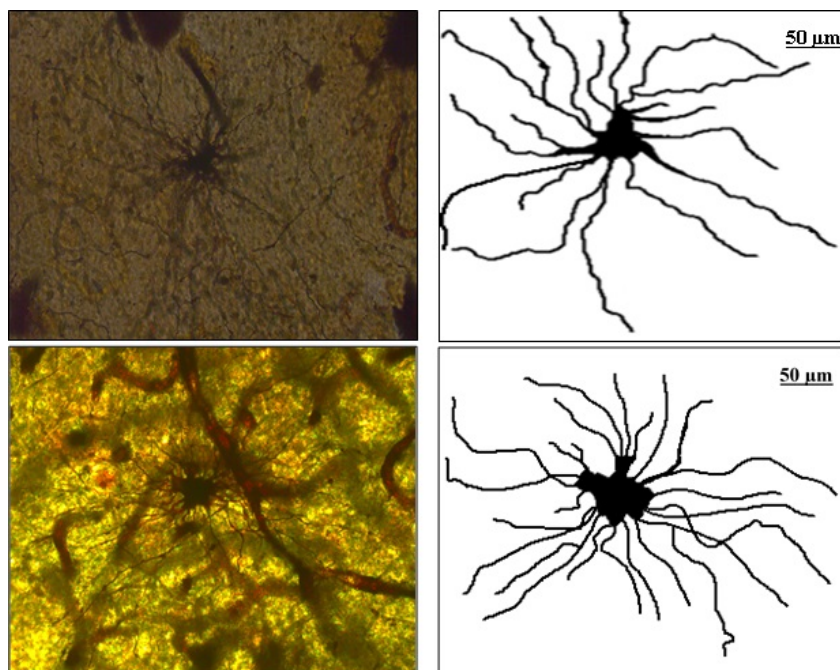
Sve iznad izloženo može da posluži kao motivacija za nastavak pregleda različitih struktura CNS-a i predstavlja kumulativno znanje na nivou 2019 [18].

Vraćajući se na ispitivani uzorak astrocita iz glavnog maslinastog jedra i kolekciji slika na kojima se apliciraju ponuđeni parametri, sprovedćemo analognu proceduru kao i u slučaju neurona. Jedan takav deskriptivni uzorak, na koji su primenjeni upotrebljeni parametri dat je na slici 3.2.

4 Opis procedure, metodologija i primenjene tehnike

U ovom poglavlju biće izložene kvantifikacione osnove materijala sa kojim su istraživanja sprovedena kao i uslovi kojima smo se vodili pre opisa esencijalne procedure za samu disertaciju. Naknadno, u sledećim potpoglavljima, daće se kratak pregled AGK, metode najbližih srednjih vrednosti i opisaće se metoda koja se uspesno primenjuje pri opisu objekta fraktalnom geometrijom.

Materijal čini 259 slika neurona GMJ-a i 294 slika astrocita (od kojih 148 fibroznih i 146 protoplazmatičnih) iz produžene moždine koje je dostavio Institut za anatomiju pri Novosadskom univerzitetu. Preciznije, uzorak pri ispitivanju neurona u studiji činili su bilateralni delovi GMJ-a koji originalno potiču od 30 ljudi odnosno 20 muškaraca i 10 žena, starosti od 35 do 90 godina. U slučaju neurona razlikovaće se tri starosne grupe. Prvu grupu maturacije (od 35 do 60 godina, grupa A) i prvu i drugu grupu starenja (prva od 61 do 75 godina, grupa B i druga od 76 do 90 godina, grupa C). Njihove morfološke razlike sa godinama predstaviće se pomoću poređenja različitih vrednosti parametara i istaći njihovu statističku relevantnost. Materijal vezan za astrocite razdvojiće se na drugu grupu maturacije (od 40 do 60 godina – kako je ovde prema raspoloživom materijalu granica nešto pomerena



Slika 3.2: Prvi red slika: Poprečni presek fibroznog astrocита iz GMJ-a i pridružena (desno) binarizovana slika. Drugi red slika: Poprečni presek protoplazmatičnog astrocита GMJ-a i pridružena binarizovana slika.

radi filtriranja verodostojnih slika) i drugu grupu starenja (od 76 do 90 godina) a sve će se uraditi u poređenju fibroznih i protoplazmatičnih astrocита i istaći će se parametri sa značajnim razlikama.

Celokupan materijal vezan za ovu analizu astrocита je dobijen od istih 30 ljudi tj. 20 muškaraca i 10 žena, ali ovaj put starosti od 40 do 90 godina, kako se na kraju ispostavilo. Ova razlika u godinama između dve kategorije slika potiče od originalne ideje kako bi se radilo sa što kvalitetnijom slikom astrocита na kojima se jasno ocrtavaju granice, pa time je starosna granica za ekstrakciju slika astrocита pomerana za 5 godina kako će se u disertaciji i koristiti.

U oba slučaja se uzorak iz produžene moždine sekao na delove dimenzija 2 cm (u dužini) x 1.25 cm (u širini) koji aproksimativno odgovaraju dimenzijama glavnog maslinastog jedra, tako da se u nastavku mogu tretirati sa najpouzdanijom tehnikom modifikovane *Golgi*-jeve metode (*Camillo Golgi*) impregnacijom srebra po *Kopsch-Bubenaite*-u prema opisu iz [19, 37].

Kako je prethodno navedena procedura posredno sastavni deo ove disertacije i kako je njenom primenom preparirano tkivo iz kojeg su dobijene slike korišćene za analizu, na ovom mestu će se u narednim pasusima ta procedura detaljnije opisati.

Metodom modifikovane *Golgi*-jeve tehnike impregnacijom srebrom po *Kopsch-Bubenaite*-u se već oko 140 godina nakon njenog uvođenja uspešno priprema nervno tkivo i postiže se kvalitetna impregnacija neurona i glijanih ćelija. Čini je pet koraka:

1. Delovi tkiva se fiksiraju u rastvoru od 10% formalin-natrijum-hlorida dva do četiri dana na temperaturi od 20° do 24° celzujusa.

2. Naknadna fiksacija se aplikuje primenom rastvora od 2.5% kalijum-bihromata na temperaturi

od 34° celzija u periodu od dva dana na mračnom mestu.

3. Ovo prati primena srebro-nitrata od 2% na istoj temperaturi od 34° celzijusa u periodu od dva dana u mračnoj komori.

4. Naredna je dehidracija uzorka, redom, etil-alkoholom od 70%, 80%, 96%, i 100% u vremenu od sukcesivno 24 h u svakoj od ovih koncentracija na temperaturi između 20° do 24° celzijusa.

5. U krajnjem koraku, tkivo se prosvetljava u ksilolu tri puta po 10 min i drži u parafinu tri puta po 24 h na temperaturi od 56° do 58° celzijusa.

Ovakvom procedurom preparacije tkiva obezbeđuje se njegova održivost smeštanjem na temperaturu od 56° do 58° celzijusa u parafin. Naknadno se uzorci seku u adekvatnom kalupu koji je na tzv. kliznom mikrotomu u horizontalnoj ravni, u odnosu na anatomske položaj GMJ-a. Debljina je standardizovana na 70 μ m i potom se uzorci deparafinišu. Postavlja se na pločicu i prekriva pokrovnim staklom sa kapljicom dibutil-filat-ksilena [19].

4.1 Analiza glavnih komponenta

Karl Pearson je 1901. javnosti demonstrirao kako se skup numeričkih podataka može aproksimirati pravama i ravnima [38]. Time zaključuje da se najverodostojnija i najreprezentativnija slika u mnogim fizičkim, biološkim ili statističkim istraživanjima sa numeričkim podacima dobija prelaskom iz više-dimenzionalnog euklidskog prostora na redukovanu vizuelno intuitivno prihvatljiviju reprezentaciju u manjedimenzionalnim prostorima pomoću prave ili ravni.

Matematički se ovo može formulirati, za dati skup prihvaćenog operativnog prostora, prave, ravni ili hiperpovršni kao:

$$y = a_0 + a_1x, \text{ ili}$$

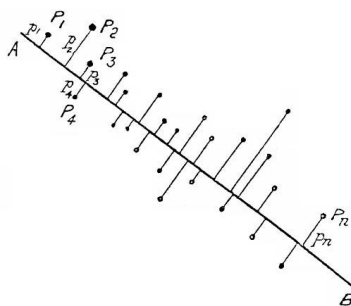
$$z = a_0 + a_1x + a_2y, \text{ ili}$$

$$z = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_nx_n,$$

gde su y , x , z i $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ varijable ili promenljive,

a a_0, \dots, a_n predstavljaju konstante ili veze koje će dati najbolje moguće uklapanje. Sledeća *Pearson*-ova slika 4.1 iz originalnog rada [38], možda najbolje oslikava najprostiji slučaj.

Rezultat ovoga je podela ponuđenih promenljivih na uobičajene nezavisno promenljive (x u prvom slučaju i x i y u drugom, odnosno, x_1, \dots, x_n u trećem) i zavisno promenljive (y u prvom i z u ostalim slučajevima) koje se mere, kako bismo dobili jedinstvene grafičke oblike zavisnosti. Kako svi eksperimentatori mere u svojim eksperimentima i zavisne i nezavisne promenljive, veze (koeficijenti) su jedini preostali parametri koji su presudni za što je moguće preciznije utvrđivanje relacija između navedenih. Naravno, treba imati u vidu, pri ovakvom inverznom određivanju, da će te iste veze biti podložne izvesnoj grešci. Shodno tome ćemo najbolju meru nazivati najboljom aproksimacijom u datom slučaju. Ovo je sve danas prisutno kod trivijalne linearne regresije.



Slika 4.1: *Pearson-ova* skica aproksimacije skupa tačkaka sa najboljim segmentom prave, tj. *AB* linijom [38]

Linearna regresija unutar nekog sistema se može proširiti po principu - aproksimira se dati skup podataka prvo tačkom (srednja vrednost), onda linijom (prva glavna komponenta), pa naknadno ravni (druga glavna komponenta); ovo se dalje može nastaviti hiperpovršima. Ova aproksimacija linearnim mnogostrukostima je zaživela u 20. veku. Mada ovakva aproksimacija daje dobru osnovu, treba imati u vidu da upotreba linearne regresije uzrokuje sve veće probleme zbog povećavanja šuma u nezavisnim promenljivama koje naknadno prave distorziju i odstupanje sa obimom aproksimacije i time postaje transparentno da je bolja aproksimacija od modela linearne regresije aproksimacija tačkama sa koordinatama iz novog pogodnijeg referentnog sistema. Bitno otkriće u aproksimaciji skupa podataka sa manjim konačnim skupom je uvođenje centroida u igru od početka sugerisanim od strane *Pearson-a*. Zamenom pojma k centroida sa pojmom k najbližih srednjih vrednosti na nekom uzorku tačkaka, će se dobiti particija bazičnog skupa sa prihvatljivom varijacijom unutar tog skupa. Kod primene metoda najmanjih kvadrata na različite distance između dve tačke, najbolje slaganje daje algoritam predstavljen kao metod k najbližih srednjih vrednosti [39].

Problem klasifikacije davno je poznat nauci i javnosti generalno i danas je prezentovan u različitom reimenovanom obliku iz bliskog domena nauke o podacima. Istraživači se sreću sa različitim bazama podataka (engl. *database*), dalje, istraživanjima o podacima (engl. *data mining*) i različitim mašinskim učenjem (engl. *machine learning*) kako bi se što je moguće efikasnije particionisao dati skup podataka, radi naknadne efikasnije pretrage [1]. Sa datom definicijom skupa podataka $A = \{a_1, \dots, a_n\}$ od n diskretnih merenja, indeksiranih na prethodni način, gde svako i uz a_i definiše jednu kategoriju, predloženi zadatak je da se pripiše vrednost indeksa i nekoj od postojećih kategorija a_i . Ovo će dovesti do nenadgledanog pristupa mašinskog učenja (engl. *unsupervised learning*) automatizacije procesa ili nadgledanog pristupa (engl. *supervised learning*) mašinskog učenja. Ova dva načina predstavljaju oblike mogućeg mašinskog učenja danas, a kako je cela procedura u ovoj disertaciji semi-automatska, nastaviće se sa nadgledanim pristupom mašinskog učenja.

Treba razumeti da se na problemu polu nadgledanog pristupa mašinskog učenja poslednje dve decenije intenzivno radi [40, 41] i da uvek postoji potreba za usavršavanjem algoritama. Pod polu nadgledanim pristupom će se ovde podrazumevati skoro² kompletna procedura po kojoj radi donošenja finalnih odluka u vezi opisanih slika, mora posmatrač da se umeša. U budućnosti Analiza relevant-

²Tačnije do na finalne odluke u odabiru izabranih parametara u skupu glavnih komponenata po kategorijama, kako od više njih postoji nekoliko atributa po kojima su birani.

nih komponenata (ARK engl. *Relevant Component Analysis*) bi mogla da pomogne pri utvrđivanju reprezentativne metrike između veza uočenih (tačaka u prostoru parametara) parova. Time bi se određeni parovi označili kao relevantni, dok bi se drugi odbacili kao irelevantni [1]. Ovo je sve predmet klasterifikacije opisane u sledećim pasusima.

Metod k najbližih srednjih vrednosti se smatra redukcionističkim metodom i obično se posmatra kao metod grupisanja (tzv. *clustering algorithm*) sa širokom primenom, kao i sama analiza glavnih komponenata (AGK, engl. *Principal Component Analysis*) kako dozvoljava zamenu mnogodimenzionalnog prostora sa projekcijom na najsmislenije manjedimenzionalne aproksimativne potprostore, po mogućstvu linearne mnogostrukosti. Time pristup metodom k najbližih srednjih vrednosti daje dobru aproksimaciju velikog skupa podataka sa najboljim odgovarajućim skupom k centroida. Čest je slučaj da se podaci projektuju na manje dimenzionalni potprostor pa se naknadno primeni algoritam k najbližih srednjih vrednosti kako bi se napravila kvalitetna klasifikacija [42]. Ovo je glavni razlog korišćenja AGK kao oruđa kojim se sprovodi dimenzionalna redukcija, jer se biraju dimenzije sa najvećom varijansom koja adekvatno skreće pažnju na odstupanje od homogenosti. Matematički ovo je ekvivalentno traženju najbolje aproksimacije nižeg ranga primenom dekompozicije matrice na singularne vrednosti. Analizom nervnog tkiva i odgovarajućim besplatnim softverskim paketom (ImageJ, [43]) dobijene su slike sa kojih su dalje izvedene numeričke vrednosti. Uz pomoć dobijenih numeričkih vrednosti i primenom istih osnovnih principa realizovana je njihova obrada u ovoj tezi. Opis ovog metoda razmotriće se u narednom potpoglavlju, a precizniji opis procedure detaljnije je izložen u Prilogu A (9.1).

Cilj je međutim, kod primene AGK, određivanje glavne komponente koja ima najveći uticaj pri grupisanju u određene morfološke grupe, kako bi se odredio prioritet fokusa iz velikog skupa varijabli. Ovim se u istom mahu prati i adekvatan parametar koji ima najveći intenzitet i projekciju na glavne komponente čime se vidi da jeste najdeskriptivniji. Pritom, sve prethodno izloženo definiše sopstvena najbolja aproksimacija u toj redukciji (ili separaciji na podskupove) po morfološkoj grupi³, na jednu korišćenu komponentu (tj. parametar iz početnog referentnog sistema) za koju će se pri povratku u inicijalni referentni sistem ili bazis, pokazati da ima najveći doprinos.

4.2 Metoda k najbližih srednjih vrednosti

Naredna bitna i druga tehnika u ovoj tezi korišćena je metoda k najbližih srednjih vrednosti. Formulirana prvi put 1967. godine od *MacQueen*-a [39] je jedna od najčešće korišćenih nenadgledanih (nasuprot nadgledanim algoritmima) algoritama mašinskog učenja za redukciju početnog datog skupa podataka na skupove od k grupa ili k klastera (gde k predstavlja unapred definisani broj grupa od analitičara ili eksperimentatora) međusobno sličnih po nekim unutrašnjim parametrima. U ovoj disertaciji je početni broj klastera utvrđen *metodom siluete* kako se alternativni *metod lakta* nije pokazao previše informativnim, a ovo će u nastavku biti detaljnije elaborirano. Objekti unutar istog klastera

³Kako je osnovna ideja izabrati jedan parametar od datih parametara u morfološkoj grupi iz drugog referentnog sistema, posmatra se uticaj na prvenstveno prvu i drugu gl. komponentu. Taj parametar se očekuje da najviše govori o sistemu.

poseduju što je moguće veću sličnost (engl. *high intra class similarity*) dok oni koji nisu u istom klasteru se značajno razlikuju (engl. *low inter-class similarity*) [44]. Distinkcija između ove dve veličine na razmatranim uzorcima je upravo odlučila kod izbora metoda za inicijalni broj klastera, da to bude metod siluete, nasuprot metodi lakta.

U samom klasteru njegovo središte je opisano svojim centrom (centroidom) koji odgovara srednjoj vrednosti tačaka (u apstraktnom prostoru parametara) pripisanih samoj grupi.

Unutrašnja varijacija po klasteru (i.e. *intra class similarity*) je veličina za koju zahtevamo da je minimalna kako bi separacija bila izvršena zadovoljavajuće. Tako je 1979. godine prihvaćena procedura za uspešnu klasterizaciju bazirana na *Hartigan-Wong*-ovom algoritmu, koji zadovoljava nametnuti uslov. U njoj suma ispod (jednačina 4.1) mora da je minimalna [44]:

$$S(k_j) = \sum_{x_i \in k_j} (x_i - \mu_j)^2 \quad (4.1)$$

gde je x_i tačka iz skupa podataka koja pripada klasteru k_j , a μ_j srednja vrednost tačaka pridruženih klasteru k_j .

Svaka opservabla x_i je na taj način pridružena datom klasteru tako da je suma kvadrata razdaljine između opservacija u tom klasteru i svog centra klastera μ_j , minimalna [44].

Unutrašnju sumu kvadrata (jednačina 4.2) definišemo ispod.

$$S_{usk} = \sum_{j=1}^k S(k_j) = \sum_{j=1}^k \sum_{x_i \in k_j} (x_i - \mu_j)^2 \quad (4.2)$$

Ukupna unutrašnja suma kvadrata meri kompaktnost tj. kvalitet klasterifikacije po zahtevu eksperimentatora i traži se da bude što je moguće manja.

Sam algoritam zahteva da se početno navede željeni broj klastera u skupu i započinje se sa biranjem k objekata iz skupa koji će služiti kao početni centri tj. centroidi klastera.

Dalje, preostali objekti se pripisuju najbližem centroidu čija se blizina meri euklidskom razdaljinom između objekta i njega. Ovo je korak pridruživanja.

Posle pridruživanja algoritam računa novu srednju vrednost (centroid izabranog klastera) svakog klastera. Ovo je ažuriranje skupa centroida. Nakon toga, centri klastera su ponovo izračunati i svaka opservacija je ponovo proverena kako bi bilo sigurno da joj je taj klaster najbliži. Svi objekti sada su ponovo pridruženi koristeći ažuriranu srednju vrednost skupa centroida [44].

Ove faze (korak pridruživanja i korak ažuriranja centroida) se iterativno ponavljaju dok konvergencija nije uspostavljena i pridruživanja se stabilizuju tako da klaster formiran u prethodnoj iteraciji je jednak klasteru formiranom u trenutnoj [44, 45].

U ovoj disertaciji je metod najbližih srednjih vrednosti primenjen u sklopu *R programskog paketa v4.3.0*. a radi vizuelizacije korišćeni su R pridruženi programski paketi *factoextra v1.0.7*. i u svrhu

3D vizuelizacije *rgl v1.1.3*. paket [46]. Knjiga [44] je korišćena i daje deskriptivan opis u realizaciji vizuelizacije.

U radu o klasifikaciji multivarijantnih opservacija iz 1967. godine *J. MacQueen* je prvi put naučnoj zajednici predstavio optimalnu klasifikaciju na osnovu pretpostavljenih sličnosti kvalitativnog i kvantitativnog razumevanja proizvoljno velikog N -dimenzionalnog skupa podataka [39]. Metod je trebalo da pokazuje dobro slaganje i sa teorijom i sa intuicijom. Trenutno, integracija ovakve metode poslužiće u novoskrojenoj proceduri na pravom mestu kako bi se određeni neuroni ili astrociti smestili u najpribližniji odgovarajući klaster. Pod klasterom u ovoj disertaciji smatraćemo skup elementa izabranih tako da zadovoljavaju morfološku podelu nasleđenu iz numeričkih vrednosti dobijenih pomoću projektovanih parametara.

Osnovni cilj u analizi numeričkih podataka dobijenih sa slika je da se prvo izdvoje u novom bazisu komponente sa najvećom varijansom unutar tog izabranog skupa (sa primarnom inicijalnom podelom na morfološke grupe) i nakon toga da se te komponente projektuju na originalne sa adekvatnim udelom kako bi se izabrala samo jedna iz posmatrane grupe ili kategorije. Ponavljanjem postupka za svaku grupu dobiće se samo po jedan reprezentativni parametar koji se pokazao najinformativniji za klasifikaciju i koji će učestvovati u separaciji po klasterima u našoj metodi dvodimenzionalnih slika neurona, a kasnije i astrocita u predloženom regionu.

Danas postoje različiti metodi kojima je moguće izvršiti particionisanje većeg skupa podataka u celine klastere određene na osnovu prethodno definisane sličnosti. Najkorisniji metodi su bazirani na: povezanosti po hijerarhiji, onda, metodi koji se povezuju sa cetroidima skupa i adekvatnom metrikom, dalje, metodi bazirani na verovatnoći pri distribuciji podataka i grupa, zatim, metodi koji slede iz gustine verovatnoće, raspodele na osnovu nesigurnih (engl. *fuzzy*) skupova i na kraju, klasteri na osnovu veza [47].

Metodi koji se povezuju sa centroidima skupa i adekvatnom metrikom danas predstavljaju najkorisniju i najzastupljeniju grupu, ali isto tako i grupu iz koje će se koristiti metod k najbližih srednjih vrednosti. Odgovarajuća preskripcija za upotrebu alata za AGK i 2D vizuelizaciju data je u knjizi [44, 45]. Postupak u koracima metode k najbližih srednjih vrednosti primenjen je u sklopu *R programskog paketa v4.3.0*. kako je ranije bilo naznačeno.

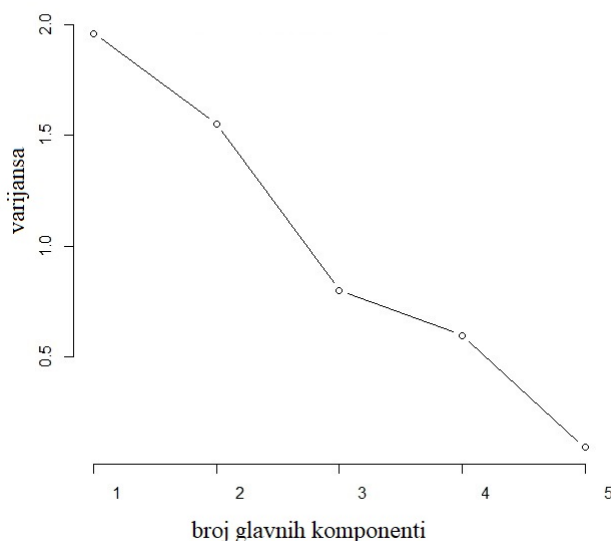
Pomoć u izoštravanju percepcije radi separacije različitih skupova u svoje odgovarajuće klastere metodom siluete sa novom tehnikom particionisanja skupova podataka i naknadne manifestacije vizuelnih grupa potiče od *Peter J. Rousseeuw*-a [48]. Ovo čini metodu kojom se inicijalna *J. MacQueen*-ova metoda unapređuje i klasteri vizuelno predstavljaju. Suština ovog metoda se ogleda u iterativnom postupku merenja distance između tačke pripisane nekom klasteru od karakterističnog izabranog centroida za isti klaster korišćenjem različite metričke udaljenosti i gledajući da ona bude što je manja moguća. Kod metoda k najbližih srednjih vrednosti prihvaćena metrička udaljenost je srednja vrednost. Treba imati u vidu da se inicijalni broj klastera određuje ili intuitivno ili predloženim *metodom lakta* na samom početku iteracionog procesa. Alternativa *metodi lakta* je *metod siluete*. Dok u *metodi lakta* tražimo tačku posle koje nove dodate tačke neće previše izmeniti sliku aktuelnog klastera, u *metodi siluete* nastoji se da se odredi da li postoje veliki rascepi između uzoraka (tačaka) i novih

dodatih tačaka u istom klasteru ili drugim klasterima. Pri ovoj komparaciji ćemo koristiti unutar klastera sumu kvadrata (ili unutrašnju sumu kvadrata) sa uračunatom euklidskom razdaljinom. Ideja je da unutrašnja suma kvadrata bude što je moguće manja (zbiženost tačaka unutar klastera), a separacija između klastera što je moguće veća (razdvojenost između klastera) [44].

Sada će se na ovom mestu evaluirati i uporediti obe metode (i *metod lakta* i *metod siluete*) na reprezentativnom uzorku za veličinu neurona i kroz finalnu primenjenu metodu k najbližih srednjih vrednosti na krajnjem skupu od 4 izabrana parametra za klasifikaciju neurona GMJ-a. Analiza astrocita je sprovedena na sličan način.

Započinje se sa multivarijantnom analizom slika neurona i 5 komponentata iz grupe Veličina, promatrajući dijagram prevoja (engl. *scree plot*) koji je jedan od rezultata AGK. Tada se posmatraju pripisani parametri kojima se opisuje slika u izabranoj grupi (ovde Veličina) iz drugog referentnog sistema i zaključuje se koji sada ima najveći intenzitet projekcije i dalje daje dobar odnos u pogledu na parametre iz iste grupe tj. najinformativniju projekciju.

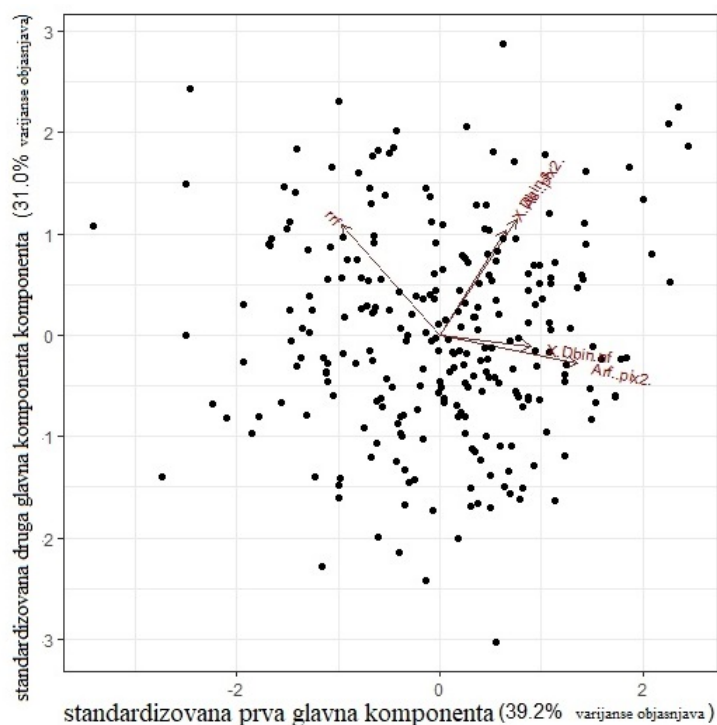
Dijagram prevoja pokazuje, da ako se pređe u novi referentni sistem ili bazis u tom referentnom sistemu, diskretan pad varijanse po glavnim komponentama, odnosno doprinos po varijansi od glavne komponente bi imao značajniji pad. Iz ovoga (slika 4.2) jasno vidimo da je najveći doprinos pripisan prvim dvema glavnim komponentama.



Slika 4.2: Dijagram prevoja; zavisnost varijanse od glavnih komponentata u izabranoj grupi Veličina

Ovo nije kompletna slika i za potpuno shvatanje mora da se uključi i biplot dijagram koji je još jedno oruđe danas blisko AGK i naučnoj javnosti je i predstavljen u drugoj polovini 20. veka [49].

Imena svih parametara koji se koriste vidljivih na slici 4.3 odlažu se za poglavlje 5, Opis slika pomoću parametara, potpoglavlje 5.1, Nomenklatura korišćenih parametara za sve neurone. Imena parametara astrocita su opisana u narednom potpoglavlju 5.2 gde će se detaljno izložiti i obraditi, a sada ćemo se fokusirati na metode za određivanje mogućeg broja klastera u uzorku.



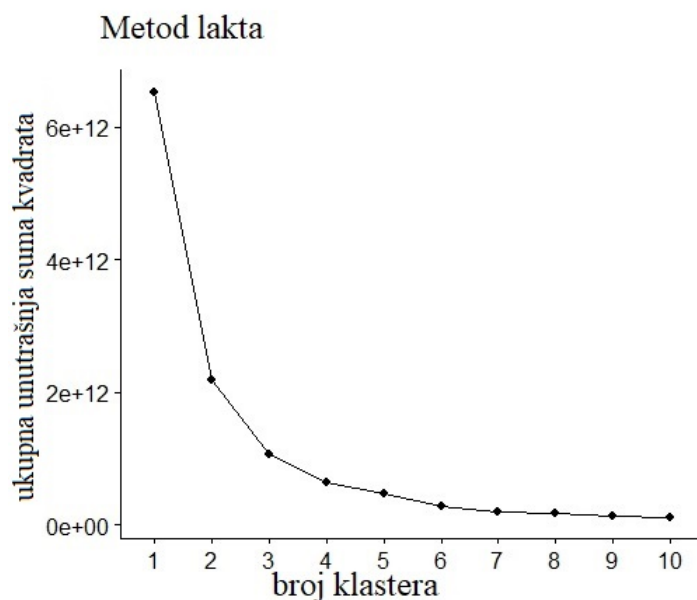
Slika 4.3: Biplot dijagram; položaj i zavisnost prvobitnih parametara od prve dve glavne komponente u novom referentnom sistemu u izabranoj grupi Veličina

Dijagram prevoja (slika 4.2) dobro demonstrira kako u novom referentnom sistemu u kom se preko glavnih komponenti prati opadanje promenljivosti po glavnim komponentama (donekle i po početnom parametru, kako je njegova projekcija implementirana nekim udelom u prve dve glavne komponente, što se vidi eksplicitno preko biplot dijagrama) odnosno, smanjenje varijacije na ordinati. Posle druge glavne komponente vidi se da varijabilnost drastično opada da bi kod treće došla do karakterističnog lakta po kome je metoda i dobila naziv. Pošto je naglašeno da se iz svake grupe bira samo jedan parametar, treba imati u vidu da se istovremeno prelazi na preciznije pozicioniranje sa grafikom (slika 4.3) koji pruža uvid u udeo izabranih parametara pri projekciji na prve dve glavne komponente.

Ovde treba imati u vidu da izvršena standardizacija dosta menja sliku posmatranih parametara kako bi intezitet po glavnim komponentama bio uporediv, ali je zaključak dovoljno konkluzivan. Ovo će definisati koji od predloženih parametara je informativniji. Kako dužina parametra govori o varijacijama, Arf..pix2. se svakako ističe zbog svoje dominantne uloge u varijacijama po prvoj glavnoj komponenti i zanemarljivo male (sada, iz novog referentnog sistema, negativne varijacije, koja je posledica neophodne standardizacije kod upoređivanja na biplot dijagramu) negativne varijacije po drugoj komponenti. Ovim se zaključuje da je izbor Arf..pix2. u grupi Veličina. Kako želimo da izvršimo podelu posle ovih pripremnih radnji, sprovede se metod k najbližih srednjih vrednosti i pomoću *lakat metode* i *metode silueta* i odrediti demonstrativno separaciju na klasterne. Radi elaboriranja optimalnog broja klastera korišćen je R programski paket *factoextra v1.0.7.*

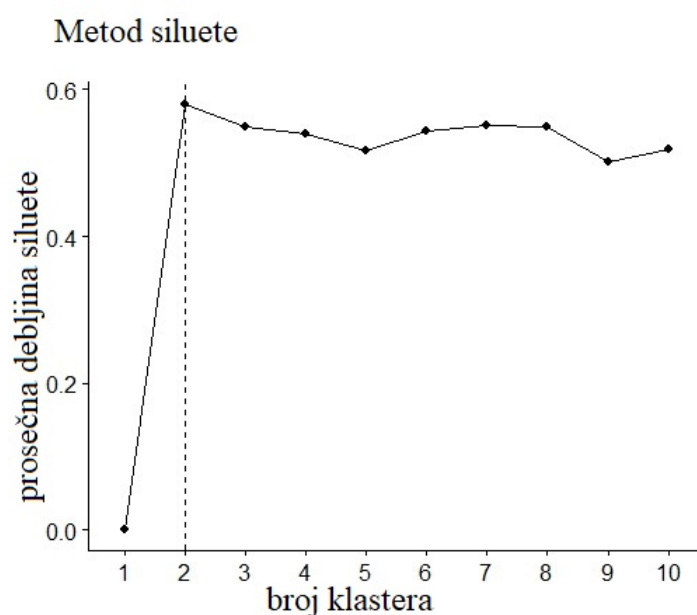
U *metodi lakta* (slika 4.4) algoritam kreira deo po deo blagu opadajuću linearnu krivu koja opisuje kako se separacija na klasterne uvećava do oštrog „lakat” prelaza, nakon čega se nastavlja deo po deo opadajući blagi linearni trend. Ako pratimo unutrašnju sumu kvadrata (na ordinati ili konvencionalno

„y osi”) koja sa većim brojem klastera (na apcisi ili „x osi”) drastično opada i lakat klaster (od koga broj klastera drastično počinje da se uvećava, a unutrašnja suma kvadrata smanjuje, jer je prisutna sve jasnija separacija) bi moglo da se nazove treći klaster, pod uslovom da se zaustavimo na tri klastera. Mada, oštro nalik laktu diferenciranje nije lako ovde izopštiti.



Slika 4.4: Metod lakta - grupa Veličina

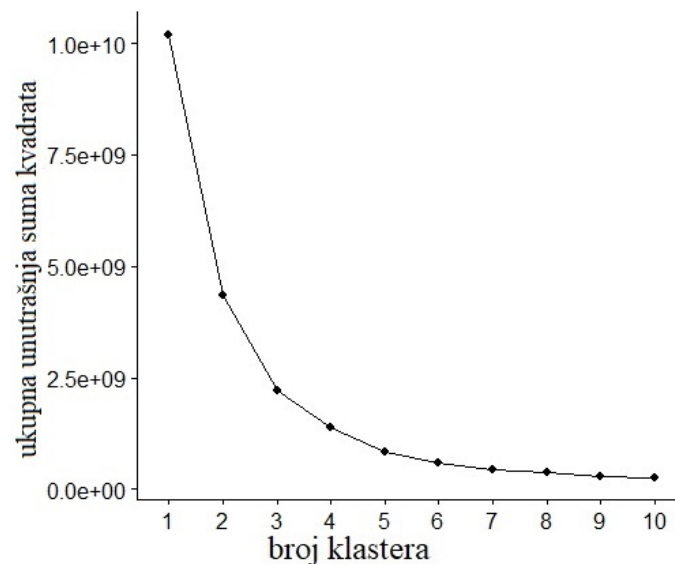
Sa druge strane kod *metoda siluete* (slika 4.5) bitna je prosečna širina (debljina) siluete, jer metod siluete meri koliko određena tačka teži blizu svog najbližeg suseda u tom klasteru i tako po svim klasterima. Ovim dobijamo informaciju o kvalitetu separacije na klastera i time se pruža informacija da li je potrebno novo ponovno razdvajanje. Određeni autori predlažu čak kombinovanje ova dva algoritma radi najboljeg uvida u datu situaciju.



Slika 4.5: Metod siluete - grupa Veličina

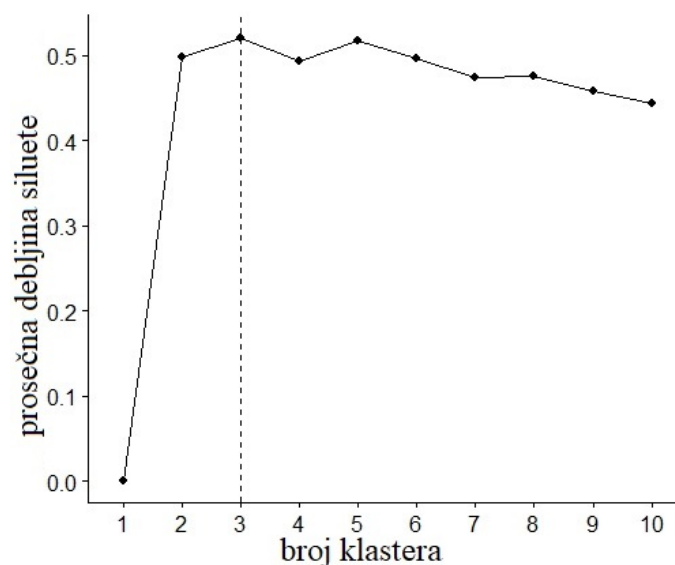
Ovde jasno vidimo da je na grupi parametara Veličina najbolja separacija na dva klastera, pa radi našeg početnog opredeljenja i jasnije distinkcije favorizujemo *metod siluete*, kako *metod lakta* nije dovoljno informativan u ovom slučaju.

Na krajnjoj grupi izabranih parametara posle sprovedene slične analize možemo videti pun kapacitet klasterizacije pomoću *metode siluete*. Pogledajmo finalnu *metodu lakta* (slika 4.6) koja ponovo ne ističe oštri prevoj i tako nam ne daje zadovoljavajuću separaciju.



Slika 4.6: Metod lakta na grupi od izabranih 4 parametra

Dok *metod siluete* (slika 4.7) nam mnogo uverljivije sugeriše separaciju na tri klastera kao minimalno i optimalno razdvajanje slika neurona po veličini i posredno samih neurona maslinastog jedra po preferentnoj distinkciji, odnosno podklasifikaciji.



Slika 4.7: Metod siluete na grupi od izabranih 4 parametra

Ne treba naknadno izgubiti iz vida da značajnost nekog parametra u grupi može da projektuje relevantnu razliku u skupu finalnih parametara. Ovo se vidi na slikama ispod u kasnijim potpoglavljima 6.1 i 6.3.

Sve ovo je samo okvirna predstava o kvalitetu primene upotrebljenih metoda k najbližih srednjih vrednosti i AGK, a sam rezultat primene istaknut je u centralnim aspektima analize u narednim poglavljima.

4.3 *Box-counting* metoda

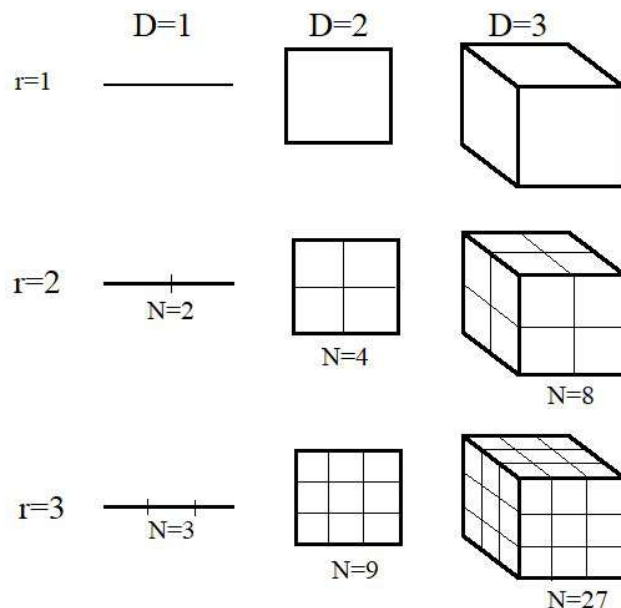
Pomoću fraktalne analize merimo pojavu u kojoj su detalji njenog dizajna jednako bitni kao i njena ukupna morfologija [2]. Danas je našla primenu u mnogim dijametralnim oblastima kakve su muzika, finansije, svermirska istraživanja, razvoj urbanih sredina, tehnologija materijala, geologija, epidemiologija, pretraga i spašavanje, procesiranje signala, dijagnostičko oslikavanje, histologija, morfologija tumora, vaskularnosti i prilikom opisa cele moždane strukture [2]. Sve se uopšteno odnosi na iste podjedinice strukture na različitim skalama za koje možemo reći da su slične (poseduju neki stepen unutrašnje simetrije, engl. *self-similarity*). U smislu fraktalne analize, ovakvu osobinu često nazivamo kompleksnost. Dok njenu vrednost u neuronauci vidimo kao fraktalnu dimenziju D_F gde primenu registrujemo i po vremenskoj dimenziji i po prostornoj dimenziji, generalno, a ovde i u sličnim naučnim radovima iz ove oblasti, fraktalnu dimenziju redukujemo na isključivo prostorne dimenzije i sličnosti po istim uočenim prostornim obrascima.

Nameće se zaključak da po predstavljenoj definiciji ili njenoj numeričkoj vrednosti (D_F) kompleksnost se posmatra kao promena detalja sa promenom rezolucije posmatrane slike. Ovaj broj je opisan bez dimenzija kao broj koji meri fraktalno skaliranje kao promenu detalja sa promenom skale na kojoj posmatramo sliku [2].

Ovu razliku u detaljima možemo lako ilustrovati slikom prave linije. Približavanjem i odaljavanjem tj. zumiranjem (od engl. *zoom* tj. uveličavanje) ma koliko puta, ne primećuje se razlika u reprezentaciji na slici. Ovakvu geometriju danas nazivamo prosto ravanskom ili euklidskom za razliku od geometrije koja uočava obrasce u ponavljanju na različitim nivoima uveličavanja tj. odaljavanja (jednostavno, transparentnosti na različitim nivoima uveličavanja) pri razmatranju neke slike. U nauci ovakvu osobinu zovemo invariantnost na skaliranje (engl. *scale invariance*) i predstavlja svojstvenu reprezentativnu osobinu fraktalne geometrije. Ako ovako nešto uviđamo, odnosno razliku sa drugih udaljenosti posmatranja u posmatranoj strukturi, javlja se potreba za readaptiranjem okvira koji uvodi u domen fraktalne geometrije, bitne u prezentaciji ove teze. Možda inicijalni razlog za manifestaciju fraktalne geometrije sa aspekta moderne nauke možemo pronaći u zakonima održanja i principu spontanog narušenja simetrije, iako je sve počelo sa sitnijim segmentiranjem fragmenata kako bi se izmerila izlomljena dužina koja sadrži statistički slične uzorke obale [50]. Treba imati u vidu da na kritičnim temperaturama faznih prelaza drugog reda sistemi postaju invarijantnosti na skaliranje, što jeste odlika fraktalne geometrije i ne zavise od energija tj. skaliranja na kojim se sistemi posmatraju [51].

Primećivanje sličnosti koje se ponavlja sa nekom učestalošću dovela je do predstavljanja veličina lakunarnosti ili multifraktalnosti. Dok lakunarnost se koristi kao mera heterogenosti, multifraktalnost nalazi određene familije pravila koja se ne mogu identifikovati sa jednim brojem fraktalne dimenzije [2].

Ako se započne sa razmatranjem objekta u eukidskoj dimenziji D ($D = 1$, prava; $D = 2$, kvadrat; $D = 3$, kocka; $D = 4$, hipekocka i itd.) i redukuje se linearno njegova veličina za $1/r$ (gde je r celi broj koji opisuje redukciju linearne dimenzije, odnosno mernog segmenta na simetrične podceline, slika 4.8) po svakoj prostornoj dimenziji, može se napraviti generalizacija.



Slika 4.8: Osnove fraktalne geometrije

Sa mernim segmentom N iz domena posmatrača na nivou date dimenzionalnosti, dobija se da se ukupna dimenzionalnost uvećala za $N = r^D$. Uvođenjem logaritma sa osnovom 10 u ovu jednačinu dolazi se do stanja da se dimenzionalnost može izraziti kao $D = \frac{\log N}{\log r}$. Ovim se dobija prostor da D ne mora više da bude celobrojna veličina kao u euklidskoj geometriji, nego razlomak, što jeste u fraktalnoj geometriji. Ovo je prvi uvideo nemački matemtičar 1918. *Feliks Hausdorff* [52] i uveo danas poznatu *Hausdorff*-ovu dimenziju.

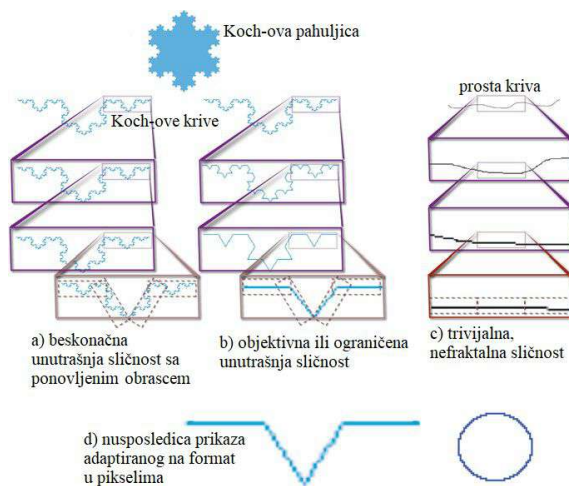
Tako Poljak po rođenju, a francusko-američki matematičar po doprinosu u svojoj afilijaciji, *Benoit Mandelbrot* predstavlja 1967. rad u kome pomoću niza izlomljenih linija meri dužinu obale Velike Britanije [50]. Skoro deceniju kasnije, 1975. upražnjava sintaksu „fraktalna geometrija” u sklopu pronalaska osnova za njenu primenu koju detaljno opisuje 1977. u svojoj knjizi *The Fractal Geometry of Nature* [53]. Danas se iterativna, skoro savršena repeticija obrazaca u prirodi objašnjava algebrom kompleksnih brojeva. Osnovni cilj ovde je da uz pomoć početne mere (etalona na pravolinijskom segmentu) za dužinu neke obale izmerimo ukupnu njenu dužinu. Kako bi povećali preciznost merenja, lenjirom (sa ustanovljenim etalonom) sa kojim merimo dužine delova konture obale, izvršićemo segmentaciju puta. Pritom notirana ukupna vrednost dužine se povećava i ukupna suma će težiti većoj meri. U limesu, ako je merna jedinica infinitezimalno mala ukupna dužina je beskonačno dugačka.

Ovim javnost menja shvatanje percepcije dužine. Kako bi dalje napredovali sa teorijom fraktala potrebno je napraviti manju digresiju. Engleski matematičar *Lewis Fry Richardson* je u prvoj polovini 20. veka predstavio zavisnost po kojoj je veza između procene dužine trajektorije obale i dužine skale na kojoj posmatramo, data logaritamskim grafikom. Time jasno naglašava tzv. *Richardson-ov* paradoks, iznad istaknut, po kom smanjivanjem mernog etalona na sve manje i manje uzorke dolazimo do sve duže obale i na kraju beskonačno duge [54].

Razmatramo sada pojam *Koch-ove* krive (*Niels Fabian Helge von Koch*) u smislu prethodnog pasusa. Može se definisati *Koch-ova* kriva kao fraktalna kriva konstruisana zamenom dela prave linije sa višestrukim linijskim segmentom pravih linija koji menja inicijalni segment sa nizom povezanih lokalno simetričnih pravih segmenata povećavajući kompleksnost tog intervala prave linije. Ovakva zamena inacijalnih segmenata zarad preciznijeg opisa je upravo potencijalna zamka na koju treba posebno obratiti pažnju.

Ovo dovodi do zaključka da fraktalna geometrija može dati kvalitetne rezultate, ako zadržavamo dovoljno preciznu meru koja odgovara datoj skali i svako odstupanje od nje daje manje ili veće odstupanje rezultata. Pravo umeće je uspostaviti zadovoljavajuću meru za skalu posmatranja i dobiti najkvalitetnije rezultate pri upotrebi fraktalnih parametara u datoj analizi slike.

Na slici 4.9, [2], prikazana je (do na mogućnost grafičkog prikaza formata slike) beskonačno složena unutrašnja simetrija fraktalne linije (a) zatim, objektivna unutrašnja sličnost fraktalne prirode (b) i trivijalna unutrašnja sličnost koja je manifestna neveštom posmatraču (c). Na kraju vidimo posledicu promene načina prikaza, kako menjanje rotacionog ugla luka njegovih fundamentalnih delova koje beleži objektiv su aproksimirani sa nizom koraka kako bi se prikazao skup pikselima na slici (d).

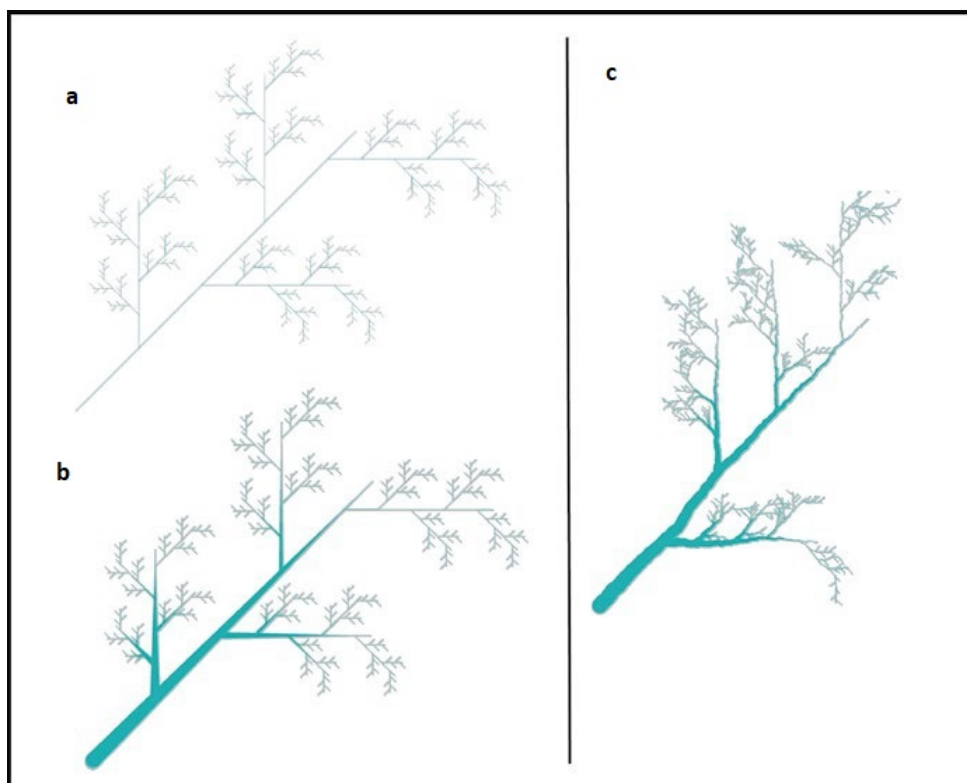


Slika 4.9: *Koch-ove* krive i objektivni nedostatak reprezentacije [2]

Predstavićemo formalno D_F logaritamsku promenu detalja W u odnosu na logaritamsku promenu skale posmatranja S , tj. eksplicito (jednačina 4.3) u nastavku.

$$D_F = \frac{\log W}{\log S} \quad (4.3)$$

Predstavljena jednačina 4.3 opisuje nivo detalja neke slike i njihovu zbijenost u odnosu na opšte principe prostorne simetrije, sa promenom iz koje perspektive posmatramo, pritom održavajući osnovne generalne geometrijske odnose. Treba imati u vidu da ovo jeste *Hausdorff*-ova dimenzija uvedena pomoću jednačine (4.3) predstavljene iznad. Ovakva jednačina koja promovise prostornu promenu detalja sa promenom skale, sa tim što bi trebalo da se na svakoj sledećoj skali krije isti prostorni obrazac da bi jednačina bila tačna, matematički zahteva da fraktal bude beskonačan i egzaktan. Ovo nije slučaj u prirodi i na različitim skalama više ili manje se odstupa u zavisnosti od detalja aplikacije, ali matematika pokazuje da ovakvi obrasci ponašanja u prirodi nesavršeno (odnosno, približno, do na moguće spontano narušenje simetrije) postoje. Danas je potpuno jasno da unutrašnja sličnost na nivou sličnih obrazaca postoji (slika 4.10) [2] i da nam oni mogu pomoći u razumevanju fundamentalne organizacije u svetu oko nas i u izvačenju relevantnih zaključaka.



Slika 4.10: Egzaktna i statistička unutrašnja sličnost grananja [2]; (a) Egzaktni skeletonizovan obrazac sa unutrašnjom simetrijom koji reprodukuje multiplikacionu jedinicu (4 grane na svake $\frac{3}{8}$ dužine noseće grane) zapisano teoretski $D_F = \log 4 / \log(8/3) = 1.41$ (b) Isti fundamentalni obrazac grananja reprezentovan kao silueta originalne grane sa originalnim opadanjem debljine sa dužinom (c) Kompjuterski generisan obrazac sa unutrašnjom simetrijom sa istim pravilom za D_F

Sa prethodnim uvodom u finalnim koracima definišemo samu efikasnu tehniku koja se koristila pri obradi slika neurona i astrocita u ovoj tezi.

Kako bismo pristupili ovom problemu na pravi način, moramo da prvo definišemo dimenziju kvadrata iz kog crpimo informaciju, odnosno da ispitamo slike sa uvećanom rezolucijom detaljnih elemenata (W) i da odredimo odnos skaliranja (S) i podataka iz niza. Ovakav pristup je sličan skaliranju pri uveličavanju *Koch*-ove krive, uzimajući u obzir razliku da kod *box-counting* metode stvarna

veličina i jedinica detalja su irelevantni, slika je procesirana koristeći proizvoljnu vrednost skale, pa su i jedinice detalja preuzete.

Na kraju ovog potpoglavlja trebalo bi uzeti u obzir da različite strukture prilikom ispitivanja nervnog sistema moraju da se drugačije tretiraju analizom parametrima, nezavisno da li je ona fraktalna ili geometrijska. Naime, određeni delovi mozga podležu invarijantnosti na skalu u smislu diskretnih struktura [2]. Tako neke strukture su konzistentne do na desetostruko uvećanje u poređenju sa ćelijom ili njenim delom ili čak cele ćelijske kulture [55], dok druge nekonvergiraju istom monofraktalnom parametru. Tako različite strukture zavise od nivoa uvećanja ili nivoa rezolucije od nivoa tkiva do ćelijskog nivoa i sitnijih molekularnih detalja i zahtevaju za opis nešto drugačije adekvatne parametre, ali iz iste familije [2].

Ovakvo traženje jedinica detalja se uglavnom prepušta softveru, dok analitičar nalazi obrazac po kome se stvara. Uvek treba imati u vidu da ti isti obrasci koji se ponavljaju je moguće egzaktno opisati u prostoru kompleksnih brojeva što je još i sam *Mandelbrot* istakao [53]. Tako možemo reći da je *box-counting* dimenzija tip empirijski određene veličine koja predstavlja prosečnu fraktalnu dimenziju (D_F) koju određuje operativni softver u odnosu na promenu detalja po promeni skale. Ne identifikuje ili ne zavisi od prepoznavanja stvarne jedinice detalja, a obično je određen regresionom linijom koja sledi iz jednačine 4.3 [2].

U kontekstu istaknutog, lakunarnost je veličina komplementarna familiji D_F zasnovana na podacima prikupljenim *box-counting* metodom [56]. Meri heterogenost obrasaca okarakterisanim prostornom suzbijenošću ili razvučenošću, rotacionom invarijantnošću i vizuelnom spojivošću teksturnih delova gde svaki deo u *box-counting* metodi se implementira u zavisnosti od svoje mase. Ovakve delove prepuštamo zainteresovanim čitaocima da se upoznaju pomoću pridružene literature [2]. O primeni fraktalne geometrije i shodnoj epistemološkoj manifestaciji elaboriramo u zaključnim delovima disertacije.

Završimo ovo potpoglavlje sa rečenicom iz knjige „*Mind Tools*” koju je napisao matematičar *Rudy Rucker* „Život je fraktal u *Hilbert*-ovom prostoru”.

5 Opis slika pomoću parametara

5.1 Nomenklatura korišćenih parametara pri opisu neurona

U potpoglavlju 5.1 bavimo se imenima pridodatim parametrima koji su korišćeni u nastavku za analzu slike. Parametri korišćeni u ovoj tezi su parametri dvodimenzionalne projekcije neurona i astrocita. Ipak zbog aktuelne korišćene notacije oni se radi programske prilagodljivosti u različitim koracima i konverzije moraju notirati pod nešto drugačijim imenom. Naime, ova drugačija notacija potiče uglavnom zbog konverzije i čuvanja tabelarnih podataka kao .csv (*Comma-separated values*) dokumenata. Na ovom mestu ćemo tu razliku izložiti i svesti na isto, radi potpune jasnoće, mada ova razlika je prepoznatljiva i nedvosmislena.⁴

Parametri dvodimenzionalne projekcije neurona (ukupno 23 inicijalno, posle filtracije, 17) mogu biti geometrijski (13) i fraktalni (4) i mogu se početno podeliti na tri anatomske različite grupe ([22–24]). U prvu grupu spadaju parametri u bliskoj vezi sa veličinom neurona, u drugoj grupi nalaze se korišćeni parametri koji služe za opis oblika neurona i u treću grupu spadaju parametri korišćeni za opis dendritske krošnje neurona.

5.1.1 Veličina neurona

U grupi Veličina neurona imamo 8 parametara i originalni nazivi na srpskom su ispod (dok su u zagradi nazivi na engleskom (i notacija) korišćeni u našim istraživanjima i publikacijama [12, 13]). U tezi je takođe korišćena engleska notacija.

1. *Površina tela ili some neurona* [57, 58]⁵ (engl. *Surface Area of the Neuron Soma* odnosno engl. A_s)

Čini ukupan broj piksela binarne (crno-bele) slike tela neurona i izražava se u kvadratnim pikselima. Površina tela se opisuje i računa u kvadratnim mikrometrima na skali koja povezuje dužinu stranice piksela i adekvatnu prostornu dužinu u mikrometrima.

2. *Površina neuronskog polja* (engl. *Surface Area of the Neuron Field* odnosno engl. A_{nf})

Ukupan broj piksela binarne slike neuronskog polja. Neuronsko polje se dobija spajanjem krajeva dendrita od početnog izabranog, pravim linijama redom u smeru kazaljke na satu do početne tačke. Površina neuronskog polja se izražava u kvadratnim mikrometrima na skali koja povezuje dužinu stranice piksela i adekvatnu dužinu u mikrometrima. Ovaj parametar nije korišćen u daljem računu

⁴U nastavku pri definiciji, parametri upotrebljeni za opis slika neurona i astrocita sa dodatim asterisk simbolom (*) su monofraktalni parametri.

⁵Kako dendriti predstavljaju nastavke koji se prostiru iz some neurona kao izuzetno tanki nastavci koji služe za prikupljanje (prostorno-vremensku sumaciju) i prenos signala, njihova površina na slikama se može zanemariti kada se opisuje površina tela, mada precizna razlika između površine tela i površine some postoji (soma odgovara metaboličkom centru neurona gde je smešteno jedro i ostale organele).

kako se pokazalo da sama površina soma može da maskira razgranatost neurona koja ima značajniji informativni karakter, pa se ispostavlja da je površina receptivnog polja bolji izbor.

3. *Površina receptivnog polja neurona* (engl. *Surface Area of the Neuron Receptive Field* odnosno engl. A_{rf})

Predstavlja ukupan broj piksela binarne slike koja nastaje kada se od površine neuronskog polja oduzme površina tela. Površina receptivnog polja se izražava u mikrometrima kao skala na kojoj je određena dužina stranice piksela za odgovarajuću dužinu u mikrometrima.

4. *Površinska gustina receptivnog polja neurona* (engl. *Surface Density of the Neuron Receptive Field* odnosno engl. ρ_{rf})

Kreirana je kao količnik površine tela i površine neuronskog polja. Reprezentuje je realni broj između 0 i 1, a najveća vrednost ($\rho_{rf} = 1$) dobija se kada su površine tela i neuronskog polja jednake.

5. *Fraktalna dimenzija binarne slike tela* (engl. *Binary Fractal Dimension of Soma Surface* odnosno engl. $(D_{bin})_s$)

Izračunava se traženjem fraktalne dimenzije binarne slike tela neurona. Predstavlja broj između 1 i 2. Najmanja vrednost $(D_{bin})_s = 1$ je fraktalna dimenzija prave linije, a najveća vrednost $(D_{bin})_s = 2$ je fraktalna dimenzija kvadrata opisanog oko neuronskog tela. *

6. *Fraktalna dimenzija binarne slike neuronskog polja* (engl. *Binary Fractal Dimension of Neuron Field* odnosno engl. $(D_{bin})_{nf}$)

Dobija se izračunavanjem fraktalne dimenzije binarne slike neuronskog polja. Predstavlja broj između 1 i 2. Najmanja vrednost $(D_{bin})_s = 1$ je fraktalna dimenzija prave linije, a najveća vrednost $(D_{bin})_s = 2$ je fraktalna dimenzija kvadrata opisanog oko neuronskog polja. *

7. *Lakunarnost tela neurona* (*Neuron Soma Lacunarity* odnosno engl. Λ_s)

Određuje nehomogenost binarne slike tela pri njegovoj istovremenoj i translaciji i rotaciji. Vrednost parametra zavisi od oblika tela. Lakunarnost tela bliska 0 znači da je telo homogeno, odnosno blisko krugu ili elipsi, a veće vrednosti znače da telo odstupa od homogenosti (ima šupljina) u odnosu na krug ili elipsu. Odbačen, kako se pokazao neinformativnim. *

8. *Lakunarnost neuronskog polja* (*Neuron Dendrite Field Lacunarity* odnosno engl. Λ_{nf})

Takođe određuje nehomogenost binarne slike neuronskog polja (dendritske krošnje) pri njegovoj istovremenoj i translaciji i rotaciji. Vrednost parametra zavisi od oblika neuronskog polja. Lakunarnost neuronskog polja bliska 0 znači da je telo više homogeno, odnosno blisko krugu, elipsi ili zatvorenom poligonu, a veće vrednosti znače da je neuronsko polje značajnije nehomogeno (ima šupljina) u odnosu na adekvatnu geometrijsku sliku. Takođe odbačen, kako se pokazao neinformativnim. *

5.1.2 Oblik neurona

Slično za grupu Oblik neurona uvodimo 7 parametara sa imenima i adekvatnim definicijama:

1. Obim tela (engl. *Perimeter of the Neuron Soma* odnosno engl. P_s)

Ukupan broj piksela granice tela na slici debljine jedan piksel. Izražava se u pikselima. Obim tela neurona se izražava u mikrometrima za datu skalu dužine stranice piksela koja odgovara dužini u mikrometrima. Isključen, kao nedovoljno informativan.

2. Obim neuronskog polja (engl. *Perimeter of the Neuron Receptive Field* odnosno engl. P_{nf})

Ukupan broj piksela granice neuronskog polja na slici sa debljinom jedan piksel. Izražava se u pikselima. Obim neuronskog polja neurona izražava se u mikrometrima za datu skalu određenu dužinom stranice piksela i odgovarajućom dužinom u mikrometrima.

3. Nepravilnost receptivnog polja (engl. *Roundness of Receptive field* odnosno engl. R_{rf})

Kvantifikuje nepravilnost granične slike receptivnog polja gde je debljina granice 1 piksel. Predstavlja broj između 0 i 1, a maksimalna vrednost 1 se uzima kada je obim tela jednak obimu neuronskog polja.

4. Cirkularnost some neurona, odnosno tela neurona (engl. *Circularity of Neuron Soma* odnosno engl. M_s)

Odnos površine tela i kvadrata obima tela. Predstavlja broj između 0 i 1 i pokazuje odstupanje parametra od njegove vrednosti za krug, čija je vrednost 1. Odstranjen kao nedovoljno informativan.

5. Cirkularnost neuronskog polja (engl. *Circularity of Neural Field* odnosno engl. M_{nf})

Odnos površine tela i kvadrata obima neuronskog polja. Čini ga broj između 0 i 1 i pokazuje odstupanje parametra od njegove vrednosti za krug, čija je vrednost cirkularnosti 1.

6. Fraktalna dimenzija granice tela (engl. *Binary Fractal Shape of Neuron Field* odnosno engl. $(D_{out})_{nf}$)

Predstavlja vrednost koju dobijamo izračunavanjem fraktalne dimenzije granične slike tela koja se lako upoređuje fraktalnim dimenzijama granice geometrijskih slika. Takođe isključen, kako neuronsko polje ima značajniju ulogu. *

7. Fraktalna dimenzija granice neuronskog polja (engl. *Binary Fractal Shape of Neuron Field* odnosno engl. $(D_{out})_{nf}$)

Daje vrednost koju dobijamo izračunavanjem fraktalne dimenzije granične slike neuronskog polja koja se opet trivijalno upoređuje sa vrednostima fraktalne dimenzije granice geometrijskih slika. *

5.1.3 Dužina neurona i kompleksnost neurona

Na kraju nalazimo parametre Dendritske krošnje, ukupno njih 8. Razdvojeno nazvani, Dužina neurona (prva 4) i Kompleksnost neurona (druga 4).

1. Ukupna dužina dendrita (engl. Total Length of Neuron Dendrites odnosno engl. L_n)

Ukupan broj piksela skeletonizovane slike neurona, tj. i dendrita i tela. Skeletonizovana slika je slika neurona prikazana sistemom krivih linija debljine 1 piksel. Dužina neurona se izražava u mikrometrima za datu skalu koja određuje dužinu stranice piksela i odgovarajuću dužinu u mikrometrima.

2. Rastojanje maksimalnog broja preseka dendrita (engl. Maximal Intersections Position odnosno engl. R_m)

Dužina prečnika kruga konstruisanog u geometrijskom centru tela čija kružnica preseca najveći broj dendrita. Izražava se u mikrometrima izabranom skalom koja određuje dužinu stranice piksela i odgovarajuću dužinu u mikrometrima od prečnika kruga koji preseca maksimalan broj dendrita.

3. Maksimalan broj račvanja dendrita (engl. Maximum Number of Dendritic Branching odnosno engl. R_b)

Broj kumulativnih račvanja dendrita izračunat primenom sigmoidne funkcije i konsekventnom analizom.

4. Maksimalan broj terminacija dendrita (engl. Maximum Number of Dendritic Terminations odnosno engl. R_t)

Broj kumulativnih terminacija dendrita izračunat primenom takođe sigmoidne funkcije i konsekventnom analizom.

5. Maksimalan broj preseka dendrita (engl. Maximal Number of Intersections Between Dendrites and Circle odnosno engl. N_m)

Najveći broj preseka dendrita sa krugom konstruisanim u geometrijskom centru tela. Indirektno kvantifikuje gustinu dendritske krošnje neurona.

6. Broj tačaka račvanja (engl. Number of Branching Points odnosno engl. CN_b)

Novi parametar, izračunat brojanjem tačaka račvanja za datu sliku, potencijalno može da pokaže dobar rezultat.

7. Fraktalna dimenzija skeletonizovane slike dendrita (engl. Complexity of the Dendritic Tree odnosno engl. $(D_{skel})_d$)

Dobija se izračunavanjem fraktalne dimenzije skeletonizovane slike neurona bez tela. Vrednost fraktalne dimenzije skeletonizovane slike neurona iz tela istovremeno kvantifikuje krivudavost dendrita i njegovu složenost. *

8. *Homogenost neurona* (engl. *Neuron Homogeneity* odnosno engl. Λ_n)

Takođe novi parametar notiran kao Λ_n u daljem tekstu, opisuje homogenost date slike neurona.

Parametri sa dodatim asterisk simbolom (*) su monofraktalni parametri. Ukupno postoji 21 parametar od kojih su svojeručno isfiltrirani njih 17 koji će se u nastavku koristiti za analizu slika neurona GMJ-a produžene moždine.

O razlici pri upotrebi biplot dijagrama:

- Radi kompletne specifikacije, napominjemo da parametri koje vidimo na biplot dijagramima nose nešto drugačija imena, ali isti kontekst i bitni su za kategorizaciju. Ovde izjednačavamo isključivo parametre koji se uočljivo razlikuju, dok razlika kod ostalih je trivijalna i lako se uočava.
- U grupi Veličina, rrf predstavlja parametar koji se nije uspeo konvertovati iz parametra ρ_{rf} (engl. *Surface Density of the Neuron Receptive Field*) koji govori o površinskoj gustini neuronskog receptivnog polja u biplot dijagramima, zbog programske nepodrživosti simbola grčkog alfabeta. Na sličan način parametar Λ_n (engl. *Neuron Homogeneity*) predstavlja takođe novi parametar Λ_n u daljem tekstu i van biplot dijagrama i R software-om procesiranog dela, koji opisuje homogenost slike neurona.

5.2 Nomenklatura korišćenih parametara pri opisu astrocita

Na ovom mestu u nastavku, predstavimo parametre za analzu slike astrocita. Parametri koji su korišćeni, kao u prethodnom slučaju, smatramo da su dvodimenzionalne projekcije slika astrocita za koje se medicinski tim lekara specijalista anatomije opredelio da verodostojno opisuju uočenu glijalnu ćeliju pri obradi tkiva produžene moždine. Takođe, zbog aktuelne korišćene notacije, oni se radi programske prilagodljivosti u različitim koracima i konverzije moraju notirati pod nešto drugačijim imenom, koju ćemo sada izjednačiti.

Parametri dvodimenzionalne projekcije astrocita su ili geometrijski (10) ili fraktalni (8) i mogu se početno podeliti na četiri funkcionalno (i morfološki) različite grupe. U prvu grupu spadaju parametri koji su u bliskoj vezi sa veličinom astrocita, u drugoj grupi nalaze se parametri koji služe za opis oblika astrocita, u treću grupu spadaju parametri korišćeni za opis kompleksnosti nastavaka astrocita i u četvrtoj se nalaze parametri koji učestvuju u opisu homogenosti nastavaka astrocita.

5.2.1 Veličina astrocita

U grupi Veličina astrocita imamo 6 parametara od kojih su 3 euklidska i 3 fraktalna. Originalni nazivi na srpskom su ispod (dok su u zagradi nazivi na engleskom (i notacija) korišćeni u našim istraživanjima i publikacijama [12, 13]) . U tezi je takođe korišćena i engleska notacija.

1. *Površina tela astrocita* (engl. *Surface Area of the Astrocyte Soma* odnosno engl. A_s , koju ovaj put navodimo u kontekstu opisa površine some astrocita)

Čini ukupan broj piksela binarne (crno-bele) slike tela astrocita i izražava se u kvadratnim pikselima. Prikazuje se u kvadratnim mikrometrima na skali koja odgovara dužini stranice piksela i adekvatnoj dužini u mikrometrima.

2. *Površina ukupnog glijalnog polja* (engl. *Surface Area of the Glial Field* odnosno engl. A_{gf})

Ukupan broj piksela binarne slike glijalnog polja. Glijalno polje se dobija spajanjem krajeva nastavaka od početnog izabranog pravim linijama, redom u smeru kazaljke na satu, do početne tačke. Izražava u kvadratnim mikrometrima na datoj skali koja odgovara dužini stranice jednog piksela i odgovarajućoj dužini u mikrometrima.

3. *Površina receptivnog polja astrocita* (engl. *Surface Area of the Glial Receptive Field* odnosno engl. A_{rf})

Predstavlja ukupan broj piksela binarne slike koja nastaje kada se od površine glijalnog polja oduzme površina tela. Izražava u kvadratnim mikrometrima na skali koja određuje dužinu stranice piksela za odgovarajuću dužinu u mikrometrima.

4. *Fraktalna dimenzija slike some astrocita* (engl. *Fractal Dimension of the Astrocyte Soma Surface* odnosno engl. $((D_{bin})_s)$)

Izračunava se traženjem fraktalne dimenzije binarne slike tela astrocita. Najmanja vrednost $((D_{bin})_s = 1)$ je fraktalna dimenzija prave linije, a najveća vrednost $((D_{bin})_s = 2)$ je fraktalna dimenzija kvadrata opisanog oko tela astrocita. *

5. *Fraktalna dimenzija glijalne ćelije tj. astrocita* (engl. *Fractal Dimension of the Astrocyte Surface* odnosno engl. $((D_{bin})_g)$)

Ukupna fraktalna dimenzija binarne slike astrocita. Analogno metričke osobine važe kao u prethodnom slučaju. *

6. *Fraktalna dimenzija glijalnog polja astrocita* (engl. *Fractal Dimension of the Astrocyte Glial Field* odnosno engl. $((D_{bin})_{gf})$)

Fraktalna dimenzija binarne slike glijalnog polja astrocita. Analogno metričke osobine stoje kao u prethodnom slučaju. *

5.2.2 Oblik astrocita

Slično za grupu Oblik astrocita uvodimo 5 parametara sa imenima i adekvatnim definicijama:

1. *Obim glijalnog polja astrocita* (engl. *Perimeter of the Astrocyte Glial Field* odnosno engl. P_{gf})

Ovaj obim se izražava se u pikselima i poseduje debljinu jedan piksel. Izražava se u mikrometrima za datu skalnu određenu dužinom stranice piksela i odgovarajućom dužinom u mikrometrima.

2. *Cirkularnost tela astrocita* (engl. *Circularity of the Astrocyte Soma* odnosno engl. M_{gf})

Odnos površine tela i kvadrata obima tela. Predstavlja broj između 0 i 1 i pokazuje odstupanje parametra od njegove vrednosti za krug, čija je vrednost 1.

3. *Nepravilnost receptivnog glijalnog polja* (engl. *Roundness of Astrocyte Receptive Glial Field* odnosno R_{gf})

Kvantifikuje nepravilnost granične slike receptivnog polja astrocita gde je debljina granice 1 piksel. Predstavlja broj između 0 i 1 a maksimalna vrednost 1 se smatra kada je obim tela jednak obimu glijalnog polja. Na samom startu u analizi primećeno da nije dovoljno informativan.

4. *Proporcija glijalnog polja astrocita* (engl. *Glial Field Aspect Ratio* odnosno A_{rgf})

Količnik maksimalnog i minimalnog prečnika poligona koji formira slika astrocita sa svojim nastavcima. Posle prvih pokazatelja nedeskriptivnosti, uklonjen.

5. *Čvrstina glijalne ćelije* (engl. *Solidity of Astrocyte* odnosno engl. S_{gf})

Predstavlja količnik između konstruisane površine objekta na slici uočenog astrocita i pridružene konveksne površine istog objekta. Nije dao rezultate, kako je naznačeno ispod.

6. *Fraktalna dimenzija granice glijalnog polja* (*Binary Fractal Dimension of Glial Field Outline* odnosno engl. $(D_{out})_{gf}$)

Fraktalna dimenzija glijalnog polja astrocita koju opisuje kao i ranije granična linija od jednog piksela. Kao i ranije minimalno odstupanje od $(D_{out})_{gf}$. *

5.2.3 Kompleksnost

U trećoj grupi susrećemo se sa parametrima iz domena grupe Kompleksnost, dva euklidska parametra i jednim fraktalnim:

1. *Broj preseka nastavaka sa opisanom kružnicom* (engl. *Maximal Number of Intersections Between Extensions and The Attributed Referent Circle* odnosno engl. N)

Broj preseka nastavaka sa krugom konstruisanom u geometriskom centru tela. Indirektno kvantifikuje gustinu nastavaka astrocita. Izražava se u mikrometrima sa izabranom skalom koja određuje

dužinu stranice piksela i odgovarajuće rastojanje u mikrometrima maksimalnog broja preseka nastavaka.

2. *Maksimalan broj preseka nastavaka sa opisanom kružnicom* (engl. *Maximal Number of Intersections Between Extensions and The Attributed Referent Circle* odnosno engl. N_m)

Najveći broj preseka nastavaka sa krugom konstruisanom u geometriskom centru tela. Indirektno kvantifikuje gustinu nastavaka astrocita. Izražava se u mikrometrima sa izabranom skalom koja određuje dužinu stranice piksela i odgovarajuće rastojanje u mikrometrima maksimalnog broja preseka nastavaka.

3. *Fraktalna dimenzija skeletonizovane slike astrocita* (engl. *Fractal Dimension of the Skeletonized Fractal Image of the Astrocyte* odnosno engl. $(D_{skel})_g$)

Dobija se izračunavanjem fraktalne dimenzije skeletonizovane slike astrocita bez tela. Vrednost fraktalne dimenzije skeletonizovane slike glijalne ćelije bez tela istovremeno kvantifikuje krivudavost nastavaka i njegovu složenost. *

5.2.4 Homogenost

Na kraju u poslednjoj grupi vidimo parametre koje koristimo kako bi opisali homogenost astrocita:

1. *Lakunarnost some astrocita* (engl. *Lacunarity of the Soma of Astrocyte* odnosno engl. L_{gs})

Lakunarnost some proizvoljnog astrocita opisuje njenu razgranatost. Uvek je u domenu od 0 do 1, gde slike astrocita sa najzbijenijim somama imaju niske vrednosti, dok najrazvučenije poseduju vrednosti blizu 1. *

2. *Lakunarnost glije* (engl. *Lacunarity of the Glial Cell* odnosno engl. L_g)

Lakunarnost proizvoljne glijalne ćelije, odnosno celokupnog astrocita, opisuje razgranatost glijalnih nastavaka i njene some. Uvek je u domenu od 0 do 1, gde najzbijenija glija sa nastavcima ima niske vrednosti, a najrazvučenije poseduju vrednosti blizu 1. *

3. *Lakunarnost glijalnih nastavaka* (engl. *Lacunarity of the Glial Field* odnosno engl. L_{gf})

Lakunarnost nastavaka izabrane glijalne ćelije, odnosno astrocita, opisuje razgranatost njihovih nastavaka. Uvek je u domenu od 0 do 1, gde najzbijenija ima niske vrednosti, a najrazvučenija poseduje vrednosti blizu 1. *

Ponovo, parametri sa dodatim asterisk simbolom (*) su monofraktalni parametri. Ukupno ovde postoji u sklopu opisa slike astrocita 18 parametara (10 geometrijskih i 8 fraktalnih) od kojih su svojeručno isfiltrirani njih 15 (7 euklidskih i 8 fraktalnih) koji će se u nastavku koristiti za analizu slika astrocita maslinastog jedra produžene moždine.

Sa druge strane, parametri koje vidimo na biplot dijagramima, a povlače izmenjena imena, koja su izdvojena za kategorizaciju i pripadaju grupi Veličina tela su prikazani sufiksom *pix2*, koji govori o jedinici koja je pridružena parametru, kvadratni piksel. Oznake *g* i *gf* odgovaraju atributima glijalno i glijalno polje (engl. *glial field*). U drugoj grupi vezanom za oblik astrocita uočavamo iste, već definisane sufikse. Kod Kompleksnosti ponovo srećemo *g* za atribut parametra glijalna fraktalna slika i na kraju kod Homogenosti parametri su definisani na isti način.

Sada možemo u narednim poglavljima obraditi samu proceduru i sve suptilne aspekte analize koje dovode do ubedljive obrade slika sa predstavljenim skupom parametara.

6 Primena tehnika u opisu slika neurona i astrocita

6.1 Evaluacija slika neurona

Prvi susret efektivno u obradi kvantitativnih podataka sa prikupljenih slika neurona, izložen je u potpoglavlju 6.1 kroz merene parametre u različitom mernom formatu, kako se suočavamo i sa euklidskim i sa fraktalnim parametrima.

U sledećoj tabeli je predstavljena sprovedena AGK za neurone GMJ-a, podeljene po morfološki različitim grupama i sa izabranim parametrima koje ćemo razmatrati kroz celo poglavlje 6.1. Parametri koji opisuju morfologiju neurona i astrocita na slikama imaju nekih dodirnih tačaka kao i same grupe, ali se i razlikuju zbog druge kvantitativne perspektive prema tipu ćelije i očekivanog rezultata.

Pored glavnih komponenti (u nastavku skraćeno: gl. komp.) u novom referentnom sistemu za svaku grupu, data je standardna devijacija glavne komponente (SD) dalje, proporcija varijanse (PV) i kumulativna proporcija (KP) i ispod odgovarajući dijagrami prevoja u dubletu sa biplot dijagramima za datu grupu. Detaljnije o navedenim i primenjenoj proceduri u istom programskom okruženju nalazi se u knjizi [45]. Potpuno je jasno da se sa ovakvim opisom iz tabele 6.1, relevantna informacija (praćenje po SD, PV ili KP) ponavlja, ali radi približavanja nekim kategorijama koje koriste drugi set veličina za opis u statistici, sve vrednosti su ovde istaknute.

Tabela 6.1: Tabela standardne devijacije, proporcije varijansi i kumulativne proporcije po glavnim komponentama unutar posmatrane grupe kroz sve četiri grupe tj. kategorije.

posmatrane morfološke osobine tj. grupe	gl. komp.	SD	PV	KP
Veličina ($A_s, A_{rf}, \rho_{rf}, (D_{bin})_s, (D_{bin})_{nf}$)	1	1.40	0.39	0.39
	2	1.25	0.31	0.70
	3	0.89	0.16	0.86
	4	0.77	0.12	0.98
	5	0.31	0.02	1.00
Oblik ($P_{nf}, M_{nf}, R_{rf}, (D_{out})_{nf}$)	1	1.37	0.47	0.47
	2	1.03	0.27	0.73
	3	0.87	0.19	0.92
	4	0.57	0.08	1.00
Dužina (L_n, R_m, R_b, R_t)	1	1.49	0.56	0.56
	2	0.87	0.19	0.75
	3	0.81	0.16	0.91
	4	0.61	0.09	1.00
Kompleksnost ($N_m, CN_b, (D_{skel})_d, \Lambda_n$)	1	1.47	0.54	0.54
	2	1.00	0.25	0.79
	3	0.72	0.13	0.92
	4	0.56	0.08	1.00

Kako je u prethodnom poglavlju bilo definisano (poglavlje 5) A_s je površina tela neurona, A_{rf} površina receptivnog polja neurona, ρ_{rf} je površinska gustina receptivnog polja neurona i fraktalni parametri $(D_{bin})_s$ i $(D_{bin})_{nf}$, fraktalna dimenzija binarne slike tela i fraktalna dimenzija binarne slike neuronskog polja, redom. Dalje, P_{nf} je obim ili perimetar neuronskog polja, M_{nf} cirkularnost neuronskog polja, R_{rf} nepravilnost receptivnog polja, a $(D_{out})_{nf}$ fraktalna dimenzija granice tela neurona. L_n je ukupna dužina dendrita, R_m rastojanje maksimalnog broja preseka dendrita, R_b maksimalan broj račvanja dendrita i R_t maksimalan broj terminacija dendrita. U poslednjoj kategoriji N_m predstavlja maksimalan broj preseka dendrita, CN_b broj tačaka račvanja, $(D_{skel})_d$ fraktalnu dimenziju skeletonizovane slike dendrita i na kraju Λ_n parametar koji opisuje homogenost neurona.

Poredeći vrednosti iz iznad date tabele 6.1 dobijene u opisu slika neurona i relevantne zaključke iz narednih dijagrama, mogu se zaključiti sledeće činjenice, iznete u nastavku u smislu grupa. Sve ovo upotpunjuju i zaključci predstavljeni od tabele 6.2 do tabele 6.5, koje bi uvek trebalo da prate AGK i pomoću kojih se verifikuje sve prethodno izloženo.

Sprovedenjem AGK dobiće se generalno gradacija po varijaciji (ili varijansi) u novom referentnom sistemu i zapravo videće se koliku tendenciju za promenom ima neki parametar iz novog koordinatnog sistema u kom je gradacija izvršena. Za sve parametre u proizvoljno izabranoj grupi, praćenjem dijagrama prevoja videće se u novom, rotiranom za neki ugao, koordinatnom sistemu da gradacija postoji i da se može pronaći referentni sistem u kome su odstupanja od srednje vrednosti te veličine (varijansa po definiciji) opisana opadajućim trendom. U novom takvom referentnom sistemu zovemo ih redom, prva glavna komponenta, druga glavna komponenta, treća glavna komponenta itd. Analiziranjem standardizovanog biplot dijagrama primećuje se da je raspored parametara u datoj grupi, prvo, korelisan u odnosu na tačke dobijene merenjem svih parametara u prostoru parametara za odgovarajuću grupu za sve slike u uzorku od 259 slika neurona GMJ-a i dalje, zapaža se odnos između prve dve glavne komponente tj. koliko svaka od njih odstupa od srednje vrednosti tog parametra u novom referentnom sistemu. Ako se parametar nalazi u (matematički) prvom kvadrantu (pozitivne vrednosti promene) znači da se direktno proporcionalna promena događa i po prvoj glavnoj komponenti i po drugoj glavnoj komponenti, u zavisnosti od ugla od kog zavisi odnos dve glavne komponente. Tako se vidi da li više (ili manje) po prvoj ili manje (tj. više) po drugoj varira u zavisnosti od posmatranog parametra i njegove projekcije na prve dve glavne komponente. Ako se nalazi u drugom kvadrantu (podsećamo numeracija ovde ide u obrnutom smeru kazaljke na satu) postoji samo pozitivan trend varijacije po drugoj glavnoj komponenti, dok po istoj prvoj glavnoj komponenti iz ovog referentnog sistema se beleži negativna varijacija. Ovo isključivo treba posmatrati u odnosu na neki drugi parametar, jer ako intenzitet (dužina strelice) nije značajan, smatra se da parametar nije dovoljno informativan. U trećem kvadrantu je situacija sa particijom prostora za obe glavne komponente takva da se ponašaju sa negativnim varijacijama. Ovo je naznaka za dijametralno drugačiju varijaciju po tom parametru iz ovog ugla posmatranja sa prve dve glavne komponente. Ako neki takav parametar postoji, treba ispitati da li je u adekvatnoj grupi i treba gledati finalnu prirodu skupa izabranih parametara. Na kraju, ako određeni parametar trpi veliki intenzitet (projekciju) po prvoj glavnoj komponenti i malu negativnu varijaciju (tj. negativnu projekciju) po drugoj glavnoj komponenti, možda ga treba razmotriti pri konačnom izboru. Sa dodatim suplementarnim tabelama koje odgovaraju svakoj grupi videće se kompletno stanje u odnosu na sve parametre i njihov uticaj na sve glavne komponente

u novom koordinatnom sistemu.

U nastavku, posle dijagrama prevoja i biplot dijagrama, za ukupnu preciznu sliku, predstaviće se i razmotriti suplementarne tabele koje kvalitetno ilustruju vrednosti originalnih komponenti i gl. komp. u novom bazisu. U narednim pasusima, nakon toga, elaboriraće se zapaženi zaključci iz prethodnog materijala.

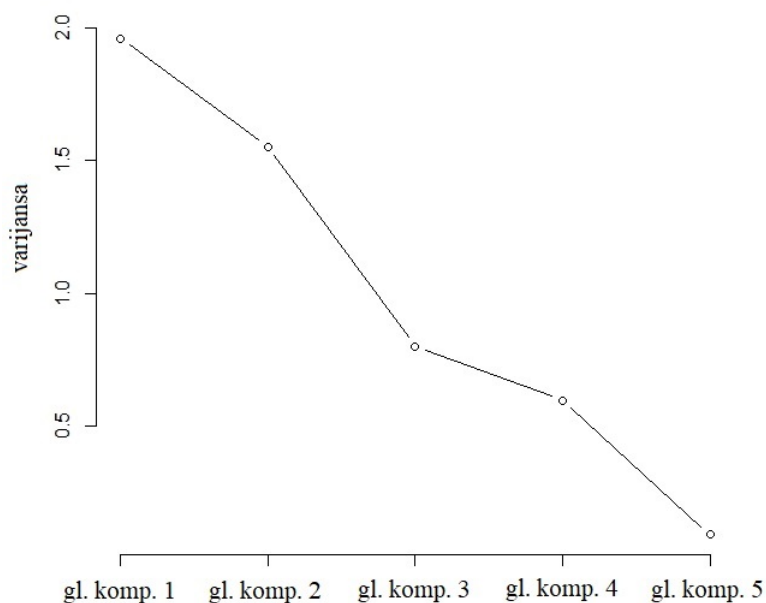
Prema prethodno opisanom konstatujemo da u grupi Veličina informativni parametri su prve dve komponente (slika 6.1) i treba uzeti u obzir A_s i A_{rf} (slika 6.2) zbog intenziteta. Kako je A_s povoljniji po svim inicijalnim komponentama u novom koordinatnom sistemu, što se vidi iz suplementarne tabele 6.2, a i površina some je deskriptivniji parametar, biramo A_s kao najreprezentativniji parametar iz prve grupe.

Kod grupe Oblik neurona, nalazimo (slika 6.3) da treba razmatrati u novom bazisu samo prve dve glavne komponente. Ako uzmemo u obzir da je R_{rf} veštački konstruisan parametar i $X_{Dout.nf}$ skoro da nema varijacije po prvoj glavnoj komponenti, jasno je da je najdeskriptivniji opis (slika 6.4) sa parametrom P_{nf} . Ovo potvrđuje i suplementarna tabela 6.3.

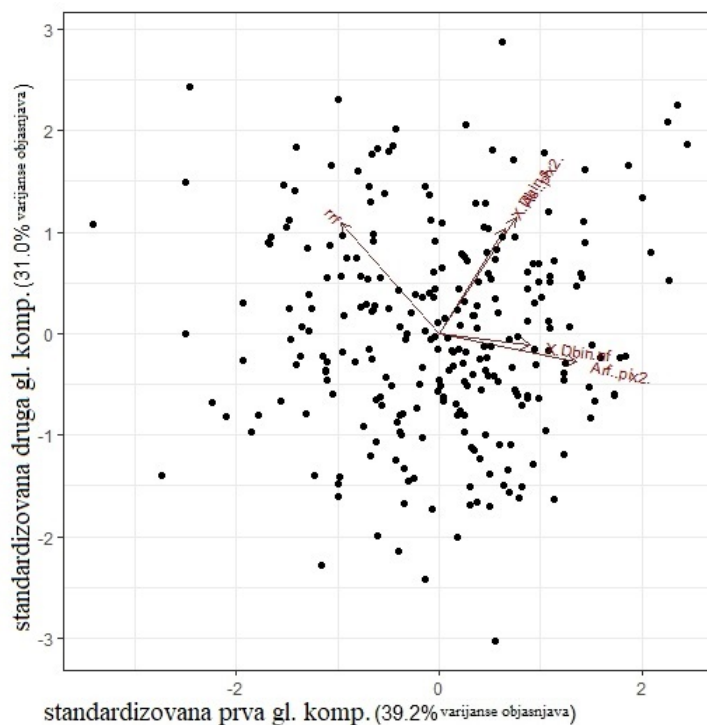
U grupi Dužina, sa biplot dijagrama, jednoznačno vidimo da bi svi parametri mogli da dođu u obzir (slika 6.6). Međutim, dijagram prevoja (slika 6.5) objašnjava da najveći doprinos dolazi od prve dve glavne komponente. Sada je potpuno jasno da treba izabrati R_m kako poseduje najveći intenzitet po prvoj glavnoj komponenti, tabela 6.4, a i ovaj parametar govori o maksimalnom broju preseka dendrita tj. opisuje mesto redistribucije.

Kod grupe Kompleksnost relevantne su prve dve glavne komponente (slika 6.7) a parametri koje treba uzeti u obzir su N_m i $X_{Dskel.d}$ po značajnim projekcijama na prvu glavnu komponentu, ali i značajnim doprinsima (slika 6.8) po ostalim glavnim komponentama prema tabeli 6.5. Biramo N_m , ali kao alternativu čuvamo $X_{Dskel.d}$ fraktalni parametar za analizu sa te slike.

U grupi Veličina neurona srećemo se sa dijagramom prevoja datog oblika (slika 6.1) i biplot-om (slika 6.2) iz iste grupe.

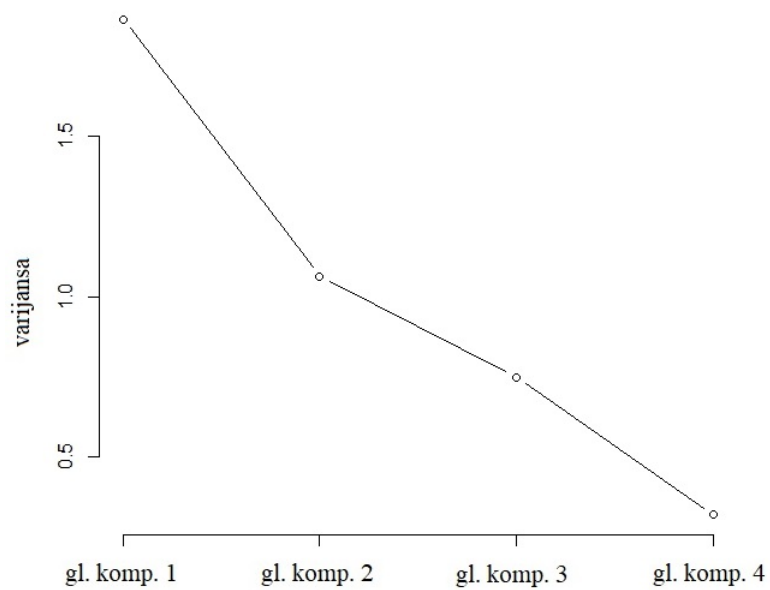


Slika 6.1: Dijagram prevoja grupe Veličina

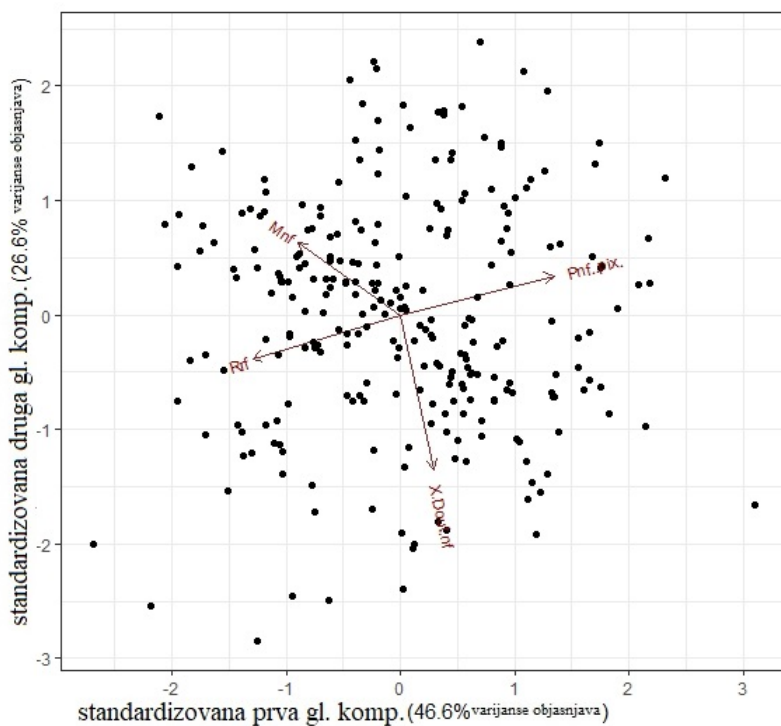


Slika 6.2: Biplot dijagram grupe Veličina

Naredno, posmatramo (slika 6.3 i slika 6.4) iste posledice AGK za grupu Oblik neurona.

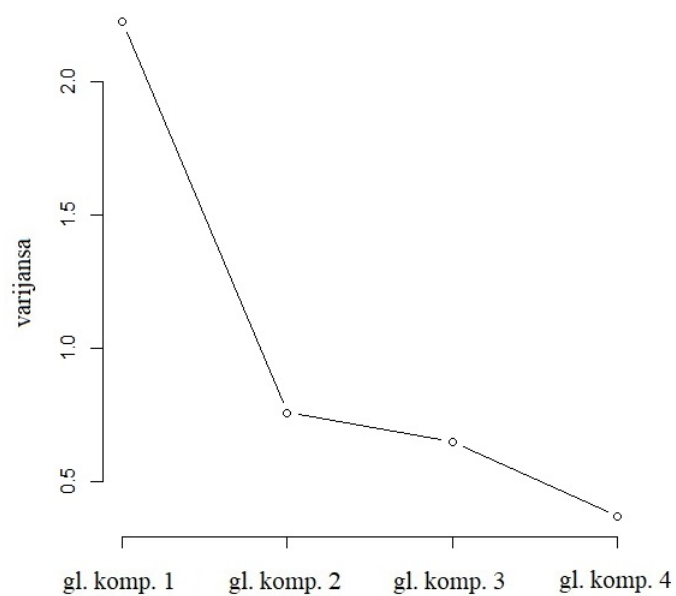


Slika 6.3: Dijagram prevoja grupe Oblik

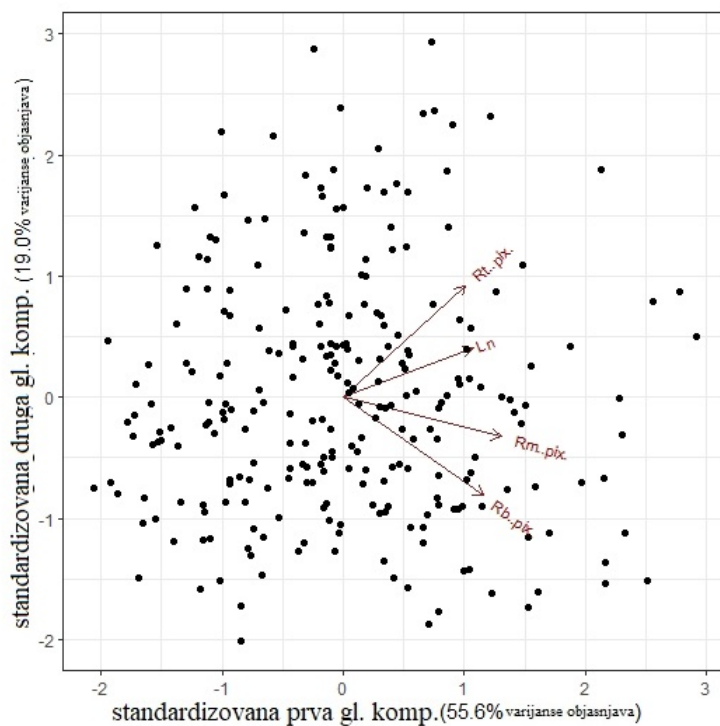


Slika 6.4: Biplot dijagram grupe Oblik

Dalje, razmatramo parametre koji opisuju dužinu (slika 6.5 i slika 6.6) pomoću datih dijagrama.

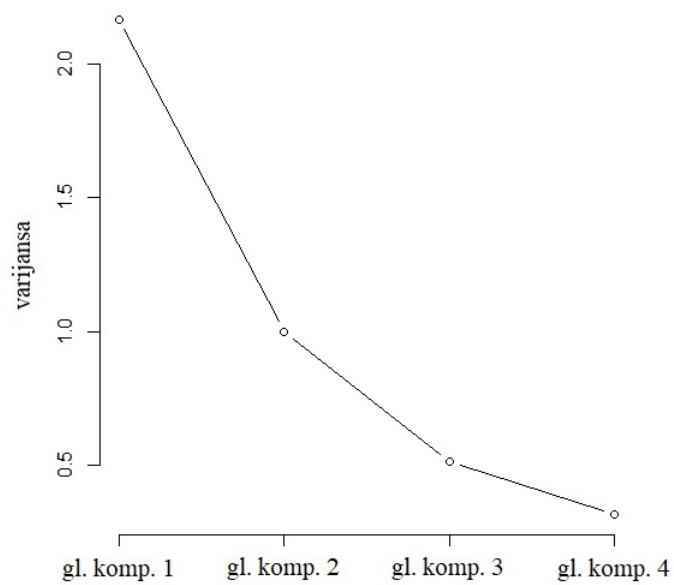


Slika 6.5: Dijagram prevoja grupe Dužina

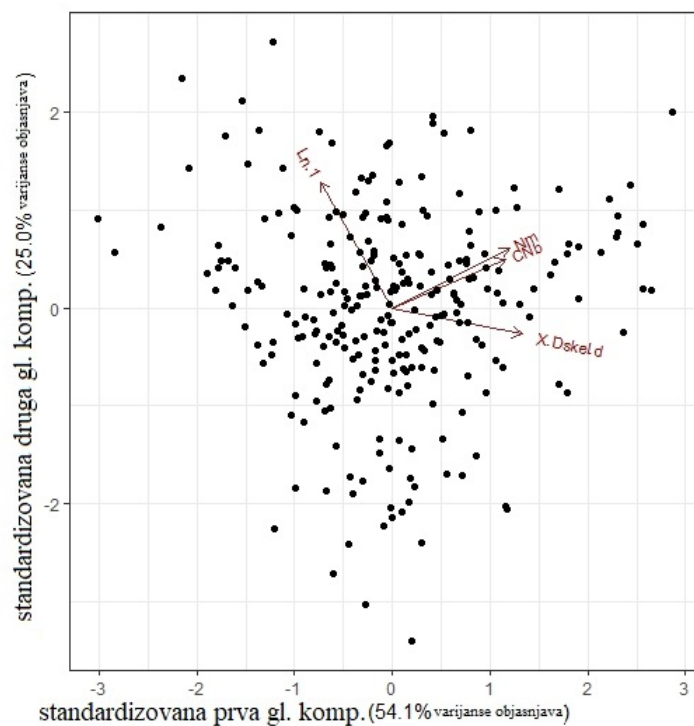


Slika 6.6: Biplot dijagram grupe Dužina

I konačno za grupu Kompleksnost (slika 6.7 i slika 6.8) koristićemo dijagrame na sledećoj strani.



Slika 6.7: Dijagram prevoja grupe Kompleksnost



Slika 6.8: Biplot dijagram grupe Kompleksnost

U tabelama ispod, u kolonama su date vrednosti parametara koje se kreću od -1 do 1 i pokazuju koliko ta varijabla utiče na gl. komp. dok znak govori o direktnoj ili inverznoj proporcionalnosti. Veličina, tabela 6.2.

Tabela 6.2: Tabela relacija inicijalnih parametara sa glavnim komponentama u grupi Veličina

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4	gl. komp. 5
As..pix2.	0.353	0.599	0.171	0.509	0.478
Arf..pix2.	0.633	-0.149	0.393	0.188	-0.623
rrf	-0.452	0.569	-0.156	0.271	-0.612
X.Dbin.s	0.304	0.541	0	-0.781	0
X.Dbin.nf	0.422	0	-0.890	0.145	0

Oblik, tabela 6.3.

Tabela 6.3: Tabela relacija inicijalnih parametara sa glavnim komponentama u grupi Oblik

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
Pnf..pix.	0.642	0.217	0.128	0.724
Mnf	-0.430	0.401	0.800	0.120
X.Dout.nf	0.140	-0.855	0.497	0
Rrf	-0.619	-0.246	-0.311	0.678

Dužina, tabela 6.4.

Tabela 6.4: Tabela relacija inicijalnih parametara sa glavnim komponentama u grupi Dužina

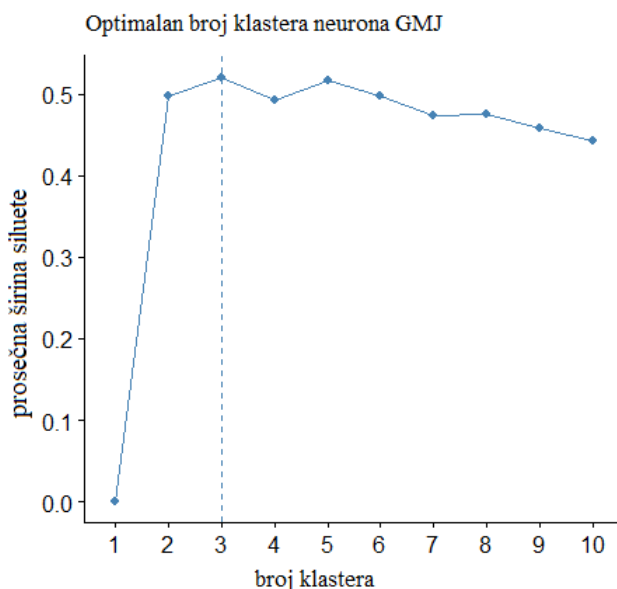
	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
Ln	0.469	0.307	0.815	0.148
Rm..pix.	0.571	-0.245	0	-0.778
Rb..pix.	0.508	-0.608	-0.170	0.586
Rt..pix.	0.442	0.690	-0.546	0.175

Kompleksnost, tabela 6.5.

Tabela 6.5: Tabela relacija inicijalnih parametara sa glavnim komponentama u grupi Kompleksnost

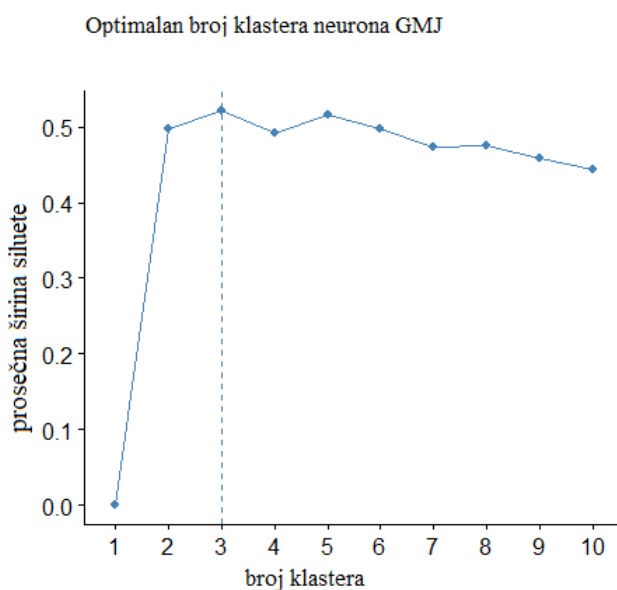
	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
Nm	0.532	0.398	0.506	0.550
CNb	0.513	0.321	-0.796	0
X.Dskel.d	0.590	-0.174	0.306	-0.727
Ln.1	-0.326	0.842	0.128	-0.411

Na ovom mestu, pre klasterizacije ćemo predstaviti mogući broj klastera dobijen metodom siluete (slika 6.9) kako smo ranije (potpoglavlje 4.2) istakli da je to najpouzdaniji metod.



Slika 6.9: Mogući i optimalni broj klastera sa parametrima A_s , P_{nf} , R_m i N_m

Takođe, sada ćemo predstaviti alternativno rešenje (slika 6.10) koje se pokazalo blisko dobrim, sa izmenjenim jednim finalnim parametrom.



Slika 6.10: Mogući i optimalni broj klastera sa parametrima A_s , P_{nf} , R_m i $(D_{skel})_d$

Evidentno je da su ove krive jednake i da u oba slučaja odgovarajući broj klastera je 3.

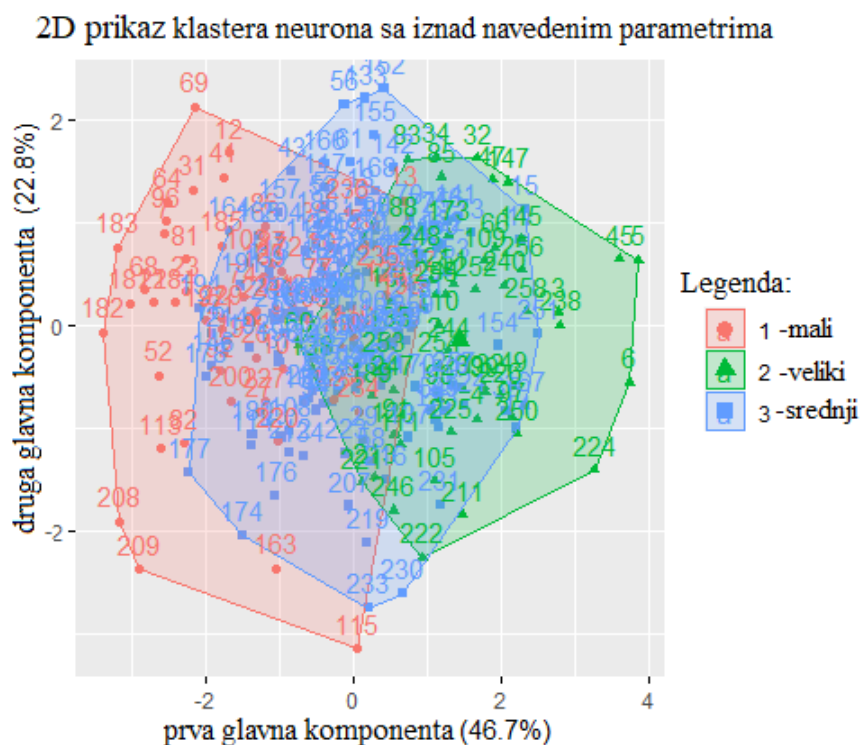
Pokušaćemo sada (slika 6.11) prvo vizuelizacijom u dve dimenzije da predočimo i zaključimo kolika su preklapanja između klastera i da li se odražava na njihov integritet. Ovde je upotrebljen takođe R programski paket *factoextra v1.0.7*. i naknadno, u svrhu 3D vizuelizacije *rgl v1.1.3*. paket. Brojevi na prikazima ispod (slike 6.11 i 6.12) su redni brojevi evaluiranih neurona koji su smešteni u svoj klaster, a na osama procenti govore koji deo varijanse objašnjava ta glavna komponenta.

Tabela 6.6: Tabela kvantifikacije relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp.

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As..pix2.	0.550	0	0.561	0.619
Pnf..pix.	0.558	-0.244	0.276	-0.744
Rm..pix.	0.491	-0.407	-0.735	0.230
Nm	0.381	0.880	-0.265	-0.102

Međutim, u grupi od 4 finalna izabrana parametra sa zamenjenim N_m sa $(D_{skel})_d$ vidimo nešto drugačiju redistribuciju (slika 6.12) opsega klastera, dok je broj slika neurona po klasteru 59, 55, 145 ostao isti. Ovako slične redistribucije po klasterima svakako pozivaju 3D percepciju slike u prostoru parametara, ali i ostavljaju sliku da je analiza sa fraktalnim parametrima u regionu GMJ-a jednako dobra sa oba tipa parametara. U tabeli 6.7 vidimo po istom predhodno upotrebljenom principu, odnos inicijalnih parametara u novom referentnom sistemu.

Sada 259 slika neurona sa svojim dendritskim krošnjama, bez aksona poseduju odnos unutrašnje sume kvadrata sa ukupnom sumom kvadrata 78.3% takođe, kao u prethodnom prikazu, ali je ovaj put nešto drugačija raspodela po klasterima. Pratimo isključivo njihove projekcije na inicijalne parametre, kako je jasno da su svi relevantni. I dalje je primetno da je A_s najreprezentativniji dezinacioni parametar, a najmanje informativan parametar ostaje isto novi parametar samo sada sa promenjenom orijentacijom, $(D_{skel})_d$. Ovo ukazuje da promenjena orijentacija ovog parametra i njegova slična raspodela u prostoru parametara kvantifikuju sličan broj razmatranih slika. Ovo definitivno aludira da je potrebno izvršiti 3D raspodelu u prostoru parametara i možda tada treba doneti finalni sud.



Slika 6.12: 3 klastera u 2 dimenzije i njihova razdvojenost i preklapanja sa parametrima A_s , P_{nf} , R_m i D_{skel} na adekvatnom poprečnom preseku

Tabela 6.7: Tabela kvantifikacije relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp. sa upotrebom fraktalnog parametra

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As..pix2.	0.557	0	0.568	0.600
Pnf..pix.	0.567	0.296	0.189	-0.745
Rm..pix.	0.518	0.162	-0.800	0.255
X.Dskel.d	0.316	-0.938	0	-0.140

U narednoj tabeli ispod (tabela 6.8) nalaze se svrsishodne analize srednjih vrednosti i odgovarajućih naslovi (mali, veliki i srednji neuroni, a statistička značajnost radi poređenja vrednosti između grupa je data kroz p vrednosti što je naznačeno ispod tabele) po njihovim opsezima parametara za 259 slika neurona GMJ-a. Treba imati u vidu da se preciznosti gube sa preslikavanjem separacije na 3 klastera, koja je izvršena sa 4 najreprezentativnija parametra, projekcijom na sve parametre. Ovo je upravo ilustrovano u tabeli 6.8 ispod.

Tabela 6.8: Tabela projekcija vrednosti svakog od upotrebljenih parametara i njihovi domeni greške

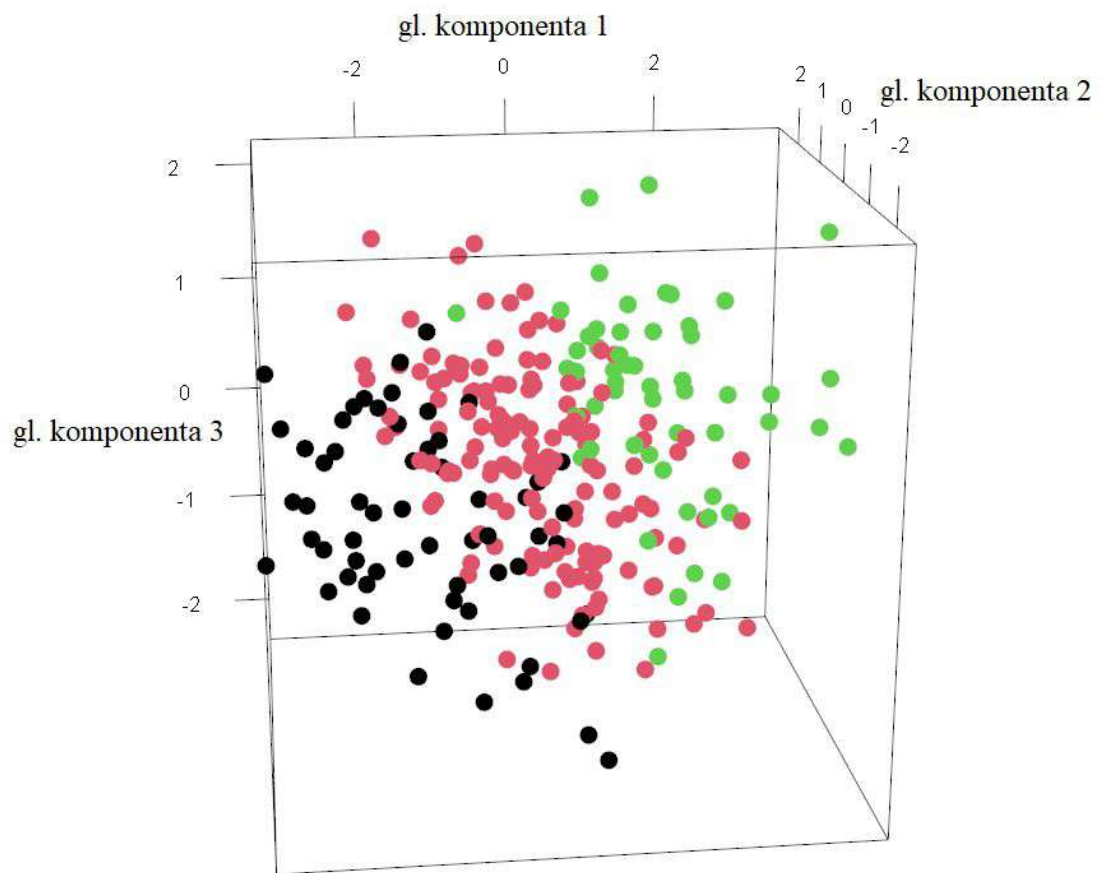
Parametar	mali	veliki	srednji
Veličina			
A_s (10^3 pix^2)	$10.8 \pm 0.4^{***}[2,3]$	$27.6 \pm 0.5^{***}[3]$	18.9 ± 0.2
A_{rf} (10^4 pix^2)	$28 \pm 2^{***}[2,3]$	$44 \pm 2^{**}[3]$	36 ± 1
ρ_{rf}	$0.050 \pm 0.004^{**}[2]$	$0.065 \pm 0.003^{**}[3]$	0.057 ± 0.002
$(D_{bin})_s$	$1.750 \pm 0.008^{***}[2];^{**}[3]$	$1.811 \pm 0.006^{***}[3]$	1.770 ± 0.002
$(D_{bin})_{nf}$	$1.806 \pm 0.006^*[2]$	1.825 ± 0.007	1.820 ± 0.004
Oblik			
P_{nf} (pix)	$1908 \pm 70^{***}[2,3]$	$2562 \pm 50^{***}[3]$	2231 ± 40
M_{nf}	0.93 ± 0.02	$0.89 \pm 0.02^*[3]$	0.95 ± 0.01
R_{rf}	$0.203 \pm 0.008^{**}[2];^*[3]$	0.232 ± 0.005	0.221 ± 0.004
$(D_{out})_{nf}$	1.067 ± 0.003	1.069 ± 0.002	1.068 ± 0.001
Dužina			
L_n (pix)	$3739 \pm 100^{***}[2];^{**}[3]$	$4809 \pm 100^*[3]$	4351 ± 90
R_m (pix)	$412 \pm 10^{***}[2];^{**}[3]$	$484 \pm 10^{**}[3]$	449 ± 7
R_b (pix)	$284 \pm 10^{***}[2]$	$354 \pm 10^*[3]$	314 ± 8
R_t (pix)	$768 \pm 20^{**}[2]$	859 ± 20	818 ± 10
Kompleksnost			
N_m	$10.3 \pm 0.3^{***}[2];^*[3]$	$12.1 \pm 0.3^*[3]$	11.2 ± 0.2
CN_b	3.9 ± 0.3	5.0 ± 0.4	4.8 ± 0.2
$(D_{skel})_d$	$1.134 \pm 0.006^*[2]$	1.157 ± 0.006	1.148 ± 0.004
Λ_n	$0.78 \pm 0.02^{***}[2];^{**}[3]$	$0.91 \pm 0.02^{***}[3]$	0.83 ± 0.01

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$;

Prođimo na samom kraju AGK kroz slike neurona i raspodele elemenata u klasterima u prostoru parametara u 3 dimenzije i kroz njihovu vizuelnu separaciju. Ova novina delom čini proširenu per-

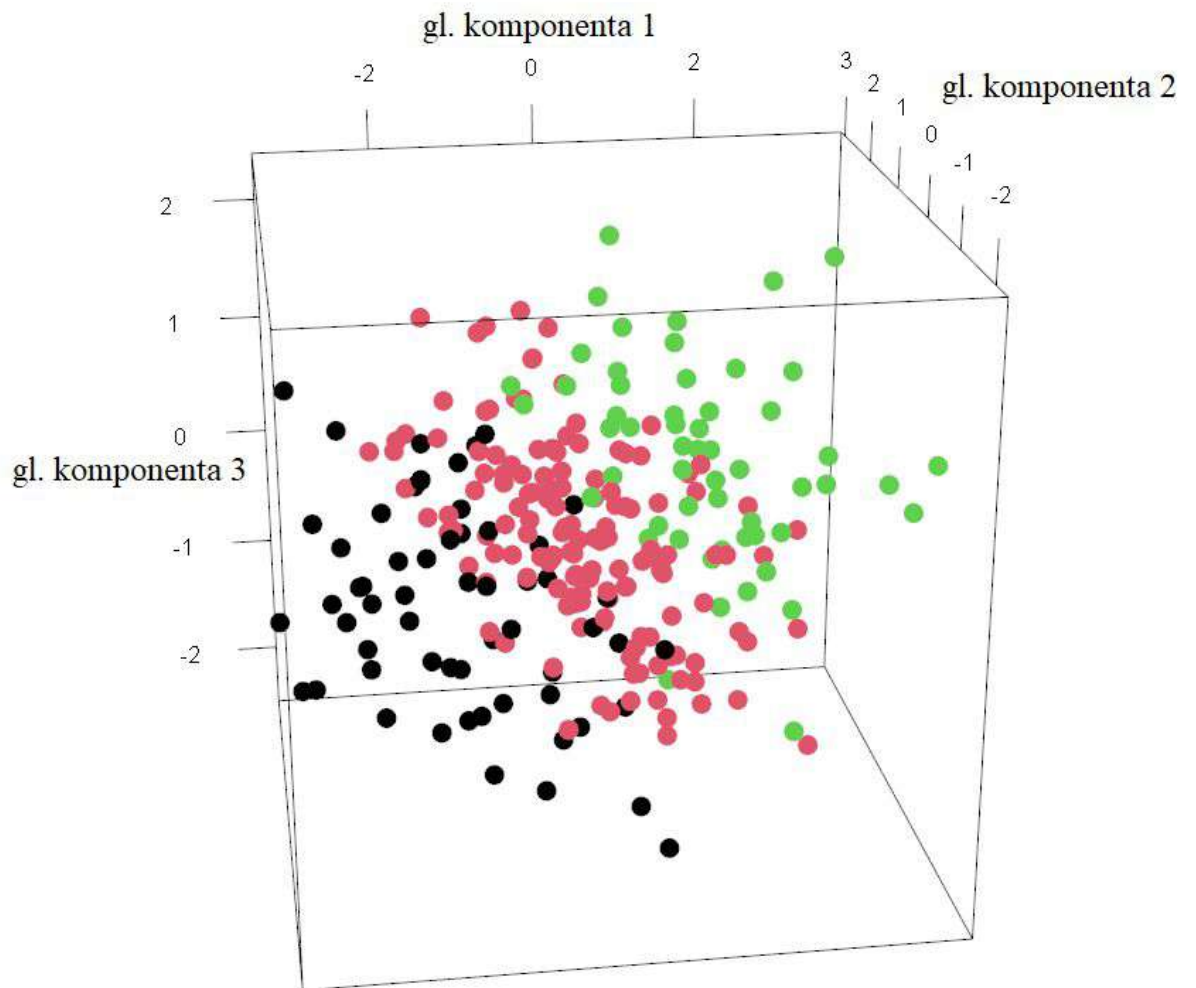
cepciju neurona GMJ-a sa prethodne podele samo na velike i male [19, 22, 23], na novu unaređenu predloženu jasnu distinkciju na male, srednje i velike neurone.

Naime, ista podela na klaster je u osnovi, koja koristi analizu k najbližih srednjih vrednosti i grupisanje na skupove sa bliskim vrednostima upotrebljenih parametara. Sa 3D vizuelizacijom (slika 6.13) po prve 3 gl. komponente jasno vidimo razliku u pozicioniranju u svoj klaster. Ponovo se vidi separacija na 3 klastera sa datim skupom numeričkih vrednosti i prethodni zaključci takođe važe. Raspodela predstavljena ovde na male, velike i srednje neurone važi i za sve ostale korišćene parametre. Ovo se može ispratiti i kroz tabelu 6.8.



Slika 6.13: 3 klastera u 3 dimenzije i njihova razdvojenost i preklapanja klastera sa parametrima A_s , P_{nf} , R_m i N_m

Drugi alternativni skup parametara i njihova 3D vizuelizacija prikazani su na datoj prostornoj distribuciji (slika 6.14). Vidi se da je i ovakva raspodela neurona u prostoru gl. komp. i njihova separacija na 3 klastera ponovo dovoljno transparentna.



Slika 6.14: 3 klastera u 3 dimenzije i njihova razdvojenost i preklapanja klastera sa parametrima A_s , P_{nf} , R_m i D_{skel}

6.2 Praćenje i evaluacija neurona GMJ-a kroz različite starosti primenom istih tehnika

Na ovom mestu ćemo (tabela 6.9) prikazati tabelu najdeskriptivnijih parametara sa starošću individua, preciznije, od 35 do 90 godina, pomoću statističke evaluacije korelacionog koeficijenta R sa godinama. R je koeficijent korelacije koji govori da li postoji neka statistička veza između posmatranog parametra i godina. Veličina t_k , predstavlja uobičajenu t vrednost, koja meri veličinu razlike (korelacije) u odnosu na varijaciju u uzorku, usrednjenu za dati parametar. Na kraju, p je nivo značajnosti dobijen pomoću tabelarnih vrednosti u primeni t testa dvostrane značajnosti (engl. *2-tailed t test*; $t_{0,05} = 2.228$, $t_{0,01} = 3.169$ i $t_{0,001} = 4.587$).

Iz tabele (tabela 6.9) vidimo da se R za prva dva parametra ne menja i nema značajne vrednosti, dok za R_m i N_m se statistički značajno menja i mogu se koristiti za opis morfologije neurona, kako vidimo da je starosna informacija sadržana u njima na slikama.

Tabela 6.9: Starosno praćenje neurona pomoću 4 najdeskriptivnija parametra sa jednim najreprezentativnijim izabranim iz svake grupe

Parametar	R	t_k	p
A_s	0.4556	1.619	>0.05
P_{nf}	0.4544	1.613	>0.05
R_m	0.6823	2.952	<0.01
N_m	0.5718	2.204	<0.05

Radi dalje analize upotrebićemo sve parametre i porediti prvu starosnu grupu (od 35 do 60 godina) i treću starosnu grupu (76 do 90 godina). Ovo sve u daljoj starosnoj analizi, izvedeno je sa grupom srednji neuroni (u ovoj grupi vrednosti parametara se nalaze u intermedijalnom domenu između vrednosti parametara grupa veliki neuroni i mali neuroni) sa 145 slika ćelija, kako bi se dobili pouzdani brojevi za interpretaciju rezultata u promeni morfologije pri starenju. Takav uzorak se sastoji iz 3 grupe. Prvu grupu nazivamo grupa A i čine je slike neurona produžene moždine pojedinaca starosti od 35–60 godina (prva grupa maturacije). Druge dve grupe su prva grupa starenja B i druga grupa starenja C. U drugoj grupi B pronalazimo slike neurona individua starosti u opsegu 61–75 godina i na kraju u grupi C analiziramo slike neurona starosti pojedinaca 76–90 godina.

Tabela 6.10 ispod pokazuje da poredeći, kako je navedeno, grupu A i grupu C možemo reći da parametri u grupi A su numerički generalno veći od parametara u grupi C, izuzimajući ρ_{rf} , R_{rf} i Λ_n . Opadajući trend je primetan, ali razlika između grupa nije statistički značajna za sve parametre grupe. Veličina kao i za 3 parametra iz grupe Oblik. Jedini izuzetak u grupi Oblik je M_{nf} . Parametri u grupama Dužina i Kompleksnost, odnosno, dendritske krošnje, se statistički razlikuju između uočenih grupa. Najznačajnije razlike su kod parametara L_n , R_b , CN_b i $(D_{skel})_d$, nešto manje značajne razlike kod R_m i N_m , a standardne statističke razlike nalazimo kod R_t i Λ_n .

Iz gornje analize, evidentno zaključujemo da parametri koje smo koristili kao najinformativnije parametre za opis morfologije neurona GMJ-a ne govore dovoljno o promeni morfologije sa godinama i ovde imamo skoro dijametralno različitu sliku, pri opisu neurona kroz starenje. Preciznije,

površina some (A_s) ne razlikuje se značajno pri starenju, isto kao nijedan drugi parametar iz grupe Veličina. Perimetar neuronskog polja (P_{nf}) takođe nije pokazao pouzdanu razliku sa godinama, a jedini značajan parametar u grupi Oblik je M_{nf} koji kvantifikuje odnos površine tela (some) neurona i kvadrata obima neuronskog polja i on ovde pokazuje deformaciju u odnosu na krug, čija bi vrednost kod funkcionalnog neurona (disfunkcija sa godinama se ogleda u manjim vrednostima od 1) trebalo idealno da iznosi 1. Ovde zaključujemo, imajući u vidu pretpostavku funkcionalnosti ovog regiona i zaštićenosti, da deformacija postoji sa starenjem i da su neuroni GMJ-a kod starijih individua, pokazali rezultate koji aludiraju na geometriju različitu od kruga sa prisutnom deformacijom merenom pomoću ovog parametra. Time zaključujemo da je M_{nf} parametar sa aspekta starosti informativan. Dalje, izdiferencirani parametar R_m je manje funkcionalan od L_n ili R_b . Ovde se prisećamo da na adekvatnom biplot dijagramu (slika 6.6) L_n , tj. ukupna dužina dendrita, bi svakako imao zahvalan odabir, jer njegova projekcija je u prvom kvadrantu, dok kod R_b dobijamo nešto lošiji izbor u smislu projekcija, ali ne i zanemarljiv. Finalno zaključujemo da je L_n , kao parametar koji daje ukupnu dužinu dendrita neurona, jedini parametar koji najinformativnije opisuje promenu na slikama neurona sa starenjem, iz grupe Dužina. Iz grupe Kompleksnost CN_b i $(D_{skel})_d$ najviše trpe promena sa godinama na ovom uzorku slika i poseduju istu statističku značajnost. Odavde sugeršemo da je $(D_{skel})_d$ možda najadekvatniji parametar kako opisuje fraktalnu dimenziju skeletonizovane slike neurona, njegove some sa dendritima bez aksona i govori o njegovoj krivudavosti dendrita i njihovoj složenosti. Parametar CN_b trpi isto značajnu promenu, ali smanjenje broja tačaka račvanja samo govori o njegovoj smanjenoj funkcionalnosti sa godinama. Ovo takođe treba imati u vidu, ali možda ne u prvom redu.

Bitan aspekt ovakve *post mortem* analize bi mogao da se ogleda i kroz promenu najrelevantnih parametara sa godinama individua. Ova promena jednostavno oslikava istu tranziciju u kojoj se koristi jedan skup parametara dok u starosti se koristi drugi informativniji skup parametara. Na kraju ovo samo oslikava promenu morfologije ispitivanih ćelija tokom života.

Tabela 6.10: Srednje vrednosti i standardne greške 17 parametara u poređenju grupe A i grupe C

Parametar	Grupa A	Grupa C	p
Veličina			
A_s (pix^2)	19056 ± 300	18578 ± 300	0.308
A_{rf} (pix^2)	386326 ± 20000	343244 ± 20000	0.192
ρ_{rf}	0.054 ± 0.003	0.062 ± 0.004	0.151
$(D_{bin})_s$	1.774 ± 0.004	1.765 ± 0.003	0.075
$(D_{bin})_{nf}$	1.821 ± 0.006	1.817 ± 0.007	0.676
Oblik			
P_{nf} (pix)	2252 ± 100	2239 ± 100	0.896
M_{nf}	0.98 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.006**
R_{rf}	0.217 ± 0.006	0.224 ± 0.008	0.403
$(D_{out})_{nf}$	1.067 ± 0.003	1.070 ± 0.002	0.453
Dužina			
L_n (pix)	4874 ± 200	3676 ± 100	1.86×10^{-8} ***
R_m (pix)	481 ± 10	436 ± 10	0.008**
R_b (pix)	348 ± 10	280 ± 10	0.0004***
R_t (pix)	870 ± 30	784 ± 20	0.015*
Komplektnost			
N_m	11.7 ± 0.3	10.3 ± 0.3	0.001**
CN_b	6.3 ± 0.4	3.7 ± 0.3	7.73×10^{-8} ***
$(D_{skel})_d$	1.162 ± 0.006	1.125 ± 0.006	1.35×10^{-5} ***
Λ_n	0.81 ± 0.02	0.87 ± 0.02	0.026*

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$; *** - $p < 0.0001$;

6.3 Primena tehnika u opisu slika astrocita

Ponovo, izabraćemo relevantne kategorije, ovaj put su to za astrocite Veličina, Oblik, Kompleksnost i Homogenost [22–24] i u okviru njih analizirati dijagrame prevoja, biplot dijagrame i pridružene tabele odnosa između dva referentna sistema. Prvi deo analize nećemo razdvajati na slike za uočeni tip astrocita, kako se ne bi specifikovali određeni parametri za datu preferentnu grupu i prejudicirali kojoj grupi se može pripisati izabrani parametar. Kasnije, napravićemo separaciju na podatke koje pripadaju fibroznim astrocitima i protoplazmatičnim astrocitima i predočiti razliku u broju predloženih klastera. Potražiće se mogući optimalni brojevi klastera, opisaćemo ih vizuelno u 2 i 3 dimenzije sa izabranim najinformativnijim parametrima i analizirati njihov status sa *Pearson*-ovim koeficijentima.

Iz tabele 6.11 ispod, vidimo ponovo rezultate AGK podeljene po grupama sa odgovarajućim parametrima kao u tabeli 6.1. Treba imati u vidu da svaka od gl. komp. u svakoj grupi korespondira sa svojom projekcijom na originalne parametre iz te grupe u drugom referentnom sistemu.

Tabela 6.11: Tabela standardne devijacije, proporcije varijansi i kumulativne proporcije po glavnim komponentama unutar posmatrane grupe kroz sve četiri grupe tj. kategorije.

posmatrane morfološke osobine tj. grupe	gl. komp.	SD	PV	KP
Veličina ($A_s, A_{gf}, A_{rf}, (D_{bin})_s, (D_{bin})_g, (D_{bin})_{gf}$)	1	1.55	0.40	0.40
	2	1.12	0.21	0.61
	3	1.00	0.18	0.78
	4	0.89	0.13	0.91
	5	0.74	0.09	1.00
	6	0.00	0.00	1.00
Oblik ($P_{gf}, M_{gf}, (D_{out})_{gf}$)	1	1.11	0.41	0.41
	2	0.98	0.32	0.73
	3	0.89	0.26	1.00
Kompleksnost ($N, N_m, (D_{skel})_g$)	1	1.38	0.63	0.63
	2	0.85	0.24	0.87
	3	0.61	0.12	1.00
Homogenost (L_{gs}, L_g, L_{gf})	1	1.11	0.42	0.42
	2	0.98	0.32	0.74
	3	0.89	0.26	1.00

Razmotrimo sada sve parametre. U grupi Veličina astrocita nalazimo euklidske parametre, A_s (površina some), A_{gf} (površina glijalnog polja) i A_{rf} (površina receptivnog polja). Dok su $(D_{bin})_s$ (binarna fraktalna dimenzija some astrocita), $(D_{bin})_g$ (binarna fraktalna dimenzija glijalnog polja) i $(D_{bin})_{gf}$ (binarna fraktalna dimenzija glijalnog polja) fraktalni parametri. Iz tabele 6.11 vidimo da najveći doprinos potiče od prve dve komponente ($SD > 1$) pritom dijagram prevoja (slika 6.15) sugeriše da samo treba razmatrati prve dve komponente. Na biplot dijagramu (slika 6.16) uočava se da duž prve glavne komponente A_s i A_{gf} jedine imaju značajan udeo i zbog značajnije deskriptivnosti, ali i projekcije na drugu glavnu komponentu, biramo A_s kao relevantan parametar. Treba imati u vidu

da je A_{gf} blisko dobar i takođe ne treba izgubiti iz vida da izabrani A_s parametar ima najbolji profil pozitivnih vrednosti intenziteta (tabela 6.12) po više gl. komponenata.

U grupi Oblik astrocita od inicijalnih euklidskih P_{gf} , M_{gf} , R_{gf} , A_{rgf} i S_{gf} parametara i jedinog monofraktalnog $(D_{out})_{gf}$ parametra dolazimo do tri relevantna P_{gf} , M_{gf} i $(D_{out})_{gf}$ pre svega zbog svog intenziteta i distinktnih orijentacija koje vidimo na biplot dijagramu (slika 6.18). Iz odgovarajućeg dijagrama prevoja (slika 6.17) zaključujemo da samo treba razmatrati jednu najrelevantniju komponentu iz ove grupe, a u projekciji na prvu glavnu komponentu jasno se nameće perimetar glijalnog polja P_{gf} koji sa površinom some A_s kreira prvi dublet od izabranih parametara. Takođe parametar P_{gf} (tabela 6.13) pokazuje najkvalitetniji odnos.

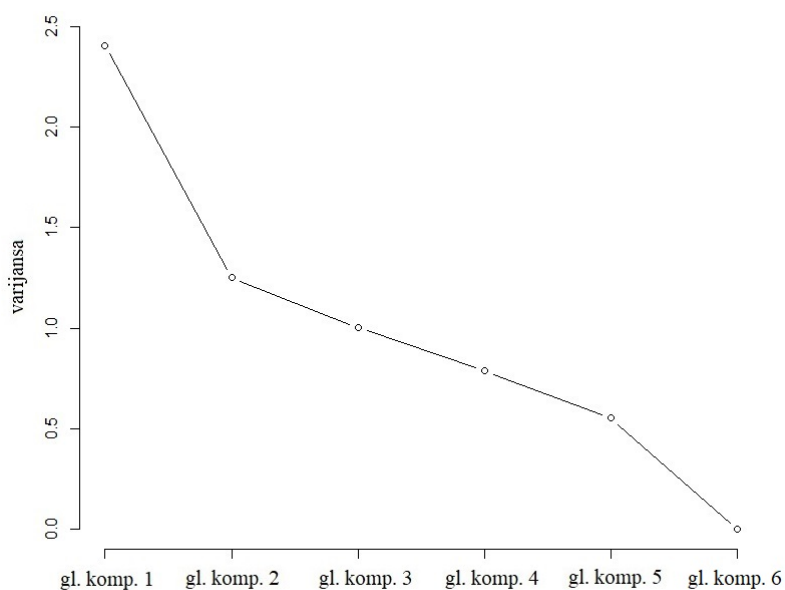
Dalje, u grupi Kompleksnost astrocita nailazimo na dva euklidska parametra N , N_m i jedan monofraktalni koji opisuje fraktalnu dimenziju skeletonizovanih slika astrocita $(D_{skel})_g$. Pomoću AGK (tabela 6.11) primećuje se da jedna glavna komponenta ima SD veću od 1 što sugeriše i dijagram prevoja iste grupe (slika 6.19). Broj preseka nastavaka sa opisanom kružnicom tj. N parametar je izabran, jer poseduje jednake projekcije na prve dve glavne komponente (biplot 6.20). Parametar N zaista pokazuje (tabela 6.14) nedvosmisleni prioritet.

Na kraju u grupi Homogenost astrocita tri monofraktalna parametra poseduju relevantnu ulogu, L_{gs} , L_g i L_{gf} . Kako je potrebno izdiferencirati jedan (slika 6.21) pomoć tražimo u odgovarajućem biplot dijagramu. Parametar L_g od predstavljenih ima najintenzivniju projekciju na obe glavne komponente (slika 6.22) i zato ga biramo kao predstavnika. Ovde su isto tako prisutne pozitivne vrednosti (tabela 6.15) koje zadovoljavaju istu logiku.

Sa uređenom četvorkom A_s , P_{gf} , N i L_g razmatramo moguće optimalne brojeve klastera za obe klase astrocita metodom siluete i naknadnom 2D i 3D vizuelizacijom.

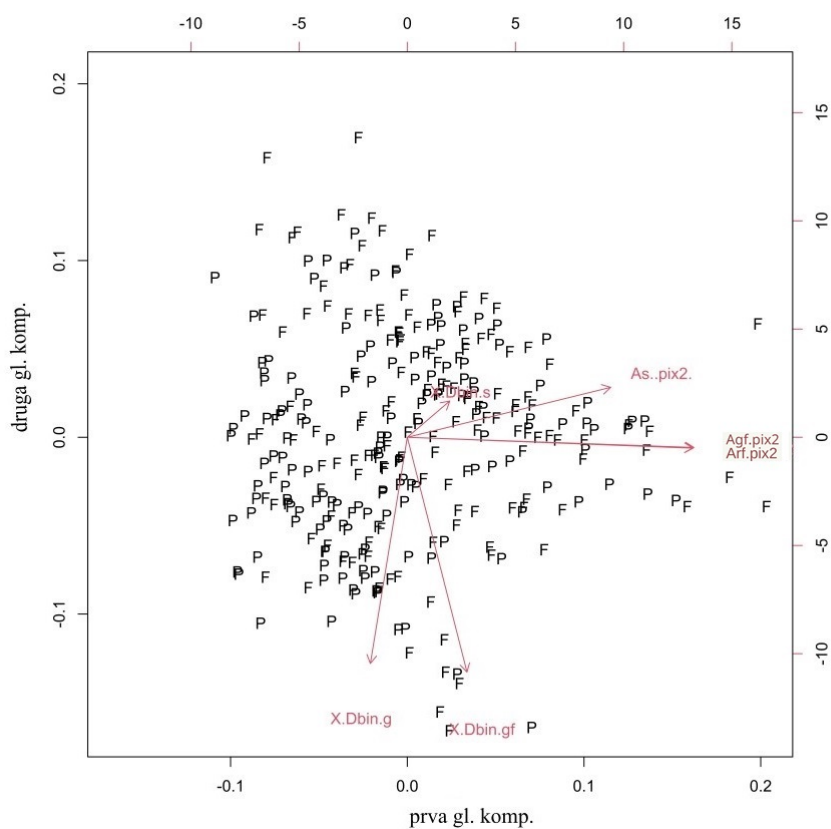
Na isti način (slika 6.15) analiziramo dijagram prevoja grupe Veličina, imajući na umu da je jedan parametar relevantan i tabelu sa rezultatima AGK (tabela 6.3). Slična logika se koristi i kod ostalih morfoloških kategorija Oblik, Kompleksnost i Homogenost (slika 6.17, slika 6.19, slika 6.21) sa odgovarajućim suplementarnim alatima. Sada, kod biplot dijagrama zapažamo standardne dve ose za prve dve glavne komponente i duplirane iste ose sa suprotnih strana. Prikazane su odgovarajuće vrednosti parametara i njihova odsupanja od srednjih vrednosti sa opisom iz novog (rotiranog) koordinatnog sistema - ispod, prva gl. komp. i levo, druga gl. komp. i starog (gore i desno) kada vrednosti izabranog skupa parametara nisu bile sortirane po opadajućoj varijansi. Ne treba izgubiti iz vida da se sada prate vrednosti izabranih parametara i kako odskaču od srednje vrednosti (ovo će pokazati najveću varijansu) u poređenju sa ostalim parametrima u toj grupi, sve iz transparentnijeg koordinatnog sistema sa gradacijom po varijansi. Naknadno ćemo izvršiti razdvajanje i predlog sugerisanih klastera u domenu fibroznih i protoplazmatičnih astrocita, dok na ovom nivou moramo uzimati u obzir i njihovu zajedničku sliku radi nade da situacija ne mora da se usložnjava. Na kraju u suplementarnim tabelama (tabele 6.12, 6.13, 6.14 i 6.15) ispod transparentno uočavamo da je ista logika i dalje zadovoljena. U kolonama su date vrednosti parametara koje se kreću od -1 do 1 i pokazuju koliko ta varijabla utiče na gl. komp. dok znak govori o direktnoj ili inverznoj proporcionalnosti.

Veličina, slika 6.15.



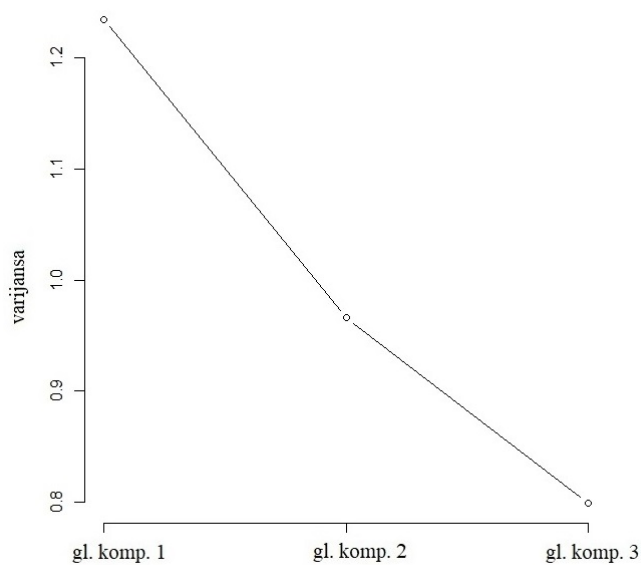
Slika 6.15: Dijagram prevoja grupe Veličina astrocita

Biplot dijagram astrocita grupe Veličina, slika 6.16 je ispod prikazan.



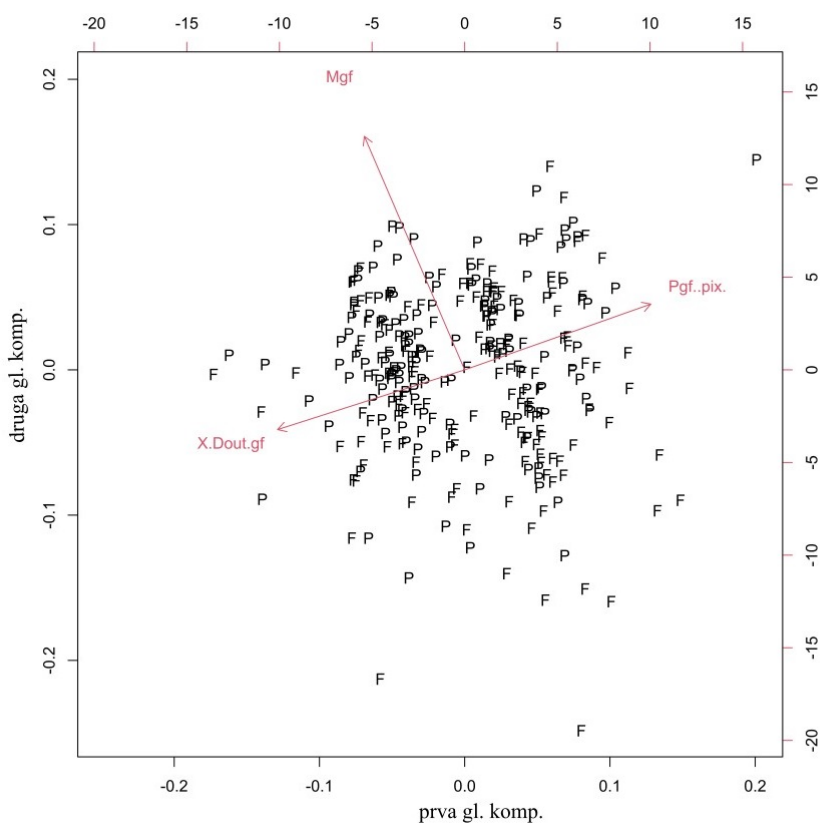
Slika 6.16: Biplot grupe Veličina astrocita sa distribucijom fibroznih i protoplazmatičnih astrocita

Oblik, slika 6.17.



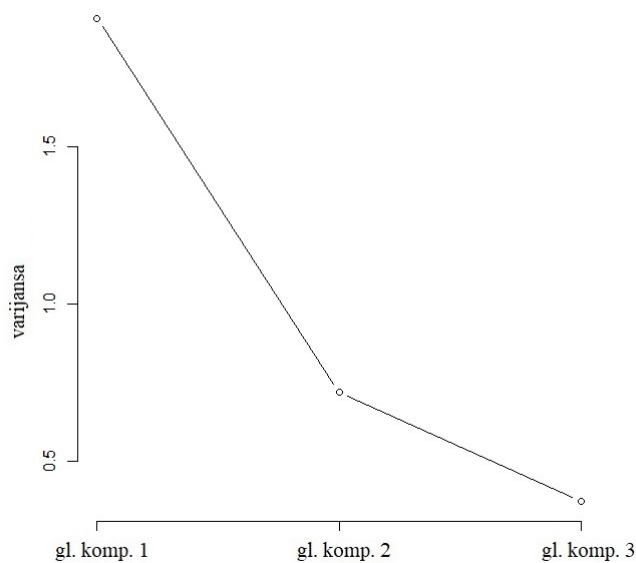
Slika 6.17: Dijagram prevoja grupe Oblik astrocita

Na biplot dijagramu za Oblik, slika 6.18 vidimo adekvatne parametre.



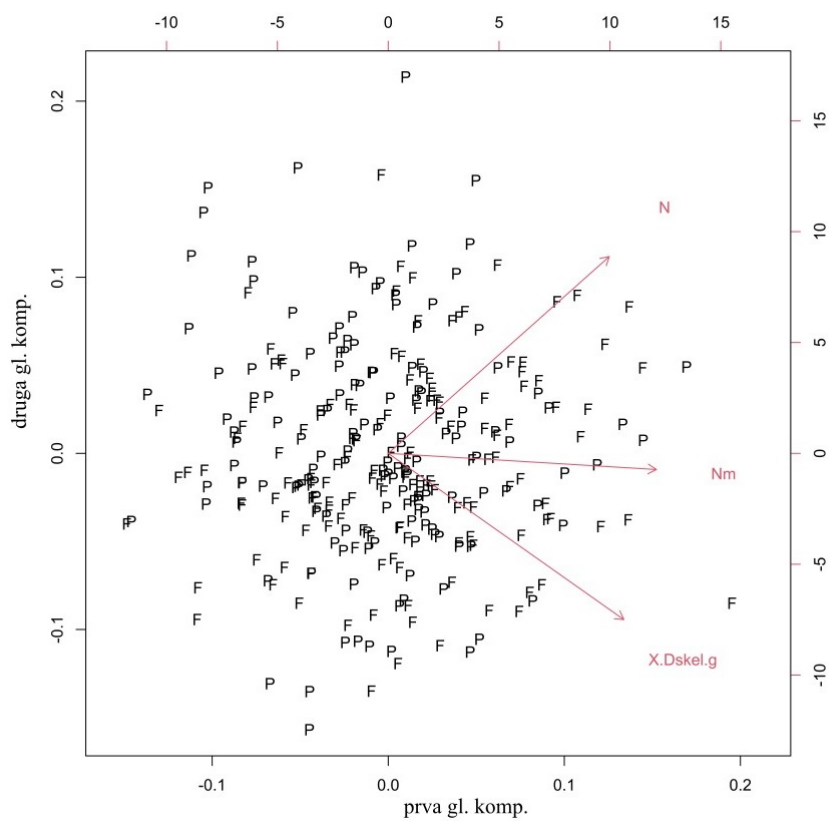
Slika 6.18: Biplot grupe Oblik astrocita sa distribucijom fibroznih i protoplazmatičnih astrocita

Kompleksnost, slika 6.19.



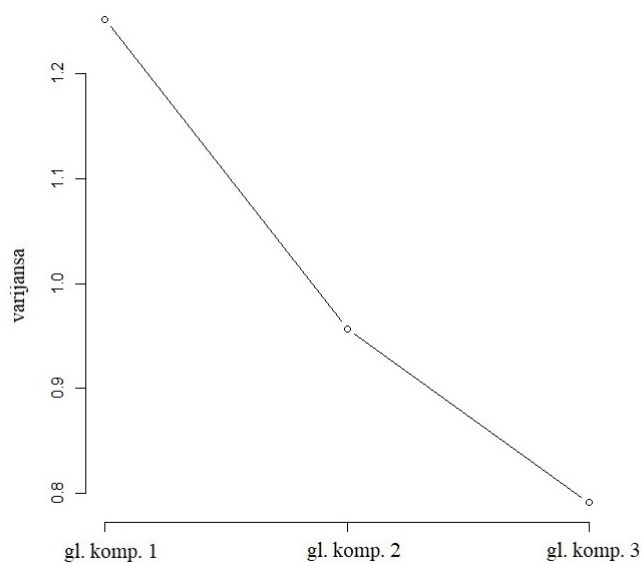
Slika 6.19: Dijagram prevoja grupe Kompleksnost astrocita

Pridruženi biplot dijagram u grupi Kompleksnost, slika 6.20.

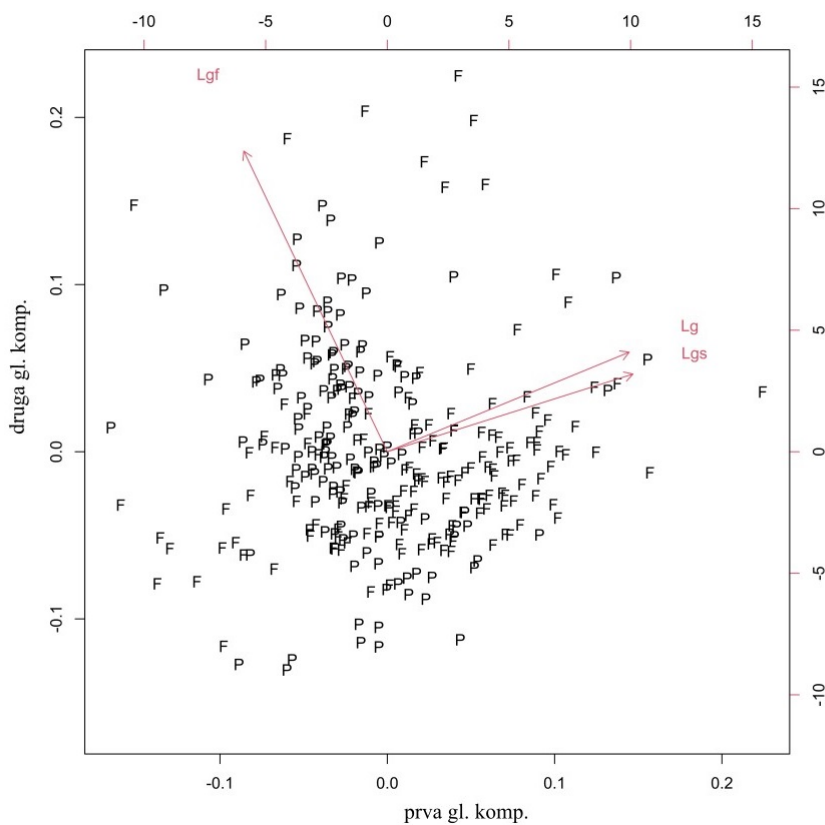


Slika 6.20: Biplot grupe Kompleksnost astrocita sa distribucijom fibroznih i protoplazmatičnih astrocita

Homogenost, slika 6.21.



Slika 6.21: Dijagram prevoja grupe Homogenost astrocita



Slika 6.22: Biplot grupe Homogenost astrocita sa distribucijom fibroznih i protoplazmatičnih astrocita

Sve ovo prate suplementarne tabele ispod (6.12, 6.13, 6.14 i 6.15) sa vrednostima projekcija od -1 do 1 inicijalnih parametara na gl. komp. u novom bazisu.

Tabela 6.12: Tabela relacija inicijalnih parametara astrocita sa glavnim komponentama u grupi Veličina

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4	gl. komp. 5	gl. komp. 6
As..pix2.	0.442	0.150	0.150	0.504	0.711	0
Agf..pix2.	0.623	0	-0.112	0	-0.303	-0.709
Arf..pix2.	0.621	0	-0.114	0	-0.314	0.705
X.Dbin.s	0	0.109	0.957	-0.216	-0.129	0
X.Dbin.g	0	-0.681	0.189	0.637	-0.297	0
X.Dbin.gf	0.130	-0.707	0	-0.534	0.446	0

Tabela 6.13: Tabela relacija inicijalnih parametara astrocita sa glavnim komponentama u grupi Oblik

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3
Pgf..pix.	0.659	0.263	0.704
Mgf	-0.355	0.935	0
X.Dout.gf	-0.663	-0.239	0.710

Tabela 6.14: Tabela relacija inicijalnih parametara astrocita sa glavnim komponentama u grupi Kompleksnost

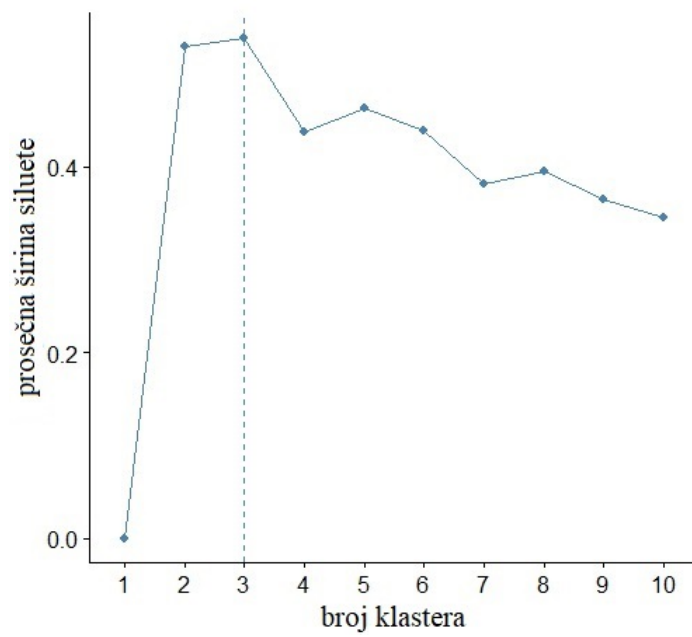
	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3
N	0.526	0.762	0.376
Nm	0.639	0	-0.767
X.Dskel.g	0.561	-0.644	0.520

Tabela 6.15: Tabela relacija inicijalnih parametara astrocita sa glavnim komponentama u grupi Homogenost

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3
Lg	0.648	0.305	0.698
Lgs	0.658	0.238	-0.715
Lgf	-0.384	0.922	0

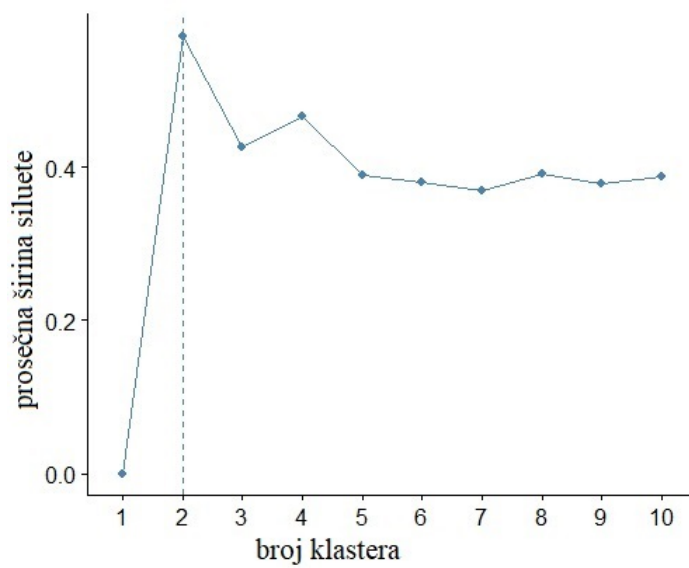
Posle ponovo sprovedene AGK sa numeričkim vrednostima poteklih inicijalno sa slika astrocita, proveravamo optimalni broj klastera i za fibrozne astrocite i za protoplazmatične astrocite. Iznova primenjujemo metodu siluete. Ovde napominjemo, da je AGK za analizu slike mogla da se razdvoji i na AGK za fibrozne i na AGK za protoplazmatične sa istim ponuđenim parametrima kod astrocita. Sa druge strane, kako je ranije zaključeno da postoji izotropnost i homogenost u raspodelama oba tipa astrocita u prostoru parametara, očekivano je da se ni odabir parametara ne bi razlikovao. Iz ovog razloga u nastavku će se potražiti, takođe metodom siluete, optimalan broj klastera samo kod fibroznih i samo kod protoplazmatičnih. Za protoplazmatične astrocite situacija je nesto drugačija nego za fibrozne astrocite što se vidi u nastavku (slika 6.23 i slika 6.24).

Optimalan broj klastera fibroznih astrocita u GMJ-u



Slika 6.23: Prosečna širina siluete sa pretpostavljenim optimalnim brojem klastera

Optimalan broj klastera protoplazmatičnih astrocita u GMJ-u

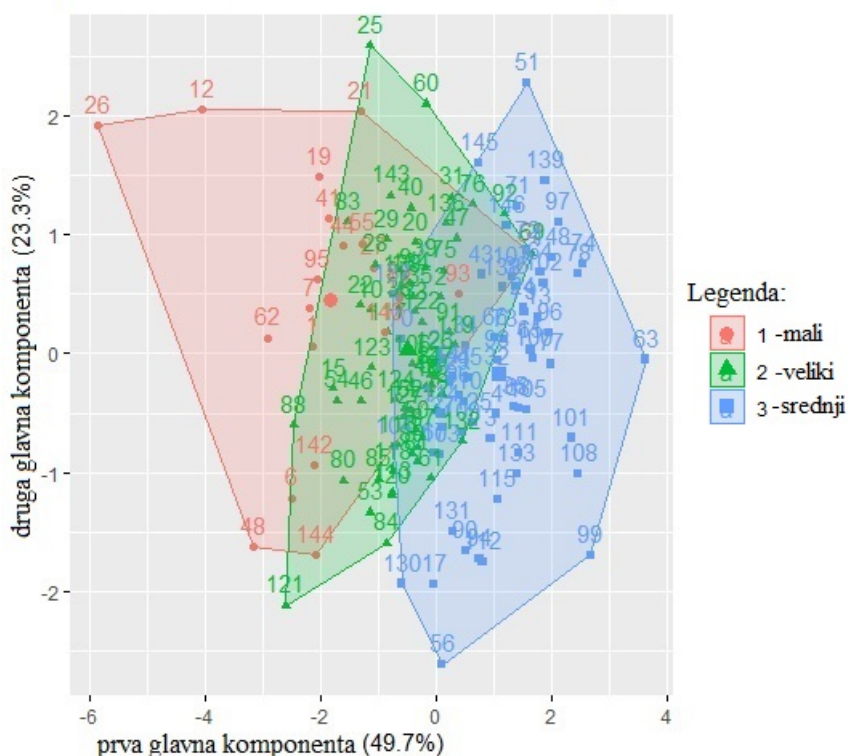


Slika 6.24: Prosečna širina siluete sa pretpostavljenim optimalnim brojem klastera

Brojevi na prikazima ispod (slike 6.25 i 6.26) su ponovo redni brojevi evaluiranih astrocita koji su smesteni u svoj klaster, a na osama procenti govore, takođe koji deo varijanse objašnjava ta glavna komponenta.

Sada vidimo raspodelu fibroznih astrocita u dve dimenzije (slika 6.25) po principu ustanovljenom za neurone. Pritom vidimo njihovu distribuciju kroz dva referentna sistema preko suplementarne tabele 6.16 u ranije prihvaćenim okvirima. Odnos unutrašnje sume kvadrata sa ukupnom sumom kvadrata je 76.2% za fibrozne astrocite. Ovde primećujemo 63 slike fibroznih astrocita u grupi 1 (mali fibrozni astrociti) 21 sliku u grupi 2 (veliki fibrozni astrociti) i 64 slike u grupi 3 (srednji fibrozni astrociti).

2D prikaz klastera fibroznih astrocita sa izabranim parametrima

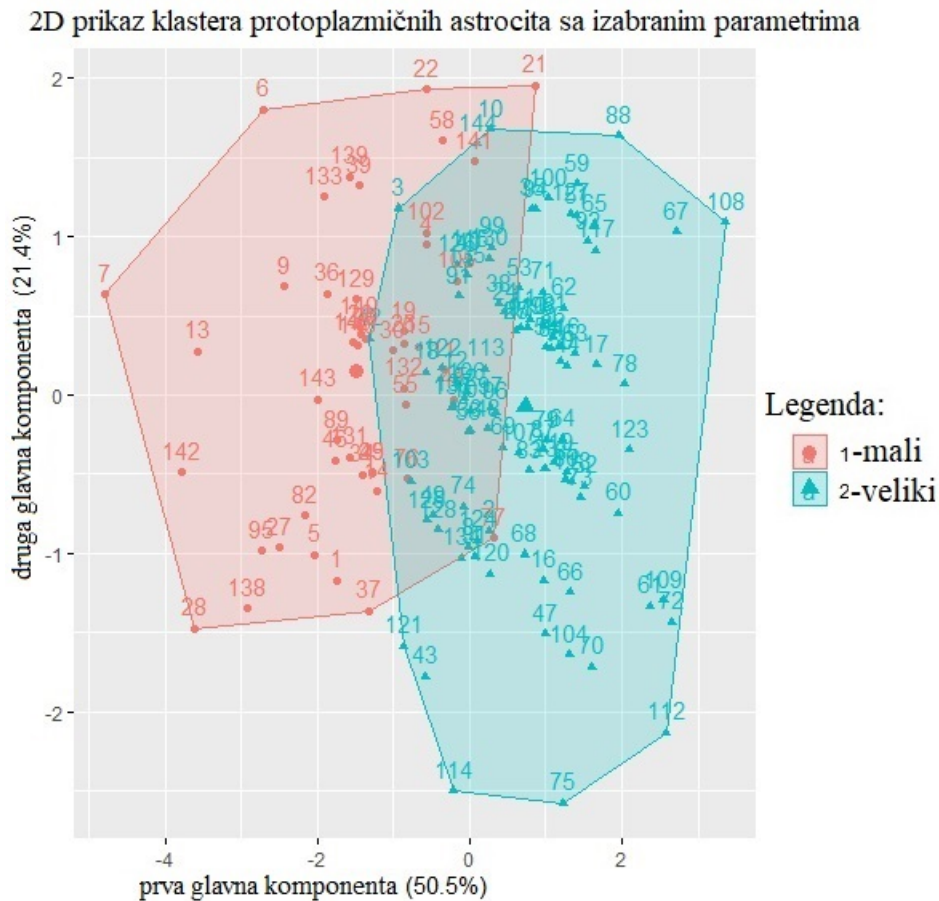


Slika 6.25: 2D distribucija i preklapanja klastera fibroznih astrocita

Tabela 6.16: Tabela relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp. fibroznih astrocita

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As..pix2.	0.586	0.277	0.261	0.716
Pgf..pix.	0.507	-0.416	0.591	-0.469
N	0.421	-0.592	-0.675	0.130
Lg	0.471	0.633	-0.357	-0.500

Za protoplazmatične astrocite imamo analognu raspodelu u dve dimenzije sa istim parametrima (slika 6.26) koji prave distinkciju i suplementarnu tabelu 6.17 koja prati projekciju parametra u novoizabranom referentnom sistemu. Odnos unutrašnje sume kvadrata sa ukupnom sumom kvadrata je 64.2% za protoplazmatične astrocite. Sada uočavamo 98 slika u grupi 1 (mali protoplazmatični astrociti) i 48 slika u grupi 2 (veliki protoplazmatični astrociti).



Slika 6.26: 2D distribucija i preklapanja klastera protoplazmatičnih astrocita

Tabela 6.17: Tabela relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp. protoplazmatičnih astrocita

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As..pix2.	0.603	0.145	0.177	0.764
Pgf..pix.	0.547	0.163	0.567	-0.594
N	0.357	-0.918	-0.155	0
Lg	0.458	0.330	-0.789	-0.242

Sledeća tabela 6.18 daje srednje vrednosti i standardne greške dve vrste astrocita prema izabranom i upotrebljenom parametru i oslikava praćenu morfologiju grupa kroz sve upotrebljene parametre. Iz tabele 6.18 vidimo da je morfologija kvantifikovana srednjim vrednostima od kojih su najinformativniji A_s , P_{gf} , N i L_g kako je AGK pokazala. Fraktalni parametar $(D_{skel})_g$ takođe se pokazao kvalitetnim kod oba tipa astrocita. Iz poslednje kolone čitamo nivo značajnosti (p) uočenog parametra. Ovde statistički značajni euklidski parametri su A_s , A_{gf} i A_{rf} iz grupe Veličina, a iz grupe Oblik P_{gf} . Fraktalni značajni parametri su $(D_{skel})_g$ iz grupe Kompleksnost i svi parametri iz grupe Homogenost (L_{gs} , L_g i L_{gf}).

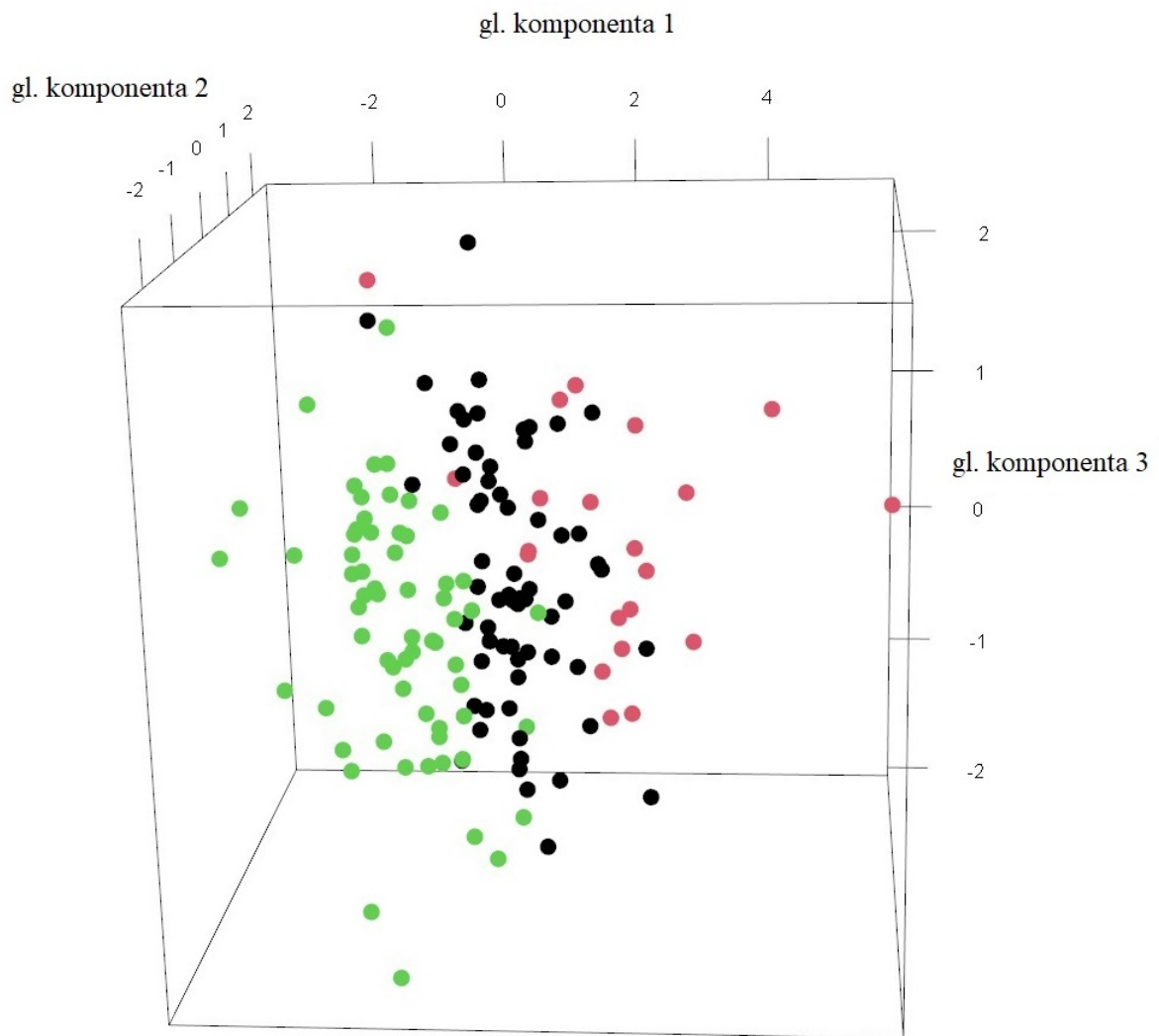
Tabela 6.18: Srednje vrednosti svih 15 parametara za oba tipa astrocita i standardne greške

Posmatane morfološke osobine	Parametar	Fibrozni	Protoplazmatični	p
Veličina	$A_s (\times 10^3 \text{ pix}^2)$	8.8 ± 0.3	6.6 ± 0.2	<0.01
	$A_{gf} (\times 10^5 \text{ pix}^2)$	5.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2	0.04
	$A_{rf} (\times 10^5 \text{ pix}^2)$	5.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	0.05 *
	$(D_{bin})_s$	1.723 ± 0.006	1.745 ± 0.006	0.08
	$(D_{bin})_g$	1.425 ± 0.003	1.437 ± 0.003	0.1
	$(D_{bin})_{gf}$	1.816 ± 0.004	1.818 ± 0.003	0.73
Oblik	$P_{gf} (\times 10^3 \text{ pix})$	3.20 ± 0.06	2.83 ± 0.07	<0.01
	$M_{gf} (\text{pix})$	0.703 ± 0.006	0.713 ± 0.005	0.24
	$(D_{out})_{gf}$	1.062 ± 0.002	1.064 ± 0.002	0.44
Kompleksnost	N	6.9 ± 0.1	7.0 ± 0.1	0.68
	N_m	14.1 ± 0.3	14.4 ± 0.2	0.38
	$(D_{skel})_g$	1.169 ± 0.003	1.150 ± 0.004	<0.01
Homogenost	L_{gs}	0.125 ± 0.003	0.119 ± 0.002	<0.01
	L_g	0.623 ± 0.008	0.588 ± 0.005	<0.01
	L_{gf}	$0.123(1) \pm 0.001$	$0.123(4) \pm 0.001$	<0.01

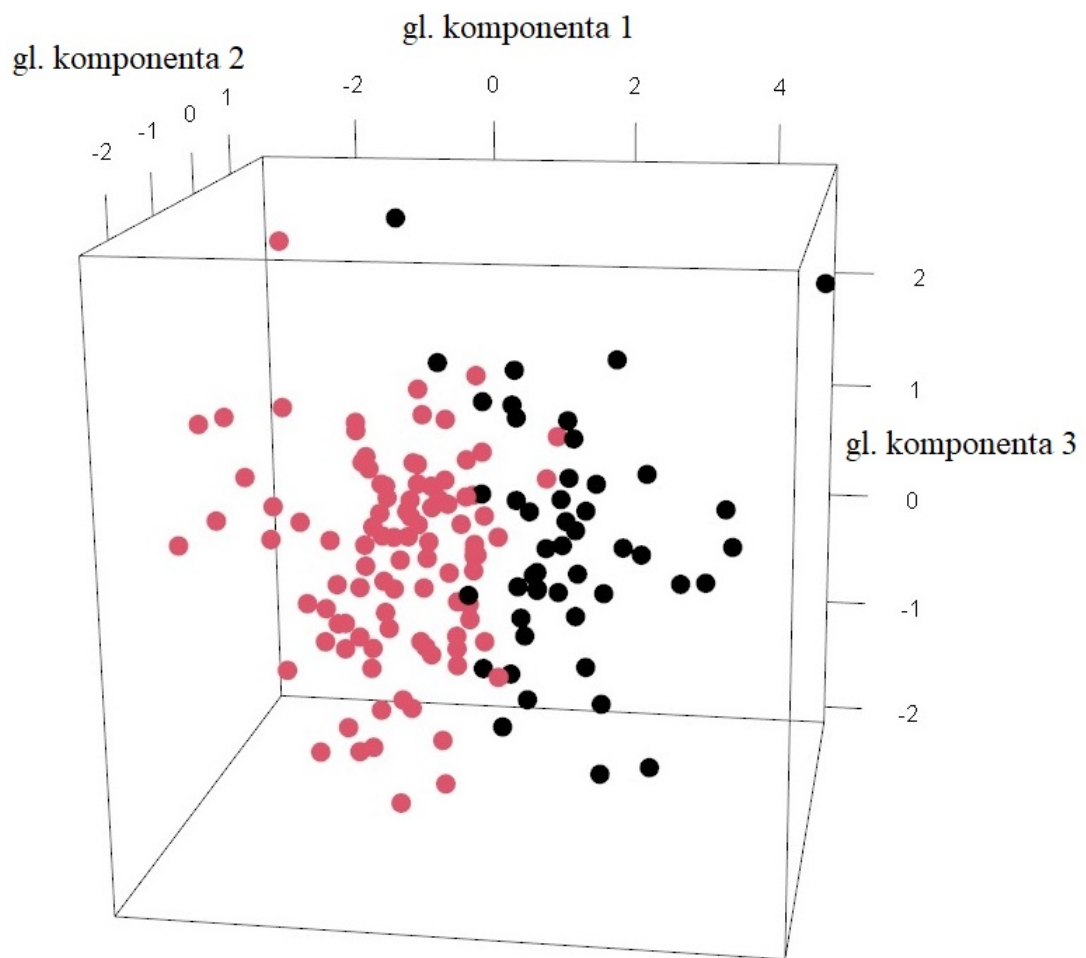
Statistička značajnost - $p < 0.05$; Vrednost $p = 0.05$, naznačena sa * predstavlja granični slučaj, dok u kod lakunarnosti glijalnog polja na 4. decimali se vidi da postoji nešto viša vrednost u korist protoplazmatičnih astrocita u odnosu na fibrozne astrocite.

Iz gornje tabele 6.18, zaključujemo da fibrozni generalno imaju veće srednje vrednosti od protoplazmatičnih. Ovo je transparentno u slučaju euklidskih parametara A_s , A_{gf} , A_{rf} i P_{gf} i monofraktalnih $(D_{skel})_g$ i L_g . U slučaju parametara M_{gf} , $(D_{bin})_s$, $(D_{bin})_g$, $(D_{bin})_{gf}$ i L_{gf} zaključak je inverzan. Treba imati u vidu da $(D_{out})_{gf}$ poseduje bliske srednje vrednosti za oba tipa astrocita i da je statistička značajnost data kroz 8 istaknutih parametara (pritom parametar sa graničnom vrednošću je uključen). Na kraju parovi $A_{gf} - A_{rf}$ kao i $L_g - L_{gs}$ transparentno pokazuju da su po slikama 6.16 i 6.22, redom, međusobno zavisni parovi.

Na kraju, razmotrimo njihove raspodele u 3 dimenzije sa istim parametrima u prostoru parametara. Jasna separacija je vidljiva, prvo za fibrozne astrocite (slika 6.27), a zatim za protoplazmatične (slika 6.28).

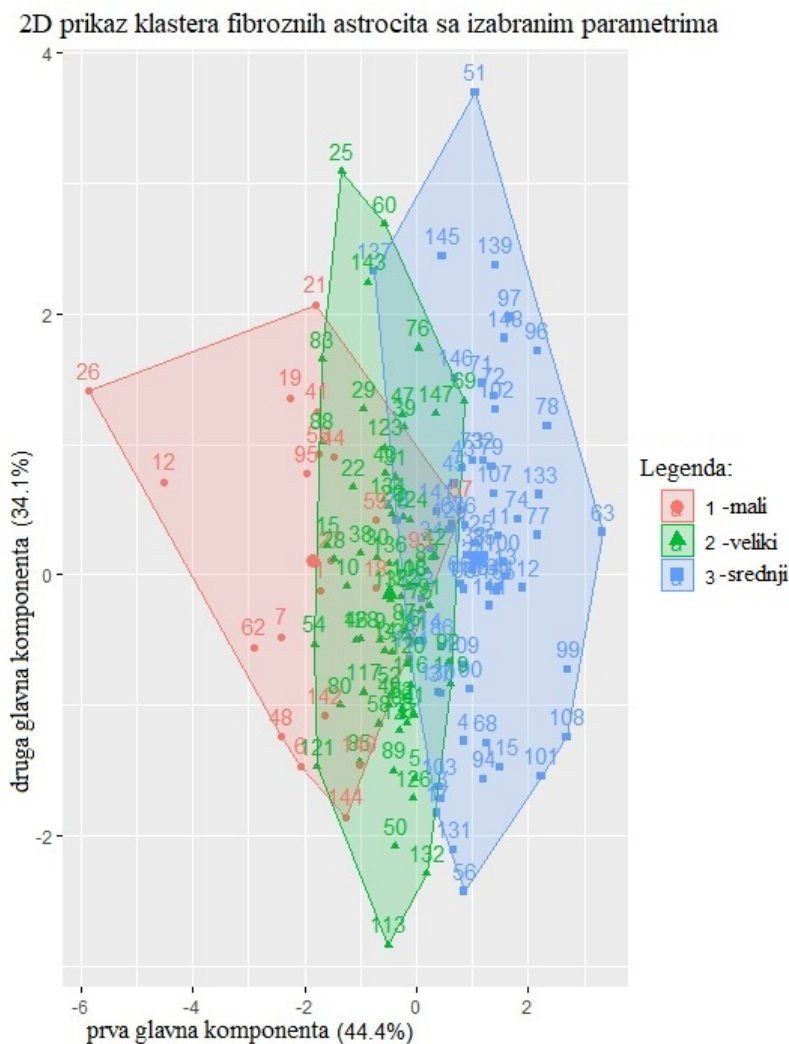


Slika 6.27: 3D distribucija i preklapanja klastera fibroznih astrocita



Slika 6.28: 3D distribucija i preklapanja klastera protoplazmatičnih astrocita

Na posletku, kako smo iz same analize zaključili da isto kvalitetan parametar može biti i $(D_{skel})_g$ u narednom delu napravićemo upravo poređenje sa analizom sa zamenjenim N sa $(D_{skel})_g$ (slika 6.29). Ispod se nalazi suplementarna tabela 6.19. Odnos unutrašnje i ukupne sume kvadrata je i dalje 76.2% za fibrozne astrocite. Zapažamo 63 slike fibroznih astrocita u grupi 1 (mali fibrozni astrociti) 21 sliku u grupi 2 (veliki fibrozni astrociti) i 64 slika u grupi 3 (srednji fibrozni astrociti) kao i ranije. Još jednom, brojevi na narednim prikazima (slike 6.29 i 6.30) su ponovo redni brojevi evaluiranih astrocita sa novim parametrom koji su smesteni u svoj klaster, a na osama procenti govore koji deo varijanse objašnjava ta glavna komponenta.



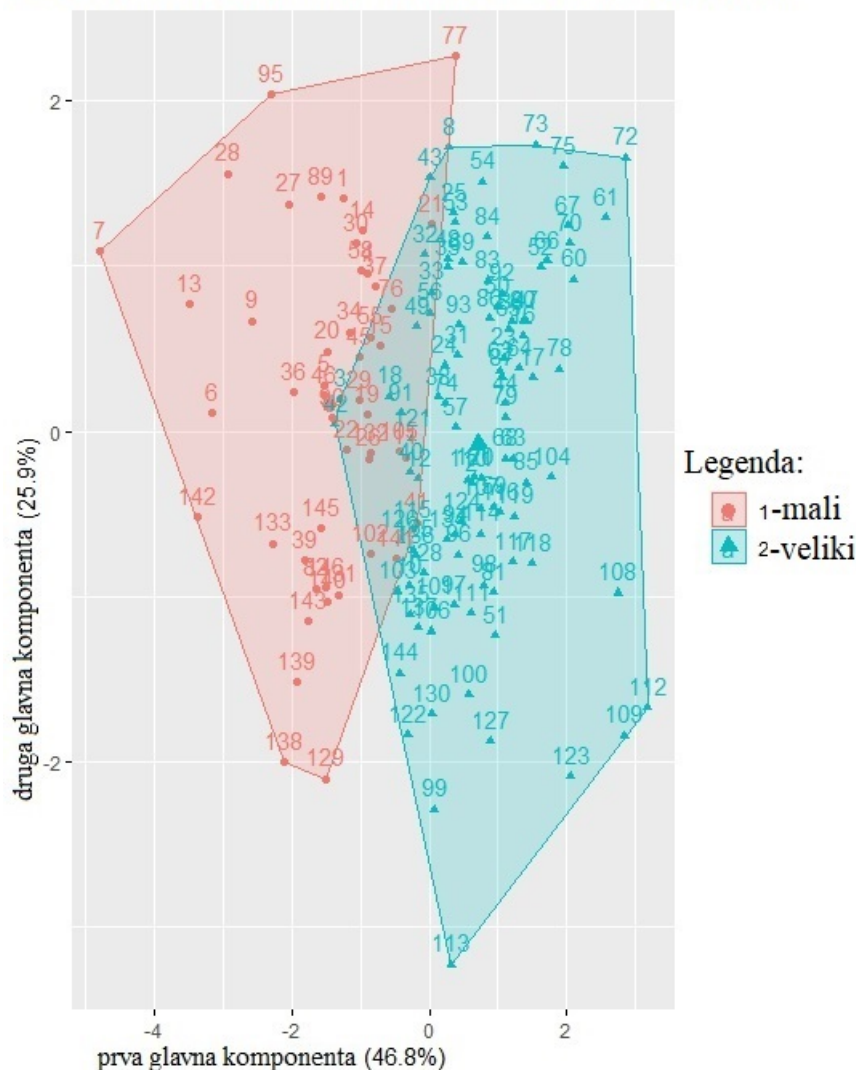
Slika 6.29: 2D distribucija i preklapanja klastera fibroznih astrocita sa parametrima As , P_{gf} , $(D_{skel})_g$ i Lg

Tabela 6.19: Tabela relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp. protoplazmatičnih astrocita

	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As_{pix2}	0.661	0	0.300	0.688
Pgf_{pix}	0.521	-0.443	-0.704	-0.190
$X_{Dskel,g}$	0	-0.772	0.576	-0.267
Lg	0.540	0.455	0.288	-0.647

Analogno i za protoplazmatične (slika 6.30) sa adekvatnom tabelom. Separacija je ponovo dovoljno dobra (ekvivalentnost deskriptivnosti između oba parametra se potvrđuje na biplotu 6.20) sa izabranim parametrima (tabela 6.20). Kod protoplazmatičnih astrocita odnos unutrašnje sume kvadrata sa ukupnom sumom kvadrata je takođe 64.2%. Sada postoji 48 slika protoplazmatičnih astrocita u grupi 1 (mali protoplazmatični astrociti) i 98 njih koji se identifikuju kao grupa 2 (veliki protoplazmatični astrociti).

2D prikaz klastera protoplazmatičnih astrocita sa izabranim parametrima

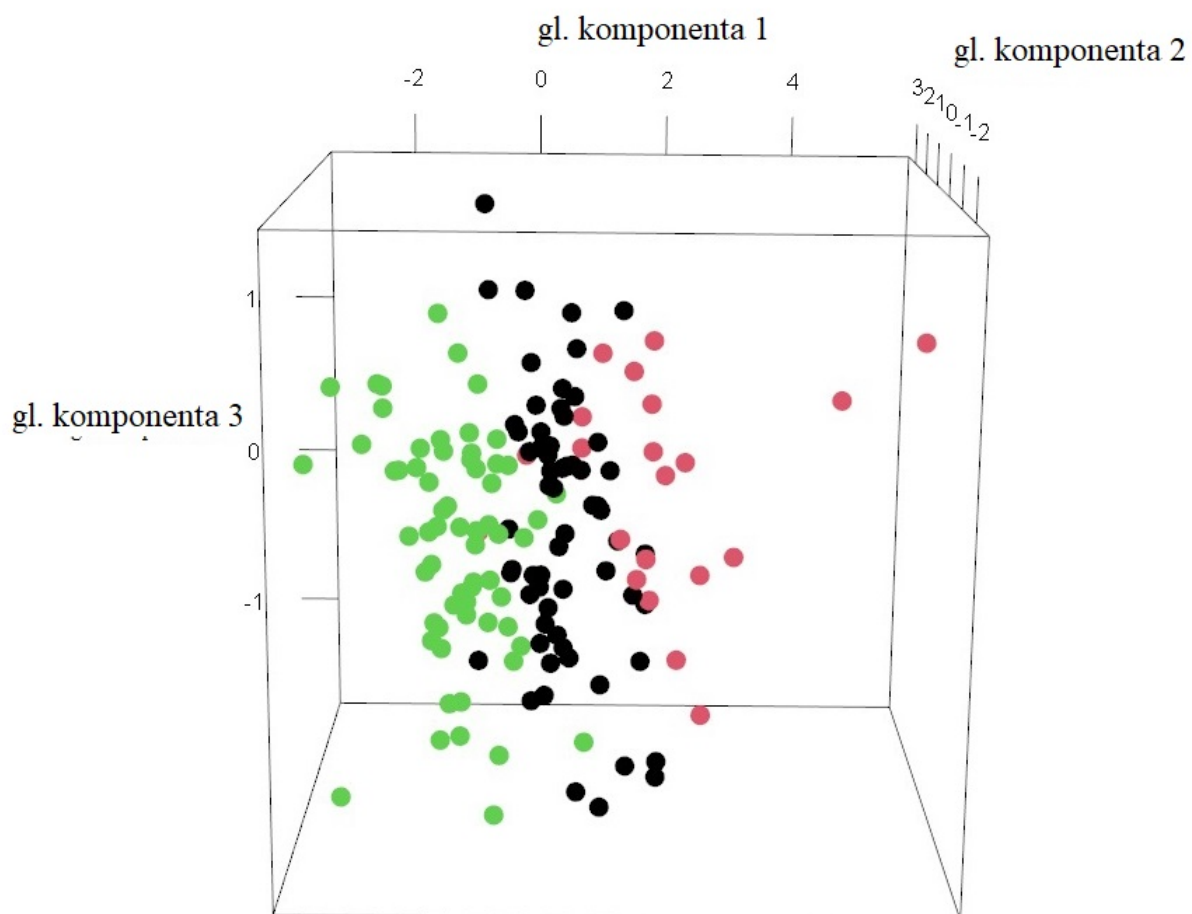


Slika 6.30: 2D distribucija i preklapanja klastera protoplazmatičnih astrocita sa parametrima As , P_{gf} , $(D_{skel})_g$ i L_g

Tabela 6.20: Tabela relacija 4 izabrana parametra sa gl. komp. protoplazmatičnih astrocita

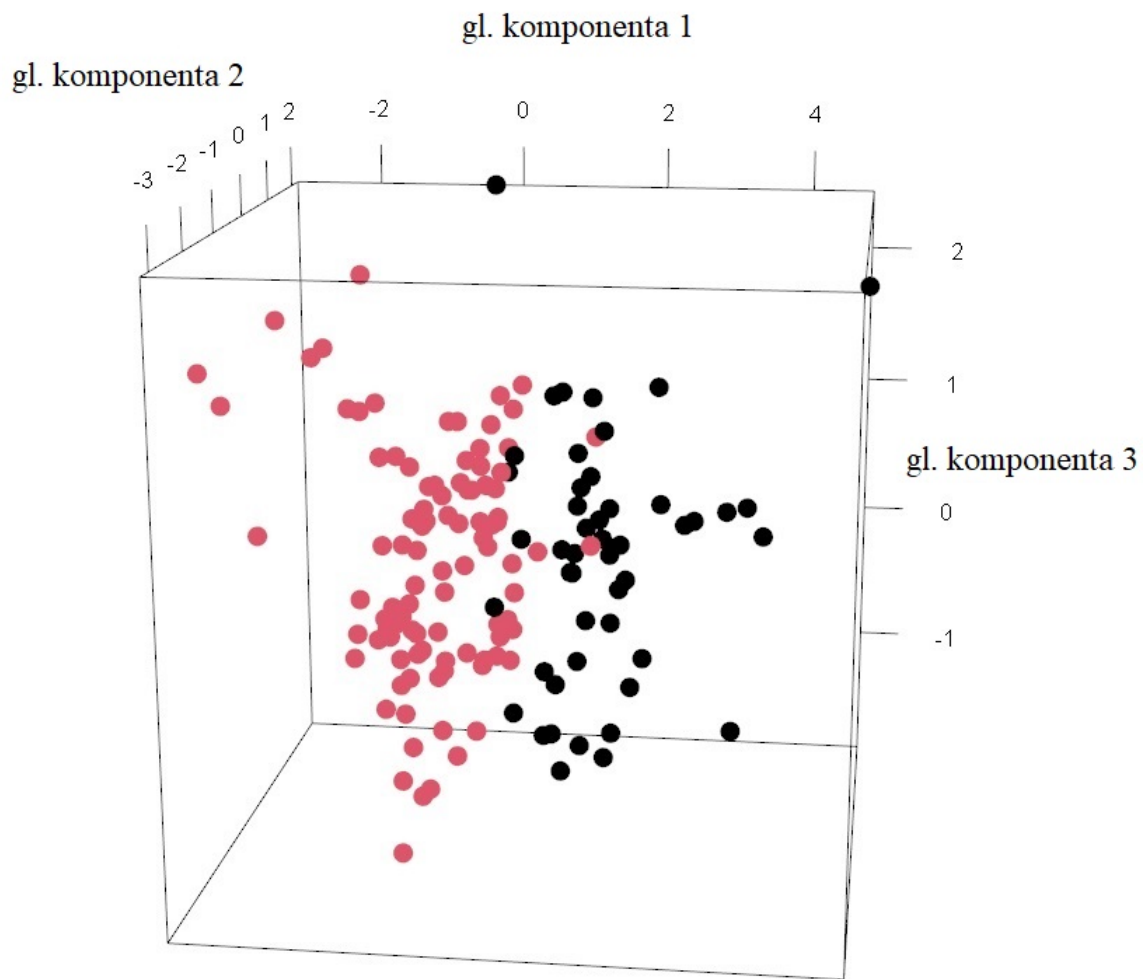
	gl. komp. 1	gl. komp. 2	gl. komp. 3	gl. komp. 4
As..pix2.	0.639	0.108	0.105	0.754
Pgf..pix.	0.588	0	0.550	-0.587
X.Dskel.g	0	0.947	-0.299	-0.116
Lg	0.495	-0.291	-0.773	-0.271

Na sledećoj slici fibrozni astrociti su 3D vizualizovani u prostoru parametara sa fraktalnim parametrom (slika 6.31).



Slika 6.31: 3D distribucija i preklapanja klastera fibroznih astrocita

Protoplazmatični astrociti u 3D okruženju sa zamenom sa fraktalnim parametrom dati su na sledećoj vizuelizaciji (slika 6.32).



Slika 6.32: 3D distribucija i preklapanja klastera protoplazmatičnih astrocita

6.4 Uticaj starosti i evaluacija astrocita GMJ-a primenom istih tehnika

Nešto drugačija perspektiva može se dobiti upotrebom *Pearson*-ovih koeficijenata koji bi ispitali povezanost parametra koji opisuju astrocit u zavisnosti od godina starosti individue. Ovim se ponovo razmatra informativnost parametara sa godinama starosti i procenjuje brzina promene u odnosu na godine. Sa tim očekujemo povećanu preciznost i transparentniju sliku (tabela 6.21 i 6.22).

Tabela 6.21: *Pearson*-ovi korelacioni koeficijenti između izdvojenih parametara i starosnih grupa

Parametar	Svi astrociti GMJ-a	Fibrozni	Protoplazmatični
A_s	-0.53***	-0.61**	-0.29
P_{gf}	-0.33*	-0.56**	-0.07
N	0.03	0.13	-0.09
L_g	-0.53***	-0.60**	-0.25
$(D_{skel})_g$	-0.41**	0.10	-0.75***

Tabela 6.22: *Pearson*-ovi korelacioni koeficijenti između izdvojenih parametara i godina ispitanika

Parametar	Svi astrociti GMJ-a	Fibrozni	Protoplazmatični
A_s	-0.74	-0.84*	-0.54
P_{gf}	-0.65	-0.75	-0.40
N	-0.21	-0.10	-0.32
L_g	-0.57	-0.68	-0.31
$(D_{skel})_g$	-0.52	0.10	-0.85*

Sa poređenjem tabela sa *Pearson*-ovim koeficijentima, pre svega tabele 6.21 sa računatim vrednostima kroz starosne grupe i drugoj 6.22 gde je račun sproveden po godinama starosti, jasno se vidi da se vrednosti minimalno razlikuju.

Na ukupnom uzorku, razlikuju se statističke značajnosti i broj preseka nastavaka. Odavde bi se moglo zaključiti da praćenje po starosnim grupama pokazuje da je u proseku minimalno povećan broj preseka nastavaka astrocita i stvara se neki vid uzlazne promene morfologije kod svih astrocita GMJ-a sa praćenjem po grupama. Sa druge strane, pri poređenju broja preseka nastavaka fibroznih i protoplazmatičnih astrocita isti je opao za oko 20%. Samo kod fibroznih astrocita razlikuju se statističke značajnosti i upravo N parametar, koji opisuje maksimalni broj nastavaka. Moguće je upravo da pozitivan trend potiče od fibroznih astrocita i njihovih nastavaka koji granično održavaju funkcionalnost. Kako kod N parametra ne postoji statistička značajnost, dalja diskusija bi se eventualno vodila kroz detaljnija istraživanja u ovom pravcu. Kod svih parametara protoplazmatičnih astrocita naglašava se statistička značajnost po starosnim grupama i primećuju se nešto intenzivnije vrednosti koeficijenata uz manju, ali i dalje prisutnu statističku značajnost prilikom praćenja po godinama starosti ispitanika.

Ovo može da pokaže da praćenje po grupama daje uočljiviju statističku značajnost parametara, a zasebno (posmatrajući fibrozne i protoplazmatične) po godinama starosti definitivno je u istom maniru sprovedeno sa potvrdom istog trenda.

Posmatrane morfološke osobine u tabeli 6.23 ispod su istaknute sa naslovima morfološke kategorije. Razmatramo, drugu grupu maturacije (DGM) i drugu grupu starenja (DGS) notirane u tabeli 6.23.

Tabela 6.23: Pregled 15 parametara kroz dve starosne grupe. Statistička značajnost je dobijena poređenjem obe starosne grupe.

Parametar	Fibrozni			Protoplazmatični		
	DGM	DGS	p	DGM	DGS	p
Veličina						
$A_s (\times 10^3 \text{ pix}^2)$	9.8 ± 0.7	7.5 ± 0.4	<0.01	8.0 ± 0.4	6.6 ± 0.3	<0.01
$A_{gf} (\times 10^5 \text{ pix}^2)$	6.5 ± 0.3	5.2 ± 0.3	<0.01	6.0 ± 0.4	5.3 ± 0.4	0.2
$A_{rf} (\times 10^5 \text{ pix}^2)$	6.4 ± 0.3	5.2 ± 0.3	<0.01	6.0 ± 0.4	5.3 ± 0.4	0.207
$(D_{bin})_s$	1.719 ± 0.009	1.747 ± 0.009	0.03	1.74 ± 0.01	1.753 ± 0.009	0.23
$(D_{bin})_g$	1.427 ± 0.004	1.432 ± 0.006	0.473	1.427 ± 0.005	1.430 ± 0.005	0.627
$(D_{bin})_{gf}$	1.816 ± 0.006	1.820 ± 0.007	0.696	1.825 ± 0.007	1.820 ± 0.006	0.589
Oblik						
$P_{gf} (\times 10^3 \text{ pix})$	3.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1	<0.01	2.5 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.086
$M_{gf} (\text{pix})$	0.71 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.694	0.726 ± 0.008	0.717 ± 0.009	0.461
$(D_{out})_{gf}$	1.061 ± 0.003	1.066 ± 0.007	0.202	1.063 ± 0.003	1.063 ± 0.003	0.957
Kompleksnost						
N	6.9 ± 0.2	7.4 ± 0.2	0.107	7.1 ± 0.2	6.9 ± 0.2	0.296
N_m	14.2 ± 0.4	15.1 ± 0.5	0.146	14.6 ± 0.5	13.9 ± 0.4	0.24
$(D_{skel})_g$	1.167 ± 0.004	1.176 ± 0.006	0.245	1.177 ± 0.004	1.097 ± 0.004	<0.001
Homogenost						
L_{gs}	0.134 ± 0.004	0.133 ± 0.005	0.799	0.121 ± 0.005	0.108 ± 0.003	0.027
L_g	0.67 ± 0.01	0.61 ± 0.01	<0.001	0.607 ± 0.007	0.589 ± 0.009	0.104
L_{gf}	0.115 ± 0.005	0.108 ± 0.003	0.183	0.133 ± 0.005	0.136 ± 0.005	0.73

Statistička značajnost - $p < 0.05$

Značajnije (više) srednje vrednosti kod astrocita u DGM za oba tipa parametara su dobijene samo u slučaju euklidskih u grupi Veličina. Morfološke razlike primećuju se kod starosnih grupa, tj. kod 6 parametara fibroznih astrocita (A_s , A_{gf} , A_{rf} , $(D_{bin})_s$, P_{gf} i L_g) i kod 3 parametra protoplazmatičnih (A_s , $(D_{skel})_g$ i L_{gs}) astrocita.

7 Mesto fraktalne geometrije u opisu prirode

Konceptualna ideja sa kojom smo se vodili u različitim navratima u procesima razmišljanja o ovoj tezi i prvim segmentalnim njenim realizacijama, dovela nas do shvatanja, elaboriranja i razumevanja ogromne prisutnosti kompleksnosti i sveprisutne simetrije u fizičkim procesima i pojavama koja ih prožima. Ista ta simetrija je veoma transparentna za fizičara u realnosti, bilo da je ta realnost neživa priroda ili biološki organizmi. Fraktalna geometrija koju koristimo u ovoj tezi kao posredno sredstvo za opis nepravilnih morfoloških obrazaca neurona i astrocita predstavlja izuzetan matematički kuriozitet preko kog se opisuje ista funkcionalna topologija pomoću koje se ostvaruje efikasna biološka svrsishodnost. U nedostatku pravog okvira, fraktali se pokazuju kao dovoljno vešt alat kojim se ovo zadovoljavajuće dobro može opisati. Međutim, ponavljajući obrasci u prirodi nisu novina (pogotovu u kontekstu posmatranja statističkih sistema bez prisustva dinamike) i osim matematičkog kurioziteta, koji se uvek može ekstrapolirati i usložnjavati, pokušajmo u narednim pasusima da fraktalnu geometriju uklopimo u fizički funkcionalan opis i potražimo vezu sa biološkim kontekstom.

Prvo skretanje pažnje na nekompletnost prisutnosti simetrije kroz njen opis, odnosno na njeno spontano narušenje, ciljano, se počelo opisivati sredinom 20. veka. Iako je na fundamentalnijim nivoima par decenija ranije bilo naznaka mogućeg identifikovanja u fizici čvrstog stanja, *Philip W. Anderson* [59] javno stavlja u fokus spontano narušenje simetrije koje se danas prostire od fundamentalne fizike elementarnih čestica, preko hemije i biologije do makroskopskih struktura sa istim obrascima ponašanja. Ova pojava je od izuzetne važnosti za živi svet na planeti.

Napravimo, radi potpunijeg pregleda, jednu manju digresiju na samom kraju ove disertacije.

U 19. veku. *Pierre Curie* obratio je pažnju na prisutnu asimetriju u prirodi zaključujući da bi se „efekti asimetrije morali bi se pronaći u njihovim uzrocima, a asimetrija je ono što stvara tu pojavu”. Ta ista bazična simetrija mora biti vidljiva kroz osnovnu matematičku apstrakciju tj. jednačine koje generalizuju principe koji vladaju u prirodi. Kaže se da spontano narušenje simetrije možemo da očekujemo kada fundamentalne jednačine fizičkog sistema imaju simetriju koja nije manifestna u svom osnovnom stanju, stanju minimalne energije [60]. Možemo reći da, ako neki posmatrani fizički sistem u stanju minimalne energije, tj. u svom osnovnom stanju, poseduje manju simetriju od sistema posle faznog prelaza drugog reda po *Paul Ernfest*-ovoj klasifikaciji 1933. faznih prelaza [61, 62], događa se spontano narušenje simetrije. Takvih primera trenutno prepoznajemo više, a sam princip je nešto što zaslužuje pažnju. Prođimo u narednim pasusima hronološki kroz evidentne primere.

Mikrosopski model u fizici feromagnetizma i elementarnih magnetona bio je potreban 1922. i predstavio ga je *Walter H. Schottky* kako bi objasnio paralelno uređivanje magnetona na niskim temperaturama. U okviru stare *Bohr-Sommerfeld* kvantne mehanike *Schottky* je tvrdio da objašnjava visoke vrednosti *Curie*-jevih temperatura određenih feromagnetona [63]. Dalje je *Ernst Ising* formulisao novi model feromagnetona, dok *Werner Heisenberg* i *Schrödinger* simultano daju nove koncepte o spinu čestica koji stupaju na scenu 1928. *Wolfgang Pauli* 1930. reformuliše *Ising*-ov model, a jedanaest godina kasnije, 1941. *Hendrik Kramers* i *Gregory Wannier* pokazuju da zaista postoji fazni prelaz drugog reda kod feromagnetona u funkciji temperature. Ovde je $SO(3)$ grupa simetrije spinova promenom

temperature narušena na $SO(2)$ sada kolimisanu grupu, jer je materijal prisvojio svojstva feromagneta.

Istorijski gledano, prva upotreba termina „spontano narušenje simetrije” potekla je od *Yoichiro Nambu*-a 1921. praveći analogiju sa danas poznatom pojavom kao superprovodnost, koja je kasnije tako nazvana. Superprovodnost je 1950. opisana po *Vitaly Ginzburg*-u i *Lev Landau* [64] kao spontano narušenje gradijentne simetrije (engl. *gauge symmetry*) svojstvene, unitarne $U(1)$ grupe simetrije elektromagnetizma. Ovo je dovelo do kreacije *Bardeen, Cooper, Schrieffer*, skraćeno BCS teorije, u opisu interakcije elektrona, fotona pa i fonona (kvanti zvuka) 1957. godine [65, 66]. Samo 2 godine kasnije, 1959. *Lev Gor'kov* pokazuje da je makroskopska teorija *Ginzburg*-a i *Landau*-a posledica mikroskopske BCS teorije [67]. Naknadno, *Yoichiro Nambu* i *Giovanni Jona-Lasino* primenjuju *Ginzburg-Landau* teoriju i koncept spontanog narušenja simetrije u teoriji polja [68].

Nekoliko godina kasnije, *Anderson*-ovo prezentovanje izuzetka [69] na *Goldstone*-ovu teoremu (*Jeffrey Goldstone*) kod superprovodnika, po kojoj ispod određene frekvencije plazme elektromagnetni talasi ne propagiraju u nenaelektrisanom gasu, demonstrira da se foton tada smatra kao masivan. On zaključuje da sličan proces u fizici elementernih čestica može da doprinese masi *Yang-Mills*-ovih gejdž bozona (čestice sa celobrojnim spinom). Sa ovako emancipiranim faznim prelazom tj. spontanom narušenjem simetrije u ranim fazama Svemira ovo je 1962. dovelo do stvaranja *Higgs*-ovog danas BEH (*Brout, Englert, Higgs*) mehanizma [70–74] koji daje masu gradijentnim bozonima dok foton ostaje bezmasen. Finalne korake su *Steven Weinberg* 1967. i *Abdus Salam* [75] nezavisno realizovali na novoj gradijentnoj simetriji za elektroslabu interakciju standardnog modela elementarnih čestica. *Sheldon Glashow* je ovo generalizovao, a ceo model je danas poznat kao *Glashow-Weinberg-Salam*, kod bozona. Čestice sa polucelim spinom, fermioni, dobijaju masu na sličan način. Sada se narušila simetrija unitarnih grupa čestica $SU(3) \times SU(2) \times U(1)$ gde su čestice dobile masu, a foton ostao bezmasen. Ovim su se stvorile čestice koje poseduju masu i foton, prenosnik elektromagnetne interakcije koji nema masu.

Abdus Salam, pakistanski naučnik i nobelovac daje transparentan primer spontanog narušenja simetrije kroz poznatu svoju analogiju. Ako na večeri gost za okruglim kružnim stolom posegne za jednom od dve salvete servirane sa svake strane, svi ostali gosti će biti naterani da postupe istim odabirom i niko više neće imati izbor da bira između leve i desne salvete. Time je simetrija narušena.

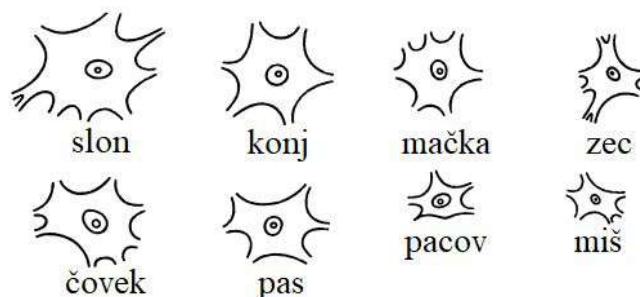
Jos jedan primer bitnog spontanog narušenja simetrije u prirodi je primer homohiralnosti koji se sa hemijskog nivoa reflektuje na biohemiju i život na Zemlji [76, 77]. Osnova ovoga je inicijalno stanje velikih količina molekula iste hiralnosti koji su posle dužeg stanja (aproksimativno period vremena reda 10^4 godina) započeli interakciju i termodinamički gledano, vezivanje tih enantiomera iste hiralnosti u odgovarajuće strukture je nastupilo. To se najverovatnije ogleda kroz finu intermedijalnu igru između termodinamičkih potencijala koji ovde imaju veliku ulogu [77, 78, 80]. U potrazi za reprezentacijom entiteta koji je pretrpeo fazni prelaz drugog reda termodinamički potencijali igraju bitnu ulogu i predstavljaju formu skalarnog reprezentovanja termodinamičkog stanja sistema. Fundamentalni aspekt porekla biološke homohiralnosti kroz narušenje parnosti elektroslabe interakcije bi mogao da se dovede u vezu i takvo pitanje je ponovo pokrenuto 2019. godine [76].

Kod bioloških sistema, u zavisnosti od stepena uočene simetrije, ta simetrija zna da bude više ili manje narušena, ali naznake sličnosti sa hemijskim mehanizmima hiralnosti mogu ih dovesti na sličan nivo. Asimetrična deoba ćelija doprinosi ćelijskoj homeostazi i odstupanje od ovakvog deljenja doprinosi simetričnoj deobi bez regulacionih mehanizama, tumorogenezi i narušavanju polarnosti ćelija [81].

Ovo zaista danas dolazi u naučni fokus [82] i zahteva značajnije naučno razumevanje u shvatanju kako prvenstveno živa, pa i neživa priroda funkcionišu u ovom kontekstu. Jedno takvo skretanje pažnje se dogodilo u decenijama posle dovođenja u fokus genske ekspresije i ćelijskog signaliranja [82]. U centru je bila ćelijska mitozna i posledice narušenja polarnosti. U tom slučaju, razmatran je njihov uticaj na ćelijsku morfogenezu, diferencijaciju u vremenu i nametanju svojstvenih embionalnih osa. Ovo se smatra da su privremeni lokalni signali ili šum, koji prerasta u stabilno asimetrično stanje na nivou celog sistema [82]. Tome je moguće da prethode tragovi iz lokalne okoline ili istorije sistema. Primeri su gradijenti u distribuciji signala koji mogu da odluče o budućnosti čitave familije ćelija.

D'Arcy Wentworth Thompson, škotski biolog i matematičar u svojoj knjizi „*On Growth and Form*” 1917. do proširene i unapređene forme knjige 2010. od ljudi poštovaoca njegovog opusa, navodi: „Koliko god da je matematika nedovoljna za opis, fizika za objašnjenje, oblike materijala tela još uvek ne umemo da predvidimo.” [83]. Pritom morfologija bića i stvari u prirodi koja se manifestuje u živoj pa i u objektima u neživoj prirodi [83] opisuje i predstavlja nešto kroz šta se ogleda aktuelno morfološko znanje o živom svetu. Sve ovo danas neodoljivo aludira da je možda vrhunski produkt spontanog narušenja simetrije po sredi, kako bi se funkcija i život uspešno realizovali u datoj topologiji prostor-vremena.

I jos mnogo ranije, 1942. godine, *Thompson* se dotiče morfologije neurona, na istoj skali uveličanja, kod različitih vrsta motornih ćelija gangliona sisara i to vratnih pršljanova [83]. Zapažamo da su sve ćelije 7.1 istog reda veličine i po linearnearnoj dimenziji, od miša do slona, aproksimativno duplo veće sa sličnom morfologijom.



Slika 7.1: Some motornih neurona gangliona u PNS-u kičmenjaka u nivou vratnih pršljenova [83]

Upravo ova morfologija, lokacijski nešto iznad u produženoj moždini korespondira sa morfologijom opisanom u ovoj tezi na precizniji način.

Odavde izvlačimo zaključak da spontano narušenje simetrije (reprezentovane sa nekom grupom simetrije u prirodi) dovodi do narušenja iste (sa adekvatnom termodinamičkom promenom) u bilo kojoj posmatranoj oblasti. Sve ovo je formalno stavilo u fokus fizičarima novi princip koji se realizuje u prirodi i čime je zadovoljavajuća simetrija realizovana.

Fraktalna geometrija prisutna je u svim strukturama u prirodi tako da i Svemir, koji danas smatramo homogenim na veoma velikim skalama, trpi promenu makro organizacije strukture pri posmatranju sitnijih delova na relevantnu, fraktalnu, prostorno nehomogenu, lokalnu simetriju [84].

Ovo se prvenstveno ogleda u multifraktalnoj distribuciji mase, što je prirodna generalizacija fraktalnog skupa u domenu multidimenzionalnosti [84]. Kosmička mreža nalik ovoj je upravo primer multifraktalne distribucije mase i predstavlja grub, nedovoljno precizan model trenutne kosmičke strukture [84]. Naknadno uvođenje paraboličnog multifraktalnog sistema i negativne fraktalne dimenzije dodatno usložnjava situaciju [85]. Sličnosti svakako postoje i postavlja se pitanje i istovetnosti pozadinskih principa, dok fraktalna geometrija nam nudi dobar aparat za opis struktura sa značajnom količinom sličnosti [79].

Sa druge strane, primena fraktalne simetrije u opisu nervnog tkiva sa grupom simetrije koja se ogleda u promeni skale, ispostavlja se da može da se upotrebljava dovoljno precizno na ćelijskom nivou pri opisu upravo fraktalnom geometrijom. Ovde takođe simetrija nije idealna, ali je dovoljno dobra i u nekom budućem radu nadamo se opisu kompletne moždane strukture geometrijskim ili možda baš fraktalnim parametrima. Ostaje otvoreno pitanje da li je razumno pretpostaviti da možda narušenje prostorne distribucije simetrije ostavlja mogućnost za primenu fraktalne geometrije proistekle iz sličnosti objekata koje opisujemo na datoj skali.

Ovom disertacijom se možda može skrenuti pažnja na suptilno spontano narušenje simetrije ili matematičko praćenje suptilnih zakona koji realizuju višu termodinamičku simetriju koja ne samo da je fundamentalna za organizme nego i za diverzitet u postavljenim okvirima matematike koja se primenjuje da bi se opisao svet koji nas okružuje.

S obzirom da je vremenska invarijantnost duboko povezana sa zakonom održanja energije, ostavićemo po strani moguće spontano narušenje simetrije kao fundamentalni princip možda prisutan ovde i razmotriti još jednu plauzibilnu paradigmu [86]. Renormalizacija u kvantnoj teoriji polja [87] se koristi kada postoji zavisnost od posmatranih skala. Ovo se upotrebljava čak i kada je inicijalna teorija invarijantna na skaliranje. Simetrija fraktala je invarijantna na skaliranje. Kod fraktala bi teorijski analogni postupak renormalizacije (sitniji odabir box-ova pri korišćenju *box-counting* metode) mogao da se primeni da bi se postigla veća preciznost. Koren ovoga jesu zakoni održanja koji su oslikani u *Noether*-inoj teoremi (*Emmy Noether*) [88] iz koje vidimo da iz date simetrije proističu zakoni održanja. Analogno, kako bi se oni održali realizuju se dovoljno simetrični objekti u prirodi pa i u živom svetu. Time možda primećujemo fundament u prirodi u vidu fraktalne geometrije preko manifestacije spregnutog prostornog narušenja simetrije takvog da su zakoni održanja očuvani, a funkcionalnost simetrije u velikoj meri zadržana na nivou osnovnih konstituenata.

Na kraju, ako redukcionistički želimo da pristupimo ovom problemu svakako neki fundamentalni postulati bi morali da pokrivaju oblasti simetrije, dimenzionalnosti pa i baš ovako datih konstanti koje se reflektuju kroz život i okruženje koje nam je dato.

8 Zaključak

Kako je ranije bilo naglašeno, ova disertacija predstavlja inovaciju i buduću perspektivu, a delom i automatizaciju tehnike koja bi mogla da se koristi pri evaluaciji slika neurona, odnosno astrocita i njihove morfologije u okviru celog mozga. Astrociti opisani ovde nisu detaljno ispitivani ranije sa sličnim analizama i na ovom mestu, AGK i podela na klustere je uvedena poštujući principe uspostavljene za slike neurona. Razmatran je region GMJ-a, a generalna ideja je proširenje na sve delove CNS-a i načelan pokušaj unifikacije procedure, pa i redukcija upotrebljenih parametara u okviru tehnike na najinformativnije.

U ovoj tezi realizovana je nova tehnika obrade numeričkih podataka dobijenih obradom slika neurona (potpoglavljje 6.1) i astrocita (potpoglavljje 6.3) i pomoću euklidskih i fraktalnih parametara (poglavljje 5) i modernih matematičkih alata (poglavljje 4) njihova morfologija je opisana. Dobijene su nove oblasti kvantifikacije vrednosti parametara koji su bili upotrebljavani i moguća je ekstrapolacija iste na različite regione mozga čoveka. Očekivani rezultat ovakvog poduhvata bi bila transparentnija morfologija u različitim delovima mozga. U prvoj iteraciji i upotrebi tehnike slike su realizovane iz regiona produžene moždine, GMJ-a, CNS-a, relevantnog za motoriku PNS-a. Unapređena je podela potekla iz korišćenih parametara sa primenom nove preciznije metodologije. Dobijene su nove oblasti sa izdvojenim parametrima i za neurone i za astrocite na osnovu korišćenog materijala. Posebno, evaluirane su oblasti koje sugerišu separaciju i fibroznih astrocita i protoplazmatičnih astrocita na preciznije morfološke celine. Dalje, materijal je isfiltriran u zavisnosti od starosti pojedinaca i time je praćena morfologija u zavisnosti od godina (potpoglavljje 6.2 i 6.4).

Osnovna ideja iza ovakve analize definitivno dovodi 2D analizu pomoću parametara na nekoj slici do krajnjih granica pristupačnosti na nivou dvodimenzionalne slike. Sledeći korak u analizi slike nekog tkiva (ne nužno nervnog) bi svakako predstavljao prekretnicu pomoću npr. mapiranja slika magnetne rezonance visoke rezolucije na nivou elementarnih konstituenata. Jakim magnetima bi postigli željenu rezoluciju na ćelijskom nivou pri različitim potencijalnim stanjima pojedinca. Ovo bi otvorilo novu dimenziju otkrivanja patoloških promena. Takva analiza mogla da se razmatra na živim pojedincima pa i u realnom vremenu (iako treba imati u vidu da tada napuštamo domen slike) čime bi dobili mapiranje svih fizioloških procesa i elementarno razumeli aktuelnu patologiju.

U budućnosti se nadamo ponovnim realizacijama iste tehnike u drugim delovima mozga i akomodaciji korišćenog skupa parametara. Smisao primene fraktalne geometrije u opisu u prirodi je u finalnim delovima ove disertacije revidiran i njeno mesto u sklopu poznatih fizičkih zakona ostaje nedovoljno istraženo pitanje čijem se odgovoru nadamo u bliskoj budućnosti.

9 Prilozi

9.1 Prilog A - Analiza glavnih komponenata iz drugog ugla

Na ovom mestu ćemo sa više detalja opisati jednu od dve centralne tehnike predstavljene u ovoj tezi. Analiza glavnih komponenata ili kraće AGK je jedna od njih. Danas se ova multivarijantna tehnika uobičajila pri analizi velikog skupa podataka i prisutna je u različitim granama nauke i industrije pri optimizaciji. U ovom prilogu, nastojaće se da se matematički detalji u manjoj meri prošire, ali da se isto tako održe u minimalnoj formi prihvatljivoj samo radi razjašnjenja naučne matematičke pozadine.

AGK čini prost neparаметarski metod koji se koristi za izvlačenje relevantne informacije iz kompleksnog tabelarnog, u startu zbunjujućeg, skupa podataka. Ovo će dovesti do redukcije početnog skupa podataka sa mnogo varijabli na skup manjeg broja relevantnih blisko povezanih varijabli u poređenju sa početnim skupom [45], za koje se nadamo da će nam otkriti sakrivenu prostu strukturu koja leži ispod.

U tekstu teze je napomenuto da je AGK metod koji je matematički ekvivalentan tehnici dekompozicije matrice na singularne vrednosti. Zbog složenosti ove tehnike izbeći ćemo izlaganje i pravljenje paralele sa njom, ali imati u vidu tu korisnu i bitnu činjenicu, za nekoga sa matematičkom pozadinom.

Generalno, sa predstavljanim kompleksnim eksperimentalnim problemom u kome se relativno lako može doći do rezultata merenja, problem je zaključiti kako izdvojiti šta predstavlja informativni pokazatelj koji bi valjalo pratiti (tj. pokazatelj koji bi oslikavao dinamiku sistema) a na šta ne treba suviše obraćati pažnju jer eksperimentatora opterećuje. Ovo predstavlja fundamentalni problem ili prepreku u empirijskoj nauci.

Kako je pisac teze po svojoj osnovnoj afilijaciji fizičar izabraćemo jedan prost, ali i značajno kompleksan sistem koji se sastoji iz loptice (odnosno kuglice) povezane oprugom, bez mase i trenja (radi idealizacije) i mrdnuti ga malo van ravnoteže, čime će on započeti svoje beskrajno drmusanje oko svog ravnotežnog položaja.

Ako posedujemo opremu ovaj trodimenzionalan (3D) sistem je moguće stacionarno snimati sa tri kamere i meriti poziciju loptice u datom trenutku čime skupljamo i pravimo skup slika (2D projekcija) loptice u datom trenutku iz ugla svake kamere. Naravno, početno se pretpostavlja da nemamo nikakve informacije o sistemu, pa tako i da ne znamo da idealno postavimo tri ortogonalne ose. Pritom, mi ne znamo koja od kamera bi trebalo da najbolje reflektuje dinamiku našeg sistema i isto tako potpuno je očigledno da ovakvim sakupljanjem dobijamo i puno nepotrebnih slika kako ne znamo da napravimo projekciju na ortogonalne ose kako bi ih uporedili. Ovo hvatanje slika traje nekoliko minuta.

Prvo pitanje koje nam se nameće je kako da odredimo bazis ili referentni sistem u kome možemo pouzdano da opišemo kretanje kuglice duž neke ose. Ovo jeste osnovna pretpostavka AGK tj. kako izraziti najtrivijalnije basis (u krajnjem slučaju ovo će nam odrediti koja dinamika je bitna, koja ne-

potrebna, a koja šum) u kome možemo da ponovo izrazimo promenu promenljivih na slikama tako da je za nas pregledniji bez puno gubljenja informacija o sistemu.

Iz naših slika mi dobijamo po neidealne parove (u pogledu ortogonalnosti) koji određuju koordinate kuglice na slici u datom trenutku. Pošto se sistem nalazi u trodimenzionalnom svetu i snima sa tri različita ne savršeno ortogonalna mesta mi dobijamo po sliku loptice u datom trenutku. U linearnoj algebri na kojoj se ova analiza bazira potrebno je izraziti početni apstraktni idealni ortogonalni bazis 6D vektora preko potprostora projekcija u kojima merimo parametre tj. u kome su neidealno ortogonalne kamere A , B i C uhvatile odgovarajuću 2D projekciju. Ispod (9.4 jednačina) je dat generalni oblik jednog takvog vektora.

$$\vec{X} = \begin{pmatrix} x_A \\ y_A \\ x_B \\ y_B \\ x_C \\ y_C \end{pmatrix} \quad (9.4)$$

Ovakvih vektora \vec{X} , za oko desetak minuta „hvatanja” slika prosečnom frekvencijom snimanja danas, postoji više desetina hiljada i to je osnova velikog skupa podataka koji analiziramo.

Treba imati u vidu da naš skup podataka lako uopštavamo na d -dimenzionalan skup u kome slično smatramo da postoji neki ortogonalan bazis koji može imati puno različitih reprezentacija. Ovde samo je potrebno imati u vidu da svaki bazis reflektuje metod koji upražnjavamo kako bismo sakupili podatke, ali ne menja finalni zaključak.

Ako prihvatimo najprostiji bazis (koji ovde predstavljamo horizontalnom notacijom) sa vektorima $(0, 1)$ i $(1, 0)$ u 2D potprostorima, naš neki proizvoljan vektor predstavlja linearnu kombinaciju datih vektora bazisa iz potprostora sa d komponentata (9.5 jednačina), a pored je data i d -dimenzionalna jedinična matrica:

$$\vec{A} = \begin{pmatrix} z_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ z_d \end{pmatrix}, I = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdot & \dots & 1 \end{pmatrix}_{d \times d} \quad (9.5)$$

gde je svaki red u matrici ortogonalan i normalan (ortonormalan) bazisni vektor sa d komponenti. Naši podatci se slično u ovakvom bazisu mogu zapisati kao linearna kombinacija \vec{I}_d jediničnih vektora.

Ovde dolazimo do prve bitne pretpostavke AGK - linearnost. Sa linearnošću dobijamo mogućnost da stare bazisne vektore izrazimo kao linearnu kombinaciju novih bazisnih vektora.

Ako uzmemo da je \mathbf{X} originalan skup podataka, gde je svaka kolona u ovoj jako izduženoj matrici trenutak u vremenu sa vrednostima naših parametara u tom trenutku i svaka vrsta nova observacija,

imamo da je $m=6$ (koordinate u 6D prostoru u trenutku) a n vrednost od više desetina hiljada, pa možemo da potražimo njihov oblik u novom bazu. Sada nam nije bitna nesavršenost našeg sistema već samo kako da izvučemo korisnu informaciju iz priloženog skupa podataka.

Postavlja se pitanje kako da uporedimo različite opservacije u AGK. Prva ideja je odstupanje od srednje vrednosti parametra. Takođe, merenje šuma u našem skupu podataka potrebno je svesti na najniže moguće apsolutne vrednosti odstupanja. Ovde je poželjno imati u vidu da apsolutna skala za šum ne postoji i da je najpametnije da merimo relativni odnos osnovnog merenog signala i intenziteta šuma, tj. količnik njihovih varijansi (jednačina 9.6).

$$OSS = \frac{\sigma_{signal}^2}{\sigma_{sum}^2} \quad (9.6)$$

Veliki $OSS (\gg 1)$ ukazuje na visoko precizno merenje, dok mali OSS predstavlja podatke intenzivno zagađene šumom. Drugim rečima, signal koji je opisan tačkom na dijagramu, ako previše odstupa od prave linije koja opisuje evoluciju kretanja sistema, pokazuje da je sklon nekom neuobičajenom kretanju i ima veliku varijansu i koji sa nekom neregularnošću odstupa dosta od prosečnog ponašanja. Tako zapažamo da podaci u AGK koji trpe neko neobično ponašanje zaslužuju pažnju i dodatan fokus.

Sve ovo nam sugeriše da bazu koji zahtevamo (sa upadljivom dinamikom) je bazu duž najveće varijanse (u datom vizuelno eliptično-linearnom skupu podataka) duž dugačke ose elipse koja omeđava podatke koji opisuju kretanje i ima najveće vrednosti OSS . Ovde dolazimo do druge bitne pretpostavke AGK koja sugeriše bitne detalje našeg izabranog skupa - varijanse. Makimiziranjem varijanse dobijamo uputstvo da uz adekvatnu rotaciju početnog koordinatnog sistema možemo da pređemo u bazu u kome je varijansa transparentnija i data sa diskretnim opadajićim gradijentom po koordinatama.

U novom referentnom sistemu, \mathbf{Y} je nova matrica istih dimenzija $m \times n$ koja opisuje isti sistem u novom bazu, gde je ova matrica dobijena matričnom transformacijom prikazanom (jednačina 9.7) ispod.

$$\mathbf{A}\mathbf{X} = \mathbf{Y} \quad (9.7)$$

Tako iz novog referentnog sistema sa glavnim komponentama (koje u njemu naglašavaju varijansu) kreiramo matricu \mathbf{A} kojom ćemo da prevedemo naš skup podataka u novi skup u kome se jasnije vide relevantne veličine i maksimizuje se varijansa, odnosno odstupanja od srednjih vrednosti u našem skupu podataka!

Prepoznavajući zaključujemo da je svaki koeficijent matrice \mathbf{Y} , y_i , skalarni proizvod reda matrice \mathbf{A} i kolone sa koeficijentima x_i matrice \mathbf{X} tj. j -ti koeficijent y_i je projekcija na j -ti red matrice \mathbf{A} . \mathbf{A} to je matrica koja u linearnoj algebri predstavlja rotaciju i elongaciju tako da očuvava konformnost preslikavanja (kako bi se relevantne veličine sistema održale) pri prelasku sa \mathbf{X} na \mathbf{Y} pa redovi \mathbf{A} su novi skup bazisnih vektora koji predstavljaju kolone \mathbf{X} .

Na kraju, sa pretpostavkom linearnosti redukujemo problem na promenu bazisa jer su nam iz novog bazisa neki aspekti sistema transparentniji, a vektori iz reda \mathbf{A} matrice ove transformacije postaću glavne komponente matrice \mathbf{X} .

Kako različite kamere prate kretanje kuglice dovodimo u pitanje potrebu za snimanjem sa 3 različita mesta. Isto tako, praćenje dve observable je možda nepotrebno kako iz prve možemo da izračunamo drugu ili iz druge prvu. Slično dimenzionalnost broja observacija se može umanjiti deljenjem vremenskog intervala na broj koji odgovara praćenim varijablama, gde bi se u svakom intervalu mogla uzeti prosečna srednja vrednost kako bi se dobila $m \times m$ kvadratna matrica koja će imati značajan funkcionalni karakter u nastavku. Ovo će nas odvesti do dimenzionalne redukcije.

Osnovna ideja ovde, kako bi kompletirali priču o AGK, je da uvedemo osim varijanse: $\sigma_A^2 = \frac{1}{n} \sum_i a_i^2$ za neku vrednost A i za neku drugu vrednost B: $\sigma_B^2 = \frac{1}{n} \sum_i b_i^2$ i kovarijansu koja meri stepen linearosti između dve varijable. Ovim dobijamo ili pozitivno korelisane podatke, za + znak, ili negativno korelisane podatke, za - znak. Kovarijansa A i B observabli je matematički zapisano: $\sigma_{AB}^2 = \frac{1}{n} \sum_i a_i b_i$ i osim gore navedenog, ona je apsolutna veličina koja meri stepen nepotrebnosti varijable. Slično je moguće definisati za određeni skup podataka \mathbf{X} matricu kovarijanse \mathbf{C} od \mathbf{X} (\mathbf{C}_X) koja je sad $m \times m$ i meri kovarijansu između parova merenja u kojoj se vidi interesantna struktura i nepotrebne ili neinformativne varijable. Slično možemo da definišemo i matricu kovarijanse \mathbf{C} od \mathbf{Y} (\mathbf{C}_Y) koja bi morala da bude što je više moguće ispunjena nulama van dijagonale (dekorelisana) a svaka naredna dimenzija \mathbf{Y} treba da bude uređena po opadajućem redu po varijansi. Sve ovo ćemo izvući iz osnovnog algoritma AGK i tako dolazimo do epiloga. Potrebno je da primenimo naredni postupak na skup podataka \mathbf{X} (ili konkretno naš skup predstavljen ovde)

1. izabrati normalizovani pravac u m -dimenzionalnom prostoru duž koga je varijansa \mathbf{X} maksimizovana i notirati ovaj pravac kao vektor a_1
2. naći novi pravac a_2 duž koga je varijansa maksimizovana tako da je ortogonalan na prvi pravac
3. ponoviti proceduru dok nije pronađeno m vektora .

Skup uređenih m , a_m vektora predstavlja glavne komponente analiziranog skupa. A simetričnu matricu \mathbf{A} biramo tako da je svaki red p_i svojstveni vektor matrice $\frac{1}{n} \mathbf{X} \mathbf{X}^T$, gde je n broj opservacija i posle dimenzionalne redukcije je jednak m . Izbor matrice \mathbf{A} dijagonalizuje matricu \mathbf{C}_Y što je bio cilj AGK. Tako glavne komponente \mathbf{X} su svojstveni vektori \mathbf{C}_X , a i -ta dijagonalna vrednost \mathbf{C}_Y je varijansa od \mathbf{X} duž p_i vektora. Ovo sve je detaljnije istaknuto u novijim algebarsko-statističkim publikacijama [?, 45].

Pri korišćenju AGK u ovoj disertaciji i formulisanju finalnog oblika istraživanja, korišćena je i varijansa i kovarijansa, međutim takvi alati su po finalnoj formulaciji paravca zamenjeni biplot dijagramima kako je od izuzetne važnosti bilo izdvajanje jedinstvenog parametra iz početno definisane morfološke grupe.

9.2 Prilog B - Upotrebljene funkcije u programskom jeziku R za dobijanje rezultata

U ovom suplementarnom delu proći ćemo kroz upotrebljene funkcije u izabranim svrsishodnim paketima R programskog jezika. Softver i interaktivno razvojno okruženje za prethodni jezik su besplatani i predstavljaju deo GNU projekta i adaptirani su za različite korišćene operativne sisteme tj. platforme.

Korišćena je osnovna dostupna baza podataka (engl. *The Comprehensive R Archive Network (CRAN)*) [46] sa koje su naknadno učitani paketi na verziji programskog jezika - *R v4.3.0.*. Radi vizuelizacije korišćeni su R pridruženi programski paketi *factoextra v1.0.7.* i u svrhu 3D vizuelizacije *rgl v1.1.3.* paket. U nastavku pozivanje učitane baze podataka nazivaćemo - *anatomskaGrupa*.

U AGK radi sprovođenja iste (kreiranja odgovarajućih tabela) i ispod osnovni dijagram prevoja u toj grupi dobija se sa sledećim linijama koda:

```
pc <- princomp(anatomskaGrupa, cor=T, scores=T)
```

```
summary(pc)
```

```
plot(pc, type="lines")
```

Dalje, biplot dijagram sa linijom koda ispod, čiji je nastavak, posle prvog argumenta korišćen za različita obeležavanja drugih struktura (i.e. tipova astrocita u istoj grupi) dat je na sledeći način:

```
biplot(pc, choices=c(1,2), xlab=c("željeni deznacioni simbol za 1 i 2", ..., do finalnog broja uzoraka u toj ispitivanoj grupi))
```

U okviru iste grupe u AGK dodatni atribut u liniji koda otkriva vrednosti date u suplementarnim tabelama:

```
pc$loadings
```

Za pozivanje instaliranog paketa *factoextra* i određivanje preporučenog optimalnog broja klastera metodom lakta (prva sledeća linija) ili metodom silueta (treća linija koda ispod) koristimo sledeće funkcije:

```
library(factoextra)
```

```
fviz_nbclust(anatomskaGrupa, kmeans, method = 'wss')
```

```
fviz_nbclust(anatomskaGrupa, kmeans, method = 'silhouette')
```


Za 2D prikaz analiziranih numeričkih podataka koji oslikavaju klasterne neurona ili astrocila i za njihovu separaciju pomoću izabranih parametara koristimo prvi red ispod. Drugi i treći red daju statističke vrednosti separacije, rezultate i raspored posmatranih tačaka u uzorku. Treći red daje raspodelu i vizuelni pregled klastera i njihov integritet:

```
km.res<-kmeans(anatomskaGrupa[,c(br.reda.iz.izabrane.tabele, br.kolone.iz.izabrane.tabele)],  
preporučeni.br.klastera, nstart = 256)
```

```
str(km.res)
```

```
km.res
```

```
fviz_cluster(km.res, atomskaGrupa[,c(br.reda.iz.izabrane.tabele, br.kolone.iz.izabrane.tabele)])
```

Na kraju, za vizuelizaciju u 3D prostoru parametara upražnjavamo biblioteku rgl. Prvim redom, pozivanje instalirane biblioteke rgl. Drugim redom obezbeđujemo iste nasumične podatke. Trećim redom formiramo kolonu u kojoj će biti dodata dezinacija klastera. Četvrtim redom menjamo tip podataka kako bi se adekvatno upotrebio. Petim redom formiramo 3D interaktivni plot sa separacijom u grupe koje sada nazivamo klasterima i jasno vidimo u zavisnosti od izabranih parametara za klacifikaciju koliko je distinkcija dobra. U četvrtom argumentu funkcije moguće je odabrati željenu veličinu tačaka u novom koordinatnom sistemu na 3D grafiku.

```
library(rgl)
```

```
set.seed(1117)
```

```
cl<-kmeans(anatomskaGrupa[,c(br.reda.iz.izabrane.tabele,  
br.kolone.iz.izabrane.tabele)], preporučeni.br.klastera)
```

```
anatomskaGrupa$cluster<-as.factor(cl$cluster)8
```

```
plot3d(pc$scores[,1:3], col = atomskaGrupa$cluster,  
main="k-means clusters atomskaGrupa", size = 10)
```

⁶Ovaj broj odgovara broju nasumičnih pridruživanja početnih položaja tačaka kako bi se utvrdio onaj sa najmanjom varijacijom unutar klastera.

⁷Nasumični broj (ovde proizvoljan isti trocifren) koji obezbeđuje reproducibilnost jednako kvalitetnog rezultata.

⁸Konverzija je neophodna da bi se dobio odgovarajući upotrebljiv tip podataka.

10 Literatura

- [1] Charu C. Aggarwal Ed. Data Classification, Algorithms and Applications, CRC Press, Taylor & Francis Group, A Chapman & Hall Book, 2014.
- [2] Di Leva Antonio, Ed. The Fractal Geometry of the Brain. Springer, New York, NY, USA, 2016.
- [3] Neuroscience. Merriam Webster Dictionary.
Dostupno na: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/neuroscience>, jun 2023.
- [4] Five Human Species You May Not Know About.
Dostupno na: <https://www.sapiens.org/column/field-trips/ancient-human-species>, jun 2023.
- [5] S. Ausim Azizi. . . . And the Olive Said to the Cerebellum: Organization and Functional Significance of the Olivo-Cerebellar System. *The Neuroscientist*; 13(6):616-625, 2007.
- [6] Michael F. Barnsley. Fractals Everywhere, Second Edition. Ed. Hawley Rising III. Morgan Kaufmann, An Imprint of Elsevier, 1993.
- [7] Fernández E., Jelinek H.F.. Use of Fractal Theory in Neuroscience: Methods, Advantages, and Potential Problems. *Methods*; 24, 309-321, 2001.
- [8] E. Schrodinger. What Is Life and Mind and Matter. Cambridge University Press, 2013.
- [9] Ilya Prigogine. Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes, 3th Edition. Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, 1967.
- [10] Ilya Prigogine. The End of Certainty. The Free Press, New York, 1997.
- [11] Paulo J. Negro. A Blueprint for the Hard Problem of Consciousness, Negative Entropy and Inference in Living Organisms. *Bentham Science*, 6: 30-35, 2019.
- [12] Damjan Stojić, Dragana Radošević, Nemanja Rajković, Dušica L. Marić, Nebojša T. Milošević. Classification by Morphology of Multipolar Neurons of the Human Principal Olivary Nucleus. *Neuroscience Research*, Volume 170, Pages 66-75, 2021.
- [13] Damjan Stojić, Dragana Radošević. Post Mortem Image Analysis of Astrocytes of the Human Principal Olivary Nucleus Using Geometrical and Fractal Parameters. *Fractal Fract.* 7(1), 6, 2023.
- [14] Physiology of Astroglia. Alexei Verkhratsky and Maiken Nedergaard. *Physiol Rev* 98: 239–389, 2018.
- [15] Santiago Ramón y Cajal. Texture of the Nervous System of Man and the Vertebrates, Volume I. Springer-Verlag Wien GmbH, 1899.
- [16] Yu Guo, Zhuo Liu, Yi-kun Chen, Zhen Chai, Chen Zhou, Yan Zhang. Neurons with Multiple Axons Have Functional Axon Initial Segments. *Neurosci. Bull.* 33(6):641–652, 2017.

- [17] Estomih Mtui, Gregory Gruener, Peter Dockery. *Fitzgerald's Clinical Neuroanatomy and Neuroscience*, 7th edition. Elsevier, Inc. 2016.
- [18] Ryan Splittgerber. *Snell's Clinical Neuroanatomy*. Eighth Edition, Wolters Kluwer, 2019.
- [19] Morfološka analiza nervnih i glijalnih ćelija glavnog maslinastog jedra čoveka. dr Dragana Radošević, Ph. D, Disertacija, 2019.
- [20] *Anatomy and Physiology*, OpenStax, <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>, 2017.
- [21] FIPAT. *Terminologia Anatomica*. 2nd ed. FIPAT.library.dal.ca. Federative International Programme for Anatomical Terminology, 2019.
- [22] Bojana Krstonošić, Nebojša T. Milošević, Radmila Gudović, Dušica L. Marić, Dušan Ristanović. *Neuronal images of the putamen in the adult human neostriatum: a revised classification supported by a qualitative and quantitative analysis*, 2012.
- [23] Ivan Grbatinić, Nebojša Milošević. *Classification of adult human dentate nucleus border neurons: Artificial neural networks and multidimensional approach*, 2016.
- [24] Nemanja Rajković, Bojana Krstonošić and Nebojša Milošević. *Box-Counting Method of 2D Neuronal Image: Method Modification and Quantitative Analysis Demonstrated on Images from the Monkey and Human Brain*. Hindawi, *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, Volume, 2017.
- [25] V. H. Perry. *The Ganglion Cell Layer of the Retina of the Rat: A Golgi Study*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Vol. 204, No.1156 (May 23, 1979), pp. 363-375, 1979.
- [26] Dušan Ristanović, Nebojša T. Milošević, Dušica L. Marić. *On the classification of normally distributed neurons: an application to human dentate nucleus*. *Biol Cybern* (2011) 104:175–183. Springer-Verlag, 2011.
- [27] Nebojša T. Milošević, Dušan Ristanović, Herbert F. Jelinek, Katarina Rajković. *Quantitative analysis of dendritic morphology of the alpha and delta retinal ganglion cells in the rat: A cell classification study*. *Journal of Theoretical Biology* 259 (2009) 142–150, 2009.
- [28] *The Anatomy of the Medulla Oblongata*. verywellhealth. Dostupno na: <https://www.verywellhealth.com/medulla-oblongata-anatomy-4799916>, jun 2023.
- [29] Anthony L. Mescher. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 16th Edition. Lange, 2021.
- [30] Sarah Jäkel and Leda Dimou. *Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey Through the History of Their Ablation*. *Front. Cell. Neurosci.* 11:24, 2017.
- [31] R. Douglas Fields. *Change in the Brain's White Matter: The role of the brain's white matter in active learning and memory may be underestimated*. *Science*, 2010 November 5; 330(6005): 768–769, 2010.

- [32] Anthony A. Mercadante, Prasanna Tadi. Neuroanatomy, Gray Matter. StatPearls Publishing, 2022.
- [33] Julia M. Edgar and Ian R. Griffiths. Section 2: Diffusion MRI For Quantitative Measurement, Ch. 5: White Matter Structure: A Microscopist's View. Elsevier Inc. 2009.
- [34] Miguel A. Cuadros, M. Rosario Sepulveda, David Martin-Oliva, José L. Marín-Teva and Veronika E. Neubrand. Microglia and Microglia-Like Cells: Similar but Different, 2022.
- [35] Wang Y, Zhang X, Chen F, Song N and Xie J. In vivo Direct Conversion of Astrocytes to Neurons Maybe a Potential Alternative Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* 13:689276. 2021.
- [36] Nathalie Spassky, Florian T. Merkle, Nuria Flames, Anthony D. Tramontin, Jose Manuel Garcia-Verdugo, and Arturo Alvarez-Buylla. Adult Ependymal Cells are Postmitotic and are Derived from Radial Glial Cells During Embryogenesis, *The Journal of Neuroscience*, 2005; 25(1):10–18, 2005.
- [37] Lalošević D, Somer LJ, Djolai M, Lalošević V, Mažibrada J, Krnojelac D. Mikroskopska laboratorijska tehnika u medicini. Novi Sad: Medicinski fakultet Novi Sad, 2005.
- [38] Karl Pearson, F.R.S.. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. University College, London, 1901.
- [39] J. MacQueen. Some Methods for Classification and Analysis of Multivariate Observations. University of California, Los Angeles, 1967.
- [40] Eric P. Xing, Andrew Y. Ng, Michael I. Jordan and Stuart Russell. Distance Metric Learning, with Application to Clustering with Side-Information. University of California, Berkeley, CA 94720, 2002.
- [41] Rico Jonschkowski, Sebastian Hofer, Oliver Brock. Patterns for Learning with Side Information. Robotics and Biology Laboratory, Technische Universitat Berlin, Germany, 2016.
- [42] Chris Ding, Xiaofeng He. K-means Clustering via Principal Component Analysis. Computational Research Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, 2004.
- [43] National Institute of Health, Bethesda, MD.
Dostupno na: <http://rsbweb.nih.gov/ij>, jun 2023.
- [44] Alboukadel Kassambara. Practical Guide to Cluster Analysis in R. STHDA, 2017.
- [45] Jonathan D. Bakker. Applied Multivariate Statistics in R. University of Washington, 2023.
- [46] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2023.
Dostupno na: <https://www.R-project.org>, jun 2023.

- [47] What is Clustering in Machine Learning: Types and Methods. AnalytixLabs. Dostupno na: <https://www.analytixlabs.co.in/blog/types-of-clustering-algorithms>, jun 2023.
- [48] Peter J. Rousseeuw. Silhouette s a Graphical Aid to the Interpretation and Validation of Cluster Analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics* 20 (1987) 53-65. Switzerland, University of Fribourg, 1987.
- [49] K. R. Gabriel. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, 58, 3, p. 453, The Hebrew University, Jerusalem, 1971.
- [50] Benoit Mandelbrot. How Long is the Coast of Britain Statistical Self-Similarity and Fractional Dimension. *Science, New Series*, Vol. 156, No. 3775, pp. 636-638, American Association for the Advancement of Science, 1967.
- [51] Aron J. Beekman, Louk Rademaker and Jasper van Wezel. An Introduction to Spontaneous Symmetry Breaking. *SciPost Phys. Lect. Notes* 11, 2019.
- [52] F. Hausdorff. Dimension und äußeres Maß. *Math. Ann.* 79, 157–179, 1918.
- [53] Benoit B. Mandelbrot. *The Fractal Geometry of Nature*. W.H. Freeman and Company, New York, 1983.
- [54] Richardson, Lewis F. 1961. The problem of contiguity: An appendix to Statistics of Deadly Quarrels. *Yearbook of the Society for General Systems Research*, Ann Arbor, Mich., Vol. VI, pp. 140–187.
- [55] Behar TN. Analysis of fractal dimension of O2A glial cells differentiating in vitro. *Methods*. 2001.
- [56] Smith Jr TG, Lange GD, Marks WB. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods*. 1996.
- [57] *Textbook of Medical Physiology*. Guyton and Hall, 2011.
- [58] Robert H. Garman. *Histology of the Central Nervous System*, 2011.
- [59] P. W. Anderson. More Is Different: Broken symmetry and the nature of the hierarchical structure of science. *Science*, Volume 177, Number 4047, 1972.
- [60] Roelof Bijker. *Fundamentals of Physics III - Phase Transitions And Spontaneously Broken Symmetries*, Eolss Publishers, Oxford, U.K. 2006.
- [61] Ehrenfest, P.. Phasenumwandlungen im ueblichen und erweiterten Sinn, classificiert nach dem entsprechenden Singularitaeten des thermodynamischen Potentials. *Verhandlungen der Koninklijke Akademie van Wetenschappen .Amsterdam/ 36: 153–157; Communications from the Physical Laboratory of the University of Leiden, Supplement No. 75b, 1933.*
- [62] Gregg Jaeger. The Ehrenfest Classification of Phase Transitions: Introduction and Evolution. *Arch. Hist. Exact Sci.* 53 (1998) 51–81. c Springer-Verlag, 1998.

- [63] Reinhard Folk and Yuriy Holovatch. Schottky's forgotten step to the Ising model. *Eur. Phys. J. H* 47:9, 2022.
- [64] V.L. Ginzburg and L.D. Landau, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* 20, 1064 (1950). English translation in: .L. D. Landau, *Collected papers*, Oxford: Pergamon Press, p. 546, 1965.
- [65] J. Bardeen, L. N. Cooper, and J. R. Schrieffer. Microscopic theory of superconductivity. *Phys. Rev.*, 106:162–164, 1957.
- [66] J. Bardeen, L. N. Cooper, and J. R. Schrieffer. Theory of superconductivity. *Phys. Rev.*, 108:1175–1204, 1957.
- [67] L.P. Gor'kov. Microscopic derivation of the Ginzburg-Landau equations in the theory of superconductivity. *Soviet Physics JETP*, 36(9):1364–1367, 1959.
- [68] Y. Nambu and G. Jona-Lasinio. Dynamical model of elementary particles based on an analogy with superconductivity. i. *Phys. Rev.*, 122:345–358, 1961.
- [69] P. W. Anderson. Plasmons, gauge invariance, and mass. *Phys. Rev.*, 130: 439–442, 1963.
- [70] F. Englert and R. Brout. Broken symmetry and the mass of gauge vector mesons. *Phys. Rev. Lett.*, 13:321–323, 1964.
- [71] Peter W. Higgs. Broken symmetries, massless particles and gauge fields. *Physics Letters*, 12(2):132 – 133, 1964.
- [72] Peter W. Higgs. Broken symmetries and the masses of gauge bosons. *Phys. Rev. Lett.*, 13:508–509, 1964.
- [73] Peter W. Higgs. Spontaneous symmetry breakdown without massless bosons. *Phys. Rev.*, 145:1156–1163, 1966.
- [74] G. S. Guralnik, C. R. Hagen, and T. W. B. Kibble. Global conservation laws and massless particles. *Phys. Rev. Lett.*, 13:585–587, 1964.
- [75] Steven Weinberg. A model of leptons. *Phys. Rev. Lett.*, 19:1264–1266, 1967.
- [76] Anaís Dorta-Urra and Pedro Bargeño. Homochirality: A Perspective from Fundamental Physics. *Symmetry*, 11, 661, 2019.
- [77] Josep M. Ribó, David Hochberg, Joaquim Crusats, Zoubir El-Hachemi and Albert Moyano. Spontaneous Mirror Symmetry Breaking and Origin of Biological Homochirality. *J. R. Soc. Interface* 14: 20170699, 2017.
- [78] Soren Toxvaerd. Origin of Homochirality in Biosystems. *Int. J. Mol. Sci.* 2009.
- [79] Vazza F and Feletti A.. The Quantitative Comparison Between the Neuronal Network and the Cosmic Web. *Front. Phys.* 8:525731, 2020.

- [80] Ran Kafri, Omer Markovitch and Doron Lancet. Spontaneous chiral symmetry breaking in early molecular networks. *Biology Direct*, RESEARCH Open Access 2010, Kafri et al; licensee BioMed Central Ltd., 5:38, 2010.
- [81] Yukiko M. Yamashita, Hebao Yuan, Jun Cheng, and Alan J. Hunt. Polarity in Stem Cell Division Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009.
- [82] Rong Li nad Bowerman. *Symmetry Breaking in Biology*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010.
- [83] D'Arcy Wentworth Thompson, Ed. John Tyler Bonner. *On Growth and Form*. Cambridge University Press 12th edition, 2010.
- [84] Jose Gaité. *Scale Symmetry in the Universe*. Applied Physics Department, ETSIAE, Universidad Politécnica de Madrid, E-28040 Madrid, Spain, 2020.
- [85] Mandelbrot, B.B. Negative fractal dimensions and multifractals. *Physica A*, 163, 306–315, 1990.
- [86] Takahisa Igata. Scale invariance and constants of motion. Department of Physics, Rikkyo University, Toshima, Tokyo 171-8501, Japan. *Prog. Theor. Exp. Phys.*, 063E01, 2018.
- [87] Steven Weinberg. *The Quantum Theory of Fields, Volume 1, Foundations*, 1995.
- [88] Noether, E. Invariante Variationsprobleme. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen. Mathematisch-Physikalische Klasse*. 1918: 235–257, 1918.

Biografija

Obrazovanje: Damjan Stojić je rođen u Beogradu 14. novembra 1989. Završio je osnovnu školu „Radoje Domanović” na Novom Beogradu, potom „X beogradsku gimnaziju” nakon čega je upisao Fizički fakultet Univerziteta u Beogradu školske 2008/2009. godine, studijski program: TEORIJSKA I EKSPERIMENTALNA FIZIKA. Diplomirao je 9. oktobra 2013. godine, sa prosečnom ocenom 8.93/10. Nakon završetka osnovnih akademskih studija, upisao je master akademske studije na Fizičkom fakultetu u Beogradu, studijski program: TEORIJSKA I EKSPERIMENTALNA FIZIKA i odbranio master tezu pod nazivom „T-dualnost u proširenom prostor-vremenu” 29. oktobra 2014. godine sa prosečnom ocenom 9.67/10 i stekao akademski naziv *master fizičar*. Doktorske studije pri Univerzitetu u Beogradu upisuje 2017/2018. godine.

Radno iskustvo: Kao master fizičar u periodu od kraja 2014. pa do 2016. konkuriše na mnogim evropskim univerzitetima i institutima kako bi nastavio karijeru u nauci u oblasti iz koje je odbranio master rad. Pri pokušajima uspostavljanja kontakata sa potencijalnim mentorima uglavnom je ostajao bez odgovora. U 2016. godini iz usmenog dogovora u Beogradu sa potencijalnim mentorom prof. Milanom Maksimovićem iz Pariske opservatorije, dogovora posetu i probni rad u opservatoriji. U Parizu, posle prezentacija radova vezanih za tematiku doktorata, zbog finansijske nepodrživosti u toku studija, odustaje od doktorskih studija iz oblasti solarne fizike. Pri Kliničko bolničkom centru Srbije 2017. radi na Gama nožu kao Medicinski fizičar gde posle probnog rada dobija ponudu za nastavak karijere u nauci na katedri Biofizika u medicini i nastavlja tu da radi po upisanim doktorskim studijama.

Bibliografija:

1. Damjan Stojić, Dragana Radošević. Post Mortem Image Analysis of Astrocytes of the Human Principal Olivary Nucleus Using Geometrical and Fractal Parameters. *Fractal Fract.* 2023, Volume 7, Issue 1, 6. doi.org/10.3390/fractalfract7010006. (M21a)
2. Stojić D, Radošević D, Rajković N, Marić DL, Milošević NT. Classification by morphology of multipolar neurons of the human principal olivary nucleus. *Neurosci Res.* 2020 Dec 24. doi: 10.1016/j.neures.2020.10.005. (M22)
3. Milošević NT, Stojić D, Vraneš V. The Binary Images of Aspiny Neurons from the Human Neostriatum: Cluster Classification Using Parameters of Monofractal Analysis. *22nd International Conference on Control Systems and Computer Science (CSCS), 2019*, pp. 501-506. doi: 10.1109/CSCS.2019.00092. (M33)
4. Milošević NT, Vraneš V, Stojić D. Artificial neural networks and multidimensional approach in the classification: 2D images of neurons from the human dentate nucleus. *8th Regional Biophysics Conference (RBC 2018), 16th to 18th May 2018, Zreče, Slovenia. Book of Abstracts S05-OR-07*, p 42. (M34)
5. Vraneš V, Milošević NT, Stojić D. Gray level co-occurrence matrix analysis in medical investigation: 2D images of the aspiny neurons from the human neostriatum. *8th Regional Biophysics Conference (RBC 2018), 16th to 18th May 2018, Zreče, Slovenia. Book of Abstracts PS-75*, p 148. (M34)

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Damjan Stojić

Broj indeksa 48/2017

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom EVALUACIJA SLIKA NEURONA I ASTROCITA GLAVNOG MASLINASTOG JEDRA ČOVEKA – NJIHOVA ANALIZA, KLASIFIKACIJA I PRAĆENJE POMOĆU GEOMETRIJSKIH I FRAKTALNIH PARAMETARA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 23.1.2024.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Damjan Stojić

Broj indeksa 48/2017

Studijski program Biofizika

Naslov rada EVALUACIJA SLIKA NEURONA I ASTROCITA GLAVNOG MASLINASTOG JEDRA
ČOVEKA – NJIHOVA ANALIZA, KLASIFIKACIJA I PRAĆENJE POMOĆU GEOMETRIJSKIH I FRAKTALNIH
PARAMETARA

Mentori Mihailo Rabasović, Andrej Korenić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 23.1.2024.

Potpis autora

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

EVALUACIJA SLIKA NEURONA I ASTROCITA GLAVNOG MASLINASTOG JEDRA ČOVEKA – NJIHOVA ANALIZA, KLASIFIKACIJA I PRAĆENJE POMOĆU GEOMETRIJSKIH I FRAKTALNIH PARAMETARA koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA) (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 23.1.2024.

- 1.** Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
- 2.** Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
- 4.** Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
- 5.** Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 6.** Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.