

UNIVERZITET U BEOGRADU

MAŠINSKI FAKULTET

Branislava D. Jeftić

**ALGORITAM ZA ODREĐIVANJE BIOFIZIČKOG  
STANJA EPITELNOG TKIVA NA BAZI  
SPEKTROSKOPIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

Branislava D. Jeftić

**ALGORITHM FOR SPECTROSCOPY BASED  
DETECTION OF EPITHELIAL TISSUE  
BIOPHYSICAL STATE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

**Mentor doktorske disertacije**

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

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

dr Lidija Matija, vanredni profesor (mentor)  
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

dr Milena Papić-Obradović, naučni saradnik (komentor)  
GAK Narodni front, Nastavno-istraživačka baza Medicinskog fakulteta Beograd

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

dr Radiša Jovanović, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

dr Jelena Munćan, docent  
Univerzitet u Beogradu, Mašinski fakultet

**Datum odbrane:**

## ALGORITAM ZA ODREĐIVANJE BIOFIZIČKOG STANJA EPITELNOG TKIVA NA BAZI SPEKTROSKOPIJE

### Rezime

Savremeni dijagnostički testovi koji se koriste u kliničkoj praksi imaju neosporan uticaj na smanjenje smrtnosti kao posledice obolevanja od različitih tipova kancera. S obzirom da više od 85% kancera potiče iz epitelnog tkiva, za istraživanje u okviru ove doktorske disertacije je izabran grlić materice kao jedan od predstavnika epitelnih tkiva. Kada govorimo o kanceru grlića materice, Papanikolau test još uvek predstavlja nezamenljiv skrining test čiji se uticaj u ranoj dijagnostici meri značajnim opadanjem trenda u broju obolelih i broju umrlih u poslednjih 60 godina. Međutim, Papanikolau test nije 100% tačan, te procenat lažno negativnih rezultata i dalje predstavlja problem koji prati izvođenje ovog testa. I dok su u razvijenim zemljama organizovani skrining programi uspeli da nadomeste nedovoljnu senzitivnost Papanikolau testa, u nerazvijenim zemljama iz kojih potiče čak 80% slučajeva karcinoma grlića materice, u kojima ne postoje uslovi za sprovođenje ovakvih programa, potreba za jeftinijim i efikasnijim testom raste. Pogrešno postavljene dijagnoze često su posledica ljudske greške, pa se kao rešenje nameće automatizacija dijagnostičkog procesa. Analizirajući ovu problematiku, javila se ideja o testiranju patentirane metode Optomagnetne imidžing spektroskopije na uzorcima ćelija grlića materice i njenoj primeni u dijagnostici karcinoma grlića materice. U tom cilju, prikupljeno je 2293 uzorka koji su snimljeni Optomagnetnom imidžing spektroskopijom, čiji su spektri korišćeni kao ulazna veličina u algoritmu za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva i grafički korisnički interfejs razvijeni su u programskom paketu MATLAB® 2013. Algoritam je potpuno automatizovan i na osnovu značajnih parametara iz OMIS spektra vrši klasifikaciju datog uzorka u klasu zdravo/bolesno. Klasifikacija uzoraka se bazira na modelu stabla odlučivanja koji se pokazao kao najefikasniji od četiri testirana modela klasifikacije. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja namenjen je za

implementaciju u OMIS uređaj i kao takav trebalo bi da doprinese razvoju nove verzije OMIS metode koja bi kao pomoćna dijagnostička metoda mogla da se koristi u nerazvijenim zemljama u cilju povećanja tačnosti konvencionalnih metoda dijagnostike. Tačnost binarne klasifikacije uzoraka ćelija grlića materice korišćenjem razvijenog algoritma i OMIS metode u dve grupe, pri čemu jednu grupu čine uzorci iz II i III Papanikolau grupe, a drugu uzorci iz IV i V Papanikolau grupe koje označavaju karcinom, iznosi 98.48%, sa senzitivnošću od 83.33%, specifičnošću od 100% za nebojene uzorke. Klasifikacija nebojenih uzoraka OMIS metodom dala je bolje rezultate u odnosu na bojene uzorke i predstavlja glavnu prednost OMIS metode u odnosu na konvencionalne dijagnostičke testove s obzirom da bi inovacija u vidu eliminisanja procesa bojenja uzoraka dovela do znatne uštede u vremenu i novcu.

**Ključne reči:** Optomagnetna Spektroskopija, algoritam, karcinom grlića materice, klasifikacija, skrining, automatska detekcija

**Naučna oblast:** Oblast tehničkih nauka, Mašinstvo

**Uža naučna oblast:** Biomedicinsko inženjerstvo

**UDK broj:** 618.147-07 : 543.424] : 519.254(043.3)

## ALGORITHM FOR SPECTROSCOPY BASED DETECTION OF EPITHELIAL TISSUE BIOPHYSICAL STATE

### **Abstract**

Diagnostic tests used in clinical practice have the undeniable impact on reducing mortality related to different types of cancer. Since more than 85% of all cancers originate in epithelial tissue, cervix is chosen to be a testing material in this doctoral dissertation. When it comes to cervical cancer, Papanicolaou test is still the most effective screening test for cervical cancer detection. Its importance is reflected in decreasing trend in mortality and number of diseased in the last 60 years. However, Papanicolaou test is not 100% accurate with the main problem being high percentage of false negative results. This problem of low sensitivity is partially resolved in developed countries with organized screening programs. Still, since about 80% of cervical cancer cases occur in less developed countries, where the cost of screening program implementation is not affordable and infrastructure is not satisfying, the need for cost-effective screening test is rising. This is why the tendency in scientific world nowadays is to develop automated diagnostic system that would minimize „human error“ and allow effective screening even in low resource settings.

Optomagnetic Imaging Spectroscopy is recognized as potential screening method for cervical cancer detection. In order to fully explore its possibilities, 2293 cervical samples were collected and subjected to OMIS. The algorithm for detection of epithelial tissue biophysical states developed in this dissertation uses OMIS sample spectrum and classifies sample into healthy/cancerous group. It is aimed to be implemented in Optomagnetic Imaging Spectroscopy device and in that way contribute to the development of improved OMIS device that would be cost-effective, accurate and efficient and that would in combination with other diagnostic tests increase overall accuracy of conventional tests. The accuracy of the binary classification in groups (II&III Papanicolaou group)/(IV&V Papanicolaou group) achieved with the developed algorithm and OMIS is 98.48%, sensitivity is 83.33% and specificity is 100% for the unstained samples. The

classification of unstained samples gave notably better results compared to stained samples and represents the main advantage of OMIS method since the examination of unstained samples significantly reduces time and the cost of screening test.

**Key words:** Optomagnetic Spectroscopy, algorithm, cervical cancer, classification, screening, automated detection

**Scientific field:** Mechanical Engineering

**Scientific subfield:** Biomedical Engineering

**UDK number:** 618.147-07 : 543.424] : 519.254(043.3)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 UZROČNICI NASTANKA OBOLJENJA GRLIĆA MATERICE .....	3
1.2 ZNAČAJ RANE DIJAGNOSTIKE KARCINOMA GRLIĆA MATERICE.....	4
2. PREGLED I ANALIZA POSTOJEĆEG STANJA PREDMETA IZUČAVANJA .....	8
2.1 SAVREMENE DIJAGNOSTIČKE METODE .....	8
2.1.1 CERVICALNA CITOLOGIJA .....	8
2.1.2 CITOLOGIJA NA TEČNOJ BAZI .....	14
2.1.3 KOLPOSKOPIJA.....	16
2.1.4 BIOPSIJA.....	18
2.1.5 HISTOPATOLOGIJA .....	19
2.1.6 HPV DNK TESTIRANJE .....	20
2.2 OPTIČKO ISPITIVANJE EPITELNOG TKIVA GRLIĆA MATERICE .....	23
3. UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3.1 NEDOSTACI POSTOJEĆIH METODA U DIJAGNOSTICI .....	27
3.2 UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	32
4. MATERIJAL .....	34
4.1 ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA EPITELA GRLIĆA MATERICE .....	34
4.2 FIZIČKE I OPTIČKE OSOBINE EPITELA.....	36
4.3 METODE PRIKUPLJANJA MATERIJALA (UZORAKA) ZA ISPITIVANJE.....	38
4.4 BOJENI I NEBOJENI UZORCI .....	38
5. METODE I TEHNIKE.....	42
5.1 OPTOMAGNETNA IMIDŽING SPEKTROSKOPIJA.....	42
5.1.1 Osnovni principi Optomagnetne imidžing spektroskopije .....	42
5.1.2 OMIS uređaj .....	43
5.2 METODE MAŠINSKOG UČENJA.....	46
5.2.1 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI.....	48
5.2.2 STABLA ODLUČIVANJA.....	51
5.2.3 NAIVE BAYES KLASIFIKATOR.....	54
5.2.4 KAPPA STATISTIKA.....	55



5.2.5 SVM.....	56
5.2.6 ROC KRIVA .....	60
6. PROTOKOL ISTRAŽIVANJA .....	62
6.1 I FAZA (2011. godina).....	63
6.2 II FAZA (2012. godina) .....	64
6.3 III FAZA (2013. godina).....	67
6.4 IV FAZA (2014. godina) .....	68
7. REZULTATI.....	69
7.1 REZULTATI ISPITIVANJA UZORAKA OMIS METODOM .....	69
7.1.1 BOJENI UZORCI ĆELIJA GRLIĆA MATERICE .....	69
7.1.2 REZULTATI UPOREDNOG ISPITIVANJA BOJENIH I NEBOJENIH UZORAKA ĆELIJA GRLIĆA MATERICE OMIS METODOM.....	72
7.1.3 POREĐENJE BOJENIH I NEBOJENIH UZORAKA ĆELIJA GRLIĆA MATERICE OBRADOM CELOKUPNE REGIJE OD INTERESA.....	83
7.2 KLASIFIKACIJA OMIS PODATAKA.....	86
7.2.1 BINARNA KLASIFIKACIJA .....	88
7.2.2 KLASIFIKACIJA U 4 KLASE.....	108
7.3 ALGORITAM ZA ODREĐIVANJE BIOFIZIČKOG STANJA EPITELNOG TKIVA NA BAZI SPEKTROSKOPIJE .....	113
8. DISKUSIJA.....	120
9. ZAKLJUČAK.....	131
LITERATURA .....	136
BIOGRAFSKI PODACI AUTORA.....	142

## **INDEKS SKRAĆENICA I OZNAKA**

OMIS	Optomagnetna Imidžing Spektroskopija
HPV	Humani Papiloma Virus
VrHPV	Visokorizični HPV
HSV	Herpes Simplex Virus
CIN	Cervikalna Intraepitelna Neoplazija
CIS	Carcinoma in situ
SIL	Skvamozna Intraepitelna Lezija
HSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
LSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
ASC-US	Atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja
LBC	Citologija na tečnoj bazi (Liquid Based Cytology)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopija
Pap	Papanikolau test
SN	Senzitivnost
SP	Specifičnost
PPV	Pozitivna prediktivna vrednost
NPV	Negativna prediktivna vrednost
SVM	Metoda potpornih vektora
ROC	Receiver Operating Characteristic
PCA	Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis)

## **SPISAK SLIKA**

**Slika 1.1** *Progresija HPV infekcije*

**Slika 2.1** *A) Normalan citološki nalaz, B) CIN 1, C) CIN 2, D) CIN 3*

**Slika 2.2** *Citološki nalaz u GAK „Narodni front“*

**Slika 2.3** *Kolposkopska slika normalnog skvamoznog epitela grlića materice (slika levo gore), Kolposkopska slika leukoplakije – belog epitela vidljivog pre aplikacije sirćetne kiseline, Histopatološki nalaz: CIN III (slika sredina gore); Kolposkopska slika mozaika koji označava prisustvo terminalnih kapilara koji okružuju blokove aceto-belog epitela, Histopatološki nalaz: CIN III (slika desno gore); Kolposkopska slika grlića materice sa atipičnim krvnim sudovima. Histopatološki nalaz: Mikroinvazivni karcinom (slika levo dole); Kolposkopska slika aceto-belog epitela – epitel koji postaje beo nakon aplikacije 3% do 5% sirćetne kiseline (slika sredina dole); Kolposkopska slika invazivnog karcinoma grlića materice (slika desno dole)*

**Slika 2.4** *Transformaciona zona grlića materice na kojoj se nalazi mesto promene skvamoznog epitela u kolumnarni epitel*

**Slika 2.5** *a) Histološka slika normalnog cervikalnog skvamoznog epitela, b) Histološka slika CIN I – displastične ćelije zauzimaju manje od trećine skvamoznog epitelnog sloja iznad bazalnog sloja, c) Histološka slika CIN II – displastične ćelije zauzimaju od jedne trećine do polovine debljine epitela, bazalni sloj je netaknut, d) Histološka slika CIN III – ozbiljna cervikalna skvamozna displazija koja se širi od centra na desno. Jedra displastičnih ćelija su veća, tamnija, a displastične ćelije su neorganizovano raspoređene u epitelu. Iako se displastične ćelije nalaze duž cele debljine epitela, bazalna membrana nije probijena*

**Slika 2.6** *FTIR spektar karcinoma grlića materice, karcinoma endometrijuma i zdravog tkiva*

**Slika 2.7** *Ramanov spektar (srednja vrednost) normalnog tkiva (tačkasta linija) i malignog tkiva (tanka linija)*

**Slika 4.1** Prikaz ćelija pločasto-slojevitog epitela, cilindričnog epitela i transformacione zone

**Slika 4.2** Postupak bojenja uzoraka

**Slika 5.1** Prikaz relativnih pozicija izvora svetlosti za belu difuznu (levo) i reflektovanu polarizovanu svetlost (desno). Stepenn polarizacije svetlosti je 95.4%, dok je razlika između uglova  $\theta$  i  $\theta_1 \pm 1:6^\circ$  (šest belih LED dioda postavljeno je u krug)

**Slika 5.2** Uređaj B53 razvijen na Mašinskom fakultetu, u Nanolabu – laboratoriji za Biomedicinsko inženjerstvo, koji se koristi za primenu Optomagnetne imidžing spektroskopije u ranoj dijagnostici kancera epitelnog tkiva

**Slika 5.3** Procedura snimanja uzorka Optomagnetnom Imidžing Spektroskopijom: prikupljeni uzorak se nanosi na mikroskopsku pločicu po Papanikolau proceduri, pločica sa uzorkom se postavlja u OMIS uređaj, zatim se slika 20 puta pod belom difuznom svetlošću i belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom. Digitalne slike uzorka se obrađuju spektralnim algoritmom u programskom paketu MATLAB koji formira OMIS spektar uzorka

**Slika 5.4** Preklapajuće distribucije za bolesne (desna) i zdrave (leva) sa četiri različite vrednosti praga odlučivanja

**Slika 5.5** ROC kriva

**Slika 7.1** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz II Papanikolau grupe oznake 10480\_1 (levo) i 10480\_2 (desno)

**Slika 7.2** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz III Papanikolau grupe oznake 10438\_1 (levo) i 10438\_2 (desno)

**Slika 7.3** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz IV Papanikolau grupe oznake 10255\_1 (levo) i 10255\_2 (desno)

**Slika 7.4** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz V Papanikolau grupe oznake 7775\_1 (levo) i 7775\_2 (desno)

**Slika 7.5** OMIS spektri predstavnika II grupe (oznaka pločice 50-11): prikazani su spektri dobijeni obradom digitalnih slika bojenih i nebojenih pločica sa razmazom brisa cervikalnih ćelija jedne pacijentkinje

**Slika 7.6** OMIS spektri predstavnika III grupe (oznaka pločice 22321): prikazani su spektri dobijeni obradom digitalnih slika bojenih i nebojenih pločica sa razmazom brisa cervikalnih ćelija jedne pacijentkinje

**Slika 7.7** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)

**Slika 7.8** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

**Slika 7.9** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)

**Slika 7.10** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

**Slika 7.11** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)

**Slika 7.12** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

**Slika 7.13** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)

**Slika 7.14** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

**Slika 7.15** Srednje vrednosti OMIS spektara nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan nebojeni uzorak sa oznakom 12 iz IV Papanikolau grupe

**Slika 7.16** Srednje vrednosti OMIS spektara nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US)

**Slika 7.17** Srednje vrednosti OMIS spektara bojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12)

**Slika 7.18** Srednje vrednosti OMIS spektara bojenih uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV i V Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan bojeni uzorak sa oznakom 12 iz navedenih Papanikolau grupa

**Slika 7.19** Prikaz različitih delova iz originalne slike uzorka (a) koji su razmatrani: kvadratni krop iz centra slike (b) i kružni krop (c)

**Slika 7.20** Usrednjeni OMIS spektri nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan nebojeni uzorak sa oznakom 12 iz IV Papanikolau grupe

**Slika 7.21** Usrednjeni OMIS spektri nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US)

**Slika 7.22** Usrednjeni OMIS spektri bojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12)

**Slika 7.23** Usrednjeni OMIS spektri bojenih uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV i V Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan bojeni uzorak sa oznakom 12 iz navedenih Papanikolau grupa

**Slika 7.24** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6

*atributa bojnih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojnih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL*

**Slika 7.25** *Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojnih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojnih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL*

**Slika 7.26** *Uporedno prikazane tačnosti četiri klasifikatora za binarnu klasifikaciju bojnih i nebojnih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije kod bojnih i 336 kod nebojnih, pri čemu je prag za klase: zdravo/bolesno postavljen na LSIL*

**Slika 7.27** *ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojnih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL*

**Slika 7.28** *ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojnih uzoraka sa 6 atributa i 336 observacija, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL*

**Slika 7.29** *Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojnih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojnih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu*

**Slika 7.30** *Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojnih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojnih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu*

**Slika 7.31** *Uporedno prikazane tačnosti četiri klasifikatora za binarnu klasifikaciju bojnih i nebojnih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije kod bojnih i 336 kod nebojnih, pri čemu je prag za klase: zdravo/bolesno postavljen na IV Papanikolau grupu*

**Slika 7.32** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojениh uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.33** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 6 atributa i 336 observacija, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.34** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

**Slika 7.35** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

**Slika 7.36** Tačnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

**Slika 7.37** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojениh uzoraka sa 160 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL

**Slika 7.38** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 160 atributa i 336 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL

**Slika 7.39** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu



**Slika 7.40** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojanih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.41** Tačnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojanih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.42** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojanih uzoraka sa 160 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.43** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojanih uzoraka sa 160 atributa i 336 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

**Slika 7.44** Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi Optomagnetne Imidžing Spektroskopije

**Slika 7.45** Konvolucionni algoritam koji podrazumeva obradu digitalne slike uzorka obasjanog belom difuznom svetlošću pod pravim uglom ( $W\_slika$ ) i digitalne slike uzorka obasjanog belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom ( $P\_slika$ ), pronalaženja histograma RGB komponenti boja svake od slika i njihovu konvoluciju, čiji je rezultat OMIS spektar

**Slika 7.46** Prikaz prvog panela GUI rešenja za OMIS uređaj

**Slika 7.47** Prikaz drugog panela GUI rešenja za OMIS uređaj na kojem korisnik može da analizira OMIS spektar podešavanjem prikazanog dela spektra

**Slika 7.48** Prikaz trećeg panela GUI rešenja za OMIS uređaj koji daje rezultat klasifikacije uzorka, tačnost predviđanja i vrednosti OMIS parametara od značaja

## **SPISAK TABELA**

**Tabela 2.1** Poređenje kategorija prijavljenih prema standardnom Papanikolau testu gde se rezultati kategorišu u II, III, IV i V Papanikolau grupu i prema Bethesda klasifikaciji

**Tabela 2.2** Savremeni komercijalni HPV testovi

**Tabela 2.3** Srednja vrednost frekvencija na kojima se javljaju pikovi (srednja vrednost  $\pm$  SD) normalnih i abnormalnih spektara i nosioci glavnih udela

**Tabela 5.1** Određivanje tačnosti metode/dijagnostičkog testa na osnovu zlatnog standarda (TP – tačno pozitivni, LP – lažno pozitivni, LN – lažno negativni, TN – tačno negativni, N – ukupan broj uzoraka)

**Tabela 6.1** Prikaz broja uzoraka po Papanikolau grupama prikupljenih u periodu od 2011. godine do 2015. godine

**Tabela 7.1** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 neobojenih pločica sa razmazima uzetim sa površine grlića materice (S) iz II PA grupe (5 pacijentkinja) (WD-wavelength difference, I-intensity)

**Tabela 7.2** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 neobojenih pločica sa razmazima uzetim iz cervikalnog kanala (U) iz II PA grupe (5 pacijentkinja) (WD-wavelength difference, I-intensity)

**Tabela 7.3** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 neobojenih pločica sa razmazima uzetim sa površine grlića materice (S) iz III PA grupe (5 pacijentkinja) (WD-wavelength difference, I-intensity)

**Tabela 7.4** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 neobojenih pločica sa razmazima uzetim iz cervikalnog kanala (U) iz III PA grupe (5 pacijentkinja) (WD-wavelength difference, I-intensity)

**Tabela 7.5** Performanse Naive Bayes klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.6** Performanse Decision Tree klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.7** Performanse Random Forest klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.8** Performanse DTbagging klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.9** Performanse SVM klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.10** Performanse Naive Bayes klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.11** Performanse Decision Tree klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.12** Performanse Random Forest klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.13** Performanse DTbagging klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

**Tabela 7.14** Performanse SVM klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

## *Predgovor*

Doktorska disertacija na temu „Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije“ proistekla je iz višegodišnjeg rada na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije III41006 pod nazivom „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“. U okviru projekta, ispitivane su mogućnosti primene nove metode „Optomagnetna imidžing spektroskopija“ u dijagnostici kancera različitih tipova epitelnih tkiva: grlić materice, debelo crevo, usna duplja i koža. S obzirom na obim i kompleksnost svake od navedenih kategorija dijagnostike, projekat je podeljen na četiri potprojekta, pri čemu se upravo iz potprojekta koji se odnosio na primenu Optomagnetne imidžing spektroskopije u ranoj dijagnostici karcinoma grlića materice iznedrila ova doktorska disertacija. Stoga, epitelno tkivo u nazivu doktorske disertacije odnosi se na epitelno tkivo grlića materice, te algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva grlića materice svoj doprinos daje u polju rane dijagnostike karcinoma grlića materice otkrivajući nov pristup sadržan u metodi Optomagnetne imidžing spektroskopije i kao krajnji cilj ima smanjenje smrtnosti od ove opake bolesti.

Na projektu i u izradi doktorske disertacije sam, na moje veliko zadovoljstvo, bila vođena i rukovođena stručnjacima iz oblasti Biomedicinskog inženjerstva: Prof. dr Lidijom Matijom, mojim mentorom i ujedno rukovodiocem projekta, kao i idejnim tvorcem metode Optomagnetne imidžing spektroskopije, Prof. dr Đurom Korugom, koji su mi pružili mogućnost za usavršavanje na modulu za Biomedicinsko Inženjerstvo na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kako stručno, kroz laboratorijski rad, tako i nastavno, kroz rad sa studentima. Eksperimentalni rad koji predstavlja osnovu doktorske disertacije ne bi bio moguć bez stručne pomoći mog komentora Doc. dr Milene Papić-Obradović, Specijaliste

ginekologije i akušerstva i Načelnika odeljenja za naučno-istraživačku i obrazovnu delatnost u GAK „Narodni Front“, gde su tokom pet godina prikupljeni uzorci neophodni za izradu ove doktorske disertacije. Veliku zahvalnost dugujem i Prof. Aleksandru Tomiću, koji je u saradnji sa Prof. Đurom Korugom patentirao metodu Optomagnetne imidžing spektroskopije korišćenu u radu. Takođe se zahvaljujem Prof. dr Aleksandri Vasić-Milovanović, Prof. dr Radiši Jovanoviću i doc. dr Jeleni Munćan, na savetima, sugestijama i stručnoj pomoći koju su mi pružili tokom izrade ove doktorske disertacije.

Na kraju, hvala mojoj divnoj porodici, mojim prijateljima i kolegama na podršci i razumevanju. Bez njih ovo bi bio samo lični uspeh, a sa njima je i povod za zajedničku radost.

## 1. UVOD

Razvoj novih tehnika i metoda za ranu detekciju karcinoma predstavlja jedan od aktuelnih problema u oblasti biomedicine koji se tretira u savremenim naučnim krugovima i čija je važnost oslikana mnoštvom savremenih studija i rezultata koji ukazuju na nove trendove u dijagnostici i koji imaju zajednički cilj da poboljšaju postojeće metode i omoguće efikasnu dijagnostiku i pravovremeno lečenje. S druge strane, sve se više teži automatizaciji u dijagnostici kako bi se prevazišao problem „ljudske greške“ pri obradi podataka i postavljanju dijagnoze. Naime, pri izvođenju različitih dijagnostičkih testova, kao što je na primer citologija, preveliki broj uzoraka koje citolog treba da pregleda u toku jedne smene i zamor koji je time izazvan, neki su od glavnih uzroka greške u dijagnostici karcinoma grlića materice. Greške se mogu javiti i usled neadekvatne pripreme uzoraka, kao i neadekvatnog prikupljanja uzoraka, te se iz svih navedenih razloga u brojnim studijama ispituje mogućnost automatizacije procesa pripreme uzoraka za ispitivanje, kao i razvoj softverskih rešenja koja bi na osnovu obrade digitalne slike uzorka i različitih metoda mašinskog učenja omogućila detekciju abnormalnih stanja tkiva sa dovoljno visokom tačnošću [1-5].

Zadatak ove doktorske disertacije je da dâ doprinos u oblasti rane dijagnostike karcinoma kombinovanjem nove metode za detekciju abnormalnog stanja tkiva zasnovanoj na spektroskopiji sa metodama za klasifikaciju, nudeći na taj način automatizovan pristup detekciji karcinoma. S obzirom na podatak da je karcinom grlića materice četvrti po redu kancer u svetu po broju obolelih, a kod žena drugi po redu, odmah iza kancera dojke, epitelno tkivo grlića materice odabrano je kao predstavnik epitelnih tkiva koje je služilo za ispitivanje u ovoj doktorskoj disertaciji i razvijanje algoritma koji će se koristiti za detekciju različitih biofizičkih stanja epitela grlića materice.

Evropski podaci iz 2012. godine (EUCAN), beleže incidenciju karcinoma grlića materice koja se kreće od 4.2 na 100,000 u Švajcarskoj do 34.9 na 100,000 u

Rumuniji. U svetu, 2012. godine zabeleženo je 528,000 novih slučajeva obolelih od karcinoma grlića materice, od kojih je 84% slučajeva poteklo iz nerazvijenih zemalja. Razlog pojave značajno većeg broja obolelih u nerazvijenim zemljama je višestruk, pri čemu su nedostatak sredstava za sprovođenje organizovanih programa za skrining i ranu dijagnostiku karcinoma grlića materice, nedovoljan broj medicinskih institucija i obučanih lekara, kao i neinformisanost žena, samo neki od njih. U Srbiji, karcinom grlića materice je drugi po redu uzrok obolevanja i četvrti uzrok umiranja od karcinoma. Incidencija karcinoma grlića materice u Srbiji je 2002. godine bila najviša u Evropi i iznosila je 27,3 na 100.000. Od tada do danas incidencija je u opadanju, što je posledica sprovođenja oportunog nacionalnog programa za rano otkrivanje karcinoma grlića materice, ali je i dalje među najvišim u Evropi i dvostruko je veća od prosečne stope incidencije u Evropi. Karcinom grlića materice najučestaliji je kod žena starosnih grupa od 45 do 59 i od 70 do 74 godine. Međutim, poslednjih godina se vrh u obolevanju pomera prema mlađim uzrastima [6].

Karcinom grlića materice se razvija relativno sporo i u proseku od 5 do 15 godina potrebno je da promena (blaga displazija) preraste u invazivni karcinom. Ova činjenica direktno ukazuje na značaj rane dijagnostike, s obzirom da karcinom grlića materice može da se kontroliše skriningom i da pravovremena detekcija cervikalnih abnormalnosti i lečenje žena sa cervikalnim abnormalnostima visokog stepena mogu da spreče razvoj karcinoma grlića materice. Da bi se na vreme detektovala promena na grliću materice, neophodna je dovoljno tačna dijagnostička metoda koja nije subjektivna i čija implementacija u zdravstvene ustanove nije skupa i zahtevna, kako bi mogla da se koristi i u nerazvijenim zemljama u kojima se javlja najveći procenat obolelih i umrlih od ove bolesti. Automatizacija procesa dijagnostike mogla bi da obezbedi objektivnost, pa se sve više pribegava softverskim rešenjima koji bi pomogli u detekciji abnormalnih ćelija i umanjili ljudski faktor koji u velikom broju slučajeva dovodi do greške u dijagnozi. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva grlića materice, koji je tema ove disertacije, razvijen je kako bi omogućio automatsku detekciju normalnih i abnormalnih uzoraka ćelija grlića materice, klasifikujući

uzorke na osnovu spektralnih karakteristika dobijenih metodom Optomagnetne imidžing spektroskopije sa ciljem razvijanja *in vivo* dijagnostičke metode koja bi se koristila u organizovanim programima za ranu dijagnostiku karcinoma grlića materice.

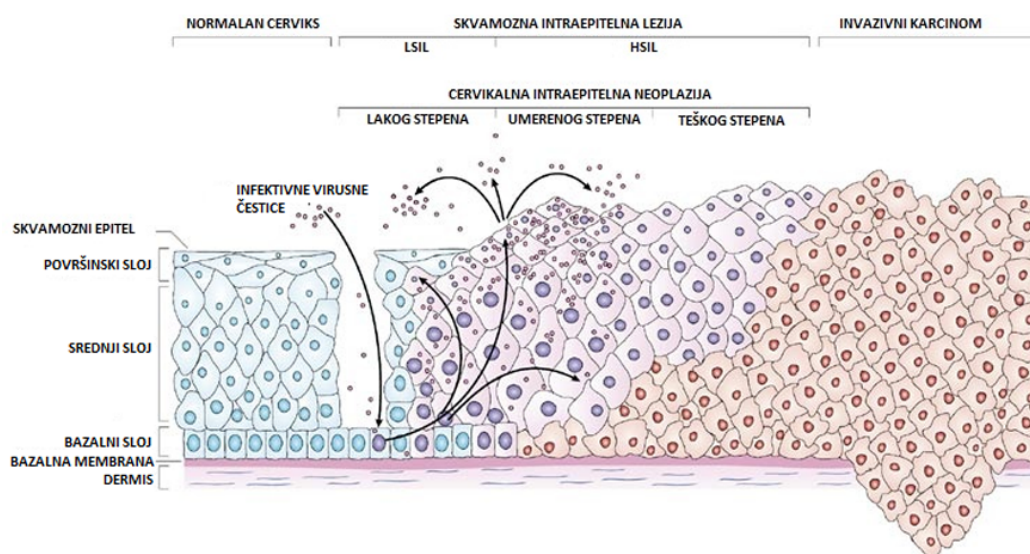
## 1.1 UZROČNICI NASTANKA OBOLJENJA GRLIĆA MATERICE

Poznato je da je dugotrajna infekcija grlića materice visokorizičnim tipovima humanog papiloma virusa (vrHPV) najčešći uzrok razvoja invazivnog karcinoma grlića materice. VrHPV infekcija je česta, naročito kod mladih žena koje su seksualno aktivne. Većina ovih infekcija je prolazna i spontano se povlači bez kliničkih posledica. Međutim, kod nekih žena razvija se dugotrajna infekcija koja povećava rizik od nastajanja karcinoma grlića materice. Čak 99,7% slučajeva karcinoma grlića materice je povezano sa prisustvom infekcije Humanim papiloma virusom (HPV). Međutim, prisustvo HPV infekcije nije i dovoljan uslov za nastanak karcinoma grlića materice, s obzirom na dug period latencije, prisustvo HPV infekcije kod asimptomatskih pacijenata i činjenicu da se proces maligne alteracije dogodi samo u jednoj od nekoliko hiljada inficiranih ćelija. Faktori rizika kao što su pušenje, dugotrajna upotreba oralnih kontraceptiva, multiparnost, rizično seksualno ponašanje, Herpes Simplex Virus (HSV) tipa 2 i imunosupresija su faktori koji doprinose nastanku intraepitelnih neoplazija i karcinoma grlića materice [6-8].

Hipoteza o virusnoj etiologiji karcinoma grlića materice postavljena je u drugoj polovini 20. veka. Hipotezu je postavio nemački virolog Harald zur Hausen koji je za to otkriće dobio Nobelovu nagradu. Etiologija karcinoma grlića materice i dalje nije u potpunosti razjašnjena, ali veruje se da su početno mesto infekcije bazalne ćelije ili primitivne ćelije nezrelog pločastog epitela, koje imaju specifične receptore za HPV infekciju (slika 1.1). Nakon ulaska u bazalne ćelije virus u njima može postojati u dva biološka oblika. Prvi oblik je neproduktivna infekcija HPV-om, latentna faza. U ovoj fazi se ne stvaraju infektivne virusne čestice, tako da nema



karakterističnog citopatogenog efekta, a postojanje infekcije može se, za sada, otkriti samo metodama molekularne biologije. Drugi oblik infekcije HPV-om je produktivna virusna infekcija. U tom slučaju virusna DNK replikacija se dešava nezavisno o deobi ćelija domaćina. Produktivna virusna infekcija dovodi do karakterističnih citološko-histoloških promena koje se mogu najbolje videti kod intraepitelnih lezija niskog onkogenog rizika. Naime, citopatogeni efekat se u ovom slučaju oslikava jedarnom atipijom, vakuolizacijom sa zadebljanjem citoplazmatske membrane i anizocitozom.



**Slika 1.1** Progresija HPV infekcije [9]

Većinu HPV infekcija koja se detektuje pomoću molekularnih (DNK ili RNK) testova, posle nekoliko meseci nije moguće detektovati. Nije poznato do koje mere nedostatak mogućnosti detekcije predstavlja nestanak postojanja virusa ili istrajnost virusa u nekoj vrsti latentne faze [10].

## 1.2 ZNAČAJ RANE DIJAGNOSTIKE KARCINOMA GRLIĆA MATERICE

U borbi protiv karcinoma grlića materice veliki značaj imaju primarna i sekundarna prevencija. Primarna prevencija podrazumeva vakcinisanje protiv

HPV, kao i prevenciju svih loših navika i ponašanja koji predstavljaju glavne faktore rizika za razvijanje karcinoma. Vakcinacijom se sprečava HPV infekcija, čija perzistencija može dovesti do nastanka prekanceroznih i kanceroznih bolesti. U Srbiji su registrovane dve vakcine koje pružaju zaštitu od visoko rizičnih tipova HPV 16 i 18 (Gardasil, Merck&Co, USA koji pored 16 i 18 štiti i od tipova HPV 6, 11 i Servariks, GSK, USA), ali vakcinacija protiv HPV i dalje nije deo obavezne imunizacije.

Sekundarna prevencija podrazumeva ranu detekciju kancera grlića materice i realizuje se u okviru organizovanih nacionalnih (skrining) programa čiji je cilj prvenstveno smanjenje broja obolelih i umrlih od ove bolesti, a posledično i poboljšanje kvaliteta života žena, očuvanje plodnosti i smanjenje troškova lečenja. Do 2006. godine u Srbiji nije postojao organizovan skrining program za kancer grlića materice, već se prevencija ogledala u oportunom skriningu. Oportuni skrining podrazumeva nesistematsku primenu skrining testova u okviru redovnih pregleda i stoga uključuje samo žene koje se same jave na pregled. 2006. godine su započete aktivnosti na uvođenju organizovanog skrininga koji podrazumeva pozivanje ciljne populacije na pregled. Da bi skrining program bio uspešan, trebalo bi da pokrije najmanje 75% populacije, kao i da uključi zbrinjavanje žena sa pozitivnim rezultatom skrining testa, njihovo praćenje, skladištenje svih podataka o pacijentu i rezultata skrining testova u bazu podataka i kontrolu kvaliteta.

Da bi se realizovao masovni skrining program, moraju biti ispunjeni određeni uslovi: moraju postojati stručni kadrovi u zdravstvenim ustanovama koji će biti nosioci aktivnosti pri sprovođenju skrining testova i zdravstvene ustanove moraju biti opremljene adekvatnom opremom koje obezbeđuju uslove za odvijanje kolposkopskih pregleda, citološke i histopatološke dijagnostike. Potrebno je takođe da postoji jedinstveni ginekološki zdravstveni karton koji će sadržati sve parametre ispitivanja skrining testom. Organizacija na nivou primarnih zdravstvenih centara – domova zdravlja, treba da podrazumeva preglede svih žena koje žive na toj opštini i taj proces treba da bude završen u roku od tri godine. Efikasnost skrininga se procenjuje tek nakon petogodišnjeg sprovođenja kad se na

osnovu procenta pregledanih žena, broja rano otkrivenih bolesti, uspešnosti lečenja, kao i stope smrtnosti vrši procena stanja.

Dugo je primarni skrining test za detekciju karcinoma grlića materice u najvećem broju razvijenih zemalja na svetu bio Papanikolau test. Papanikolau test je uveden šezdesetih godina prošlog veka i od tada do danas doveo je do značajnog smanjenja incidencije karcinoma grlića materice i broja smrtnih slučajeva kao posledice obolevanja od karcinoma grlića materice. Međutim, tačnost ove metode nije statistički zadovoljavajuća (senzitivnost u opsegu 30% - 87%, specifičnost u opsegu 86% - 100%), pa stoga i dalje postoji nezanemarljiv procenat pogrešno postavljenih dijagnoza [11]. S jedne strane imamo lažno negativne rezultate koji pacijentkinju koja je obolela označavaju kao zdravu, pri čemu pacijentkinja ne dobija pravovremenu terapiju ili lečenje u potpunosti izostaje, dok s druge strane imamo lažno pozitivne rezultate koji dovode do toga da se pacijent podvrgava nepotrebnom lečenju, a država se nepotrebno tereti troškovima lečenja.

Nakon što je utvrđena etiološka veza između karcinoma grlića materice i humanog papiloma virusa, u martu 2014. godine FDA (US Food and Drug Administration) je odobrio primenu HPV testa kao primarnog skrining testa i pojedine zemlje kao što je Holandija, već su uvele primarni HPV test u organizovane skrining programe. Međutim, efikasnost primene HPV testa u skriningu, što kao primarnog skrining testa, što kao jednog od kombinovanih testova za skrining, još uvek nije potpuno utvrđena i dalje se razmatra u brojnim studijama [12, 13].

Prema preporukama ACS (American Cancer Society), ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) i ASCP (American Society for Clinical Pathology) iz 2012. godine, skrining programom obuhvataju se žene starije od 21. godine koje bi trebalo da se pregledaju na svake tri godine samo cervikalnom citologijom, dok bi žene starije od 30 godina trebalo radije da se podvrgnu skriningu svakih 5 godina i to kombinovano cervikalnom citologijom i HPV testom („kotestiranje“). Uputstva iz iste godine podržavaju upućivanje žena pozitivnih na HPV 16 ili 18 na kolposkopiju i ponovno kotestiranje žena koje su pozitivne na neki od ostalih visoko rizičnih HPV tipova za 12 meseci [14].

Kombinacijom Papanikolau testa i HPV testa za sada se dobijaju najbolji rezultati i propisana je direktiva koja opisuje tačnu proceduru skrining programa, određuje starosno doba u kojem bi se trebalo podvrgnuti pregledima, kao i vremenski period u kome bi testove trebalo ponoviti ukoliko je rezultat pozitivan odnosno negativan. Za razliku od situacije u razvijenim zemljama, gde se uveliko ispituju i u skrining programe uvode novi, tačniji testovi, u nekim nerazvijenim zemljama se kao primarni skrining test koristi vizuelna inspekcija grlića materice sa sirćetnom kiselinom. Činjenica da više od 80% slučajeva karcinoma grlića materice potiče iz nerazvijenih zemalja upozorava da je neophodno u ovim zemljama organizovati skrining programe koji će koristiti efikasne i tačne skrining testove koje je moguće sprovesti u postojećoj infrastrukturi [15, 16].

## 2. PREGLED I ANALIZA POSTOJEĆEG STANJA PREDMETA IZUČAVANJA

### 2.1 SAVREMENE DIJAGNOSTIČKE METODE

#### 2.1.1 CERVICALNA CITOLOGIJA

Cervikalna citologija podrazumeva prikupljanje i mikroskopsku analizu ćelija koje spontano deskvamiraju (ljušte se i otpadaju) sa grlića materice, sa ciljem otkrivanja invazivnog karcinoma grlića materice i njegovih prekursora. Cervikalnu citologiju je u kliničku praksu uveo grčki naučnik Papanikolau (George N. Papanicolaou) 1942. godine. Papanikolau je bio uveren da ova metoda omogućava ranu dijagnostiku karcinoma grlića materice i da će njeno uvođenje dovesti do smanjenja smrtnost kao posledice obolevanja od karcinoma grlića materice. Od 1960. godine cervikalna citologija je postala široko korišćena metoda za detekciju karcinoma grlića materice u većem broju razvijenih zemalja, nakon što je utvrđen način identifikacije i klasifikacije prekursora karcinoma grlića materice.

Papanikolau je nalaze cervikalne citologije razdvojio u pet grupa:

*I Pap grupa: odsustvo atipičnih ili abnormalnih ćelija*

*II Pap grupa: atipične ćelije, ali bez dokaza o malignitetu*

*III Pap grupa: abnormalne, suspektne ćelije*

*IV Pap grupa: maligne ćelije u manjem broju, jako ukazuju na malignitet*

*V Pap grupa: brojne maligne ćelije*

pri čemu I i II Pap grupa predstavljaju negativan citološki nalaz, III grupa suspektan, a IV i V pozitivan citološki nalaz [17].

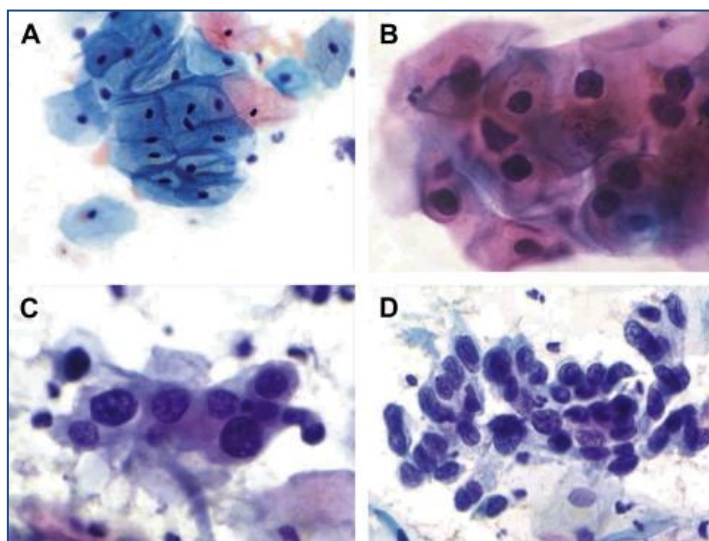
Za nalaz Pap grupe I karakteristične su normalne ćelije odgovarajućih slojeva, jedra normalnog izgleda i veličine, dok se u nalazu Pap II mogu naći ćelije koje su neobične po izgledu i odstupaju od ostalih, ali ne postoje ćelije koje su sumnjive na

malignitet. U nalazu Pap grupe III postoje modifikacije klasifikacije koje prave podelu na blagu, srednje tešku i tešku displaziju. Displazija je stanje u kojem se epitelne ćelije grlića materice svojom veličinom, izgledom i sazrevanjem razlikuju od normalnih epitelnih ćelija. Displastične ćelije mogu biti više ili manje promenjene, pa se tako razlikuju tri nivoa displazije: blaga, umerena i teška. Kao sinonim za displaziju koristi se termin CIN (cervikalna intraepitelna neoplazija), pri čemu se u zavisnosti od debljine zahvaćenog epitela razlikuju (slika 2.1):

*CIN 1 -> blaga displazija*

*CIN 2 -> umerena displazija i*

*CIN 3 -> teška displazija odnosno CIS (carcinoma in situ).*



**Slika 2.1** A) Normalan citološki nalaz, B) CIN 1, C) CIN 2, D) CIN 3 [18]

Za karcinom *in situ* karakterističan je znatni porast nukleoplazmatskog odnosa. Za invazivni karcinom dobija se nalaz polimorfnih malignih ćelija, a karakteristične su i hiperhromazija, kariomegalija, anizokarioza, anizocitoza, nekroza tumorskih ćelija, posebni ćelijski oblici kao što su vretenaste ćelije i ćelije oblika punoglavca. Karcinom *in situ* (CIS), za razliku od invazivnog karcinoma, nije probio bazalnu membranu koja razdvaja epitel od vezivnog tkiva s krvnim i limfnim sudovima koje se nalazi ispod epitela, pa je još uvek ograničen samo na epitel. Termin *Carinoma In Situ* su uveli Schottlander i Kermauner da naglase da su neinvazivne epitelne

abnormalnosti najverovatnije predstavljale poreklo invazivne komponente i njime opišu te intraepitelne abnormalnosti [19]. Pedesetih godina prošlog veka ustanovljeno je postojanje grupe cervikalnih lezija koje imaju karakteristike CIS-a, ali lakšeg oblika. Reagan et al. je prvi uveo termin displazija da opiše ove lezije. Displazija se odnosi na abnormalnosti koje uključuju citološki i histološki spektar lezija koje se svrstavaju između CIS i normalnog epitela [17]. 1973. godine Ralph Richart uvodi klasifikaciju za cervikalnu intraepitelnu neoplaziju (CIN - Cervical Intraepithelial Neoplasia) [20]. Naime, on je tvrdio da displazija i CIS predstavljaju histološki kontinuum pre nego seriju diskretnih entiteta i uvodi termin „cervikalna intraepitelna neoplazija“. U originalnoj CIN-terminologiji, CIN1 odgovara blagoj displaziji, CIN 2 umerenoj displaziji, a CIN3 teškoj displaziji i CIS-u.

U citološkom nalazu moguće je naići i na termin SIL (skvamozna intraepitelna lezija), koji se takođe odnosi na displastične ćelije grlića materice, pri čemu:

1. SIL niskog nivoa (LSIL od eng. low grade squamous intraepithelial lesion) odgovara CIN 1
2. SIL visokog nivoa (HSIL od eng. high grade squamous intraepithelial lesion) uključuje CIN 2 i CIN 3.

Kako bi se obezbedila jedinstvena terminologija koja ima kliničku relevantnost, 1988. godine uveden je Bethesda sistem za opisivanje cervikalnih nalaza. Revidiran Bethesda sistem iz 2001. godine podrazumeva izveštaj koji obuhvata sledeća polja:

- *Tip uzorka*, gde se navodi koji metod za pripremu brisa grlića materice je korišćen (konvencionalan Papanikolau razmaz sa grlića, citologija na tečnoj podlozi (Liquid Based Citology - LBC) ili neki drugi vid pripreme)
- *Adekvatnost uzorka*, u kome se naznačava da li je uzorak zadovoljavajući za analizu (opisuje se prisutnost ili nedostatak endocervikalnih ćelija/ćelija transformacione zone, upale, krvi, itd) ili nezadovoljavajući za analizu (navodi se razlog: uzorak je odbijen/nije obrađen, uzorak je obrađen i pregledan, ali nije zadovoljavajući za procenu epitelnih abnormalnosti, navodi se razlog)

- *Opšta kategorizacija* (opciono): Negativna na intraepitelnu leziju ili malignitet ili drugo (npr. ćelije endometrijuma kod žena starijih od 40 godina) ili Abnormalnost epitelnih ćelija
- *Interpretacija / rezultati*
  - Negativan na intraepitelne lezije ili malignitet (ukoliko ne postoji dokaz da je prisutna neoplazija to se navodi u opštoj kategorizaciji)
  - Drugo: ćelije endometrijuma (kod žena starijih od 40 godina)
  - Abnormalnosti epitelnih ćelija
    - *Skvamozne ćelije*
      - atipične skvamozne ćelije
      - skvamozna intraepitelna lezija nižeg stepena (LSIL) koja obuhvata HPV/blagu displaziju/CIN 1
      - skvamozna intraepitelna lezija visokog stepena (HSIL) koja obuhvata srednju i tešku displaziju, CIS; CIN 2 i CIN 3
      - karcinom skvamoznih ćelija
    - *Glandularne ćelije*
      - atipične
      - endocervikalni adenokarcinom in situ
      - adenokarcinom
  - Druge maligne neoplazme
- *Pomoćno testiranje* – kratak opis test metode i izveštaj o rezultatima koji je lako razumljiv za kliničare.
- *Automatizovan pregled* – navođenje uređaja ukoliko je ispitivanje uzoraka vršeno pomoću automatizovanog uređaja.
- *Edukativne beleške i predlozi* (nije obavezno) [21].

U ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“, u kojoj su prikupljeni uzorci i rezultati Papanikolau testa, citološki nalaz se izdaje u formi prikazanoj na slici 2.2, na kojoj se vidi i relacija između klasifikacije rezultata prijavljenih prema



standardnom Papanikolau testu i Bethesda klasifikaciji. Radi pojašnjenja, ta relacija je prikazana u tabeli 2.1.

ГИНЕКОЛОШКО АКУШЕРСКА КЛИНИКА "НАРОДНИ ФРОНТ"  
 Краљице Наталије 62, Београд, Тел. 2068207, 2068294, 2068308, 2068333, 2068276

Презиме и име				ЈМБ
адреса				Тел.:
Упутна дијагноза				
Менстр.циклус	<input type="checkbox"/> уредан <input type="checkbox"/> неуредан	Датум последњег цитолошког прегледа		
Последња менстр.		Претходна терапија	Датум.....	
Хормонска терапија			Врста.....	
<input type="checkbox"/> Орални контрацеп. <input type="checkbox"/> Супституциона			ХП дијагноза.....	
<input type="checkbox"/> Новадекс <input type="checkbox"/> Друго				
БР.ПРЕПАРАТА	ДАТУМ	ДОКТОР	БР.ЦИТОЛОШ. АРХИВЕ	
<b>ЦИТОЛОШКИ НАЛАЗ</b>				
<b>КВАЛИТЕТ БРИСА</b>				
<input type="checkbox"/> Задовољавајући				
<input type="checkbox"/> Незадовољавајући				
<input type="checkbox"/> Неволан број ћелијских елемената <input type="checkbox"/> инфламација <input type="checkbox"/> крварење				
<input type="checkbox"/> Одсуство ћелијских елемената ЗТ <input type="checkbox"/> Технички лош брис <input type="checkbox"/> остало				
<b>ВАГИНАЛНА ФЛОРА</b>				
<input type="checkbox"/> гљивиче <input type="checkbox"/> делерлајн <input type="checkbox"/> бактерије <input type="checkbox"/> мешана флора				
<input type="checkbox"/> вирусне промене <input type="checkbox"/> коилцити <input type="checkbox"/> трихомонас				
<b>СТАНДАРДНИ ПАП ТЕСТ</b>		<b>BETHESDA КЛАСИФИКАЦИЈА</b>		
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ I ГРУПА		<input type="checkbox"/> НОРМАЛАН НАЛАЗ		
<input type="checkbox"/> НОРМАЛНЕ ЕПИТЕЛНЕ ЋЕЛИЈЕ		<input type="checkbox"/> НОРМАЛНЕ МЕТАПЛАСТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ		
<input type="checkbox"/> НОРМАЛНЕ ЕНДОЦЕРВИКАЛНЕ		<input type="checkbox"/> НОРМАЛНЕ ЕНДОМЕТРИЈАЛНЕ		
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ II ГРУПА		<input type="checkbox"/> ВСС- Бенигне реактивне и репараторне промене		
<input type="checkbox"/> ИНФЛАМАЦИЈА <input type="checkbox"/> РЕПАРАТИВНЕ ЋЕЛИЈСКЕ ПРОМЕНЕ <input type="checkbox"/> АТРОФИЈА				
<input type="checkbox"/> ПАРА- И ХИПЕРКЕРАТОЗА <input type="checkbox"/> МЕХАНИЧКИ УТИЦАЈ ИУУ <input type="checkbox"/> УТИЦАЈ ХОРМОН.ТЕРАПИЈЕ				
<input type="checkbox"/> РАДИЈАЦИЈА <input type="checkbox"/> ДРУГО				
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ III а ГРУПА		<input type="checkbox"/> АТИПИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ НЕОДРЕЂЕНОГ ЗНАЧАЈА		
<input type="checkbox"/> АТИПИЧНЕ СКВАМОЗНЕ ЋЕЛИЈЕ НЕОДРЕЂЕНОГ ЗНАЧАЈА		<input type="checkbox"/> ASC-US		
<input type="checkbox"/> АТИПИЧНЕ СКВАМОЗНЕ ЋЕЛИЈЕ СУМБИВЕ НА Х СИЛ		<input type="checkbox"/> ASC-H		
<input type="checkbox"/> АТИПИЧНЕ ЖЛЕЗДАНЕ ЋЕЛИЈЕ НЕОДРЕЂЕНОГ ЗНАЧАЈА		<input type="checkbox"/> AGUS		
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ III б ГРУПА		<input type="checkbox"/> СКВАМОЗНА ИНТРАЕПИТЕЛНА ЛЕЗИЈА ЛАКОГ/СРЕДЊЕГ СТЕПЕНА		
<input type="checkbox"/> ДИСКАРИОЗА СКВАМОЗНИХ ЋЕЛИЈА ЛАКОГ СТЕПЕНА		<input type="checkbox"/> L SIL		
<input type="checkbox"/> ДИСКАРИОЗА СКВАМОЗНИХ ЋЕЛИЈА СРЕДЊЕГ СТЕПЕНА		<input type="checkbox"/> H SIL		
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ IV ГРУПА		<input type="checkbox"/> СКВАМОЗНА/ЖЛЕЗДАНА ИНТРАЕПИТЕЛНА ЛЕЗИЈА ТЕШКОГ СТЕПЕНА		
<input type="checkbox"/> ДИСКАРИОЗА СКВАМОЗНИХ ЋЕЛИЈА ТЕШКОГ СТЕПЕНА		<input type="checkbox"/> H SIL		
<input type="checkbox"/> ДИСКАРИОЗА ЖЛЕЗДАНИХ ЋЕЛИЈА ТЕШКОГ СТЕПЕНА		<input type="checkbox"/> AIS		
<input type="checkbox"/> ПАПНИКОЛАУ V ГРУПА		<input type="checkbox"/> ИНВАЗИВНИ КАРЦИНОМ		
<input type="checkbox"/> МАЛИГНЕ СКВАМОЗНЕ ЋЕЛИЈЕ				
<input type="checkbox"/> МАЛИГНЕ ЖЛЕЗДАНЕ ЋЕЛИЈЕ				
<input type="checkbox"/> ДРУГЕ МАЛИГНЕ ЋЕЛИЈЕ				
<b>ПРЕПОРУКА</b>				
<input type="checkbox"/> РЕДОВНА КОНТРОЛА ЗА: <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 ГОДИНЕ		<input type="checkbox"/> ПОНОВИТИ БРИС: <input type="checkbox"/> ОДМАХ <input type="checkbox"/> ЗА МЕСЕЦА		
<input type="checkbox"/> КОЛПОСКОПИЈА		<input type="checkbox"/> ХПВ ТИПИЗАЦИЈА		
<input type="checkbox"/> ПОНОВИТИ БРИС ПОСЛЕ ЛЕЧЕЊА		<input type="checkbox"/> ХИСТОЛОШКИ ПРЕГЛЕД-БИОПСИЈА		
<input type="checkbox"/> ПОНОВИТИ БРИС ПОСЛЕ ЕСТРОГЕН.ТЕСТА		<input type="checkbox"/> ДРУГО:		
НАПОМЕНА:				
Датум цитолошког прегледа:		Цитол.преглед извршио:		

**Slika 2.2** Citološki nalaz u GAK „Narodni front“

**Tabela 2.1** Poređenje kategorija prijavljenih prema standardnom Papanikolau testu gde se rezultati kategorišu u II, III, IV i V Papanikolau grupu i prema Bethesda klasifikaciji

<b>PAP</b>	<b>BETHESDA klasifikacija</b>
<b>Pap II</b>	Uzorci koji ne sadrže ćelijske abnormalnosti, negativni na intraepitelne lezije ili malignitet, a koji mogu uključiti neke benigne nalaze (infekcije, zapaljenja...)
<b>Pap IIIa</b>	Atipične ćelije neodređenog značaja: ASC-US/ASC-H
<b>Pap IIIb</b>	LSIL/HSIL
<b>Pap IV</b>	HSIL
<b>Pap V</b>	Invazivni karcinom

Kod citološkog nalaza, izveštaj o adekvatnosti uzorka može biti zadovoljavajući za analizu, manje od optimalnog i nezadovoljavajući. Manje zadovoljavajući i nezadovoljavajući uzorci mogu se javiti kao posledica nedovoljnog broja ćelija, loše fiksacije, ekscesivne citolize, prisustva inflamacije ili krvi u većoj meri, odsustva endocervikalne komponente, prisustva stranog materijala, itd. Citologija se ponavlja u slučaju uzoraka koji su nezadovoljavajući za pregled, u slučaju ASC-US nalaza (atipične skvamozne ćelije neodređenog značaja) ili LSIL nalaza. Slučajevi nezadovoljavajućih Pap testova povezuju se sa povećanim rizikom od epitelne lezije na narednom pregledu. Stoga, predlaže se dodatno laboratorijsko procesiranje ili ponovno uzimanje uzorka. Danas se za trijažu uzoraka sa nezadovoljavajućom citologijom preporučuje HPV DNK testiranje, kao i u slučaju ASC-US nalaza, jer ovaj test može da razgraniči slučajeve kojima je potreban uput na kolposkopiju i histološki pregled, što predstavlja značajno pitanje očekivanog povećanja troškova kako za pacijenta tako i za laboratoriju.

Citološka metoda se pokazala kao pogodan skrining test zbog brzine kojom se izvodi, jednostavnosti, mogućnosti dinamičkog praćenja, odsustva štetnog dejstva, kao i dovoljno visokog stepena senzitivnosti i specifičnosti. Procena je da citološkim skriningom svakih 3-5 godina incidencija invazivnog karcinoma grlića

materice može da se smanji za 80% [22]. Međutim, s obzirom da skrining programi često nisu valjano sprovedeni, stvarno smanjenje smrtnosti kao posledice oboljevanja od karcinoma grlića materice varira od 20% do 60%.

Bez obzira što je Papanikolau test priznati standard u borbi protiv karcinoma grlića materice, on ima svoje nedostatke, među kojima su najznačajniji lažno negativni nalazi, najčešće sa stopom od 10 % do 30%, a prema nekima čak i do 50% [23]. Lažno negativnim rezultatom smatra se normalan citološki nalaz kod žene sa premalignom i malignom lezijom, kao i dijagnoza blažeg stepena od stvarne konačne dijagnoze koja se predstavlja histološkim nalazom. Do lažno negativnih nalaza može dovesti mnoštvo razloga. Deo nastaje kao posledica nepravilnog uzimanja preparata i fiksiranja, a deo kao posledica nepravilnog tumačenja rezultata usled subjektivnosti metode. Kao posledica, javlja se razlika između abnormalnog citološkog nalaza i nalaza dobijenog biopsijom ili kolposkopskog nalaza.

### **2.1.2 CITOLOGIJA NA TEČNOJ BAZI**

Citologija na tečnoj bazi (eng Liquid Based Cytology, LBC) razvijena je upravo da bi se prevazišli nedostaci konvencionalnog Papanikolau testa koji se ogledaju pre svega u procentu lažno negativnih rezultata, a potom i u broju nezadovoljavajućih Papanikolau razmaza. Citologija na tečnoj bazi podrazumeva drugačiji pristup prikupljanju cervikalnog uzorka i pripremi uzorka za mikroskopsku analizu. Naime, kod LBC metode, cervikalne ćelije koje se prikupe četkicom iz kanala grlića materice i sa ektocerviksa (spoljašnja površina grlića materice) ne nanose se na mikroskopsku pločicu, već se četkica potapa u bočicu sa rastvorom koji omogućava momentalnu fiksaciju i ćelije se u tom rastvoru čuvaju do trenutka dok ne usledi priprema uzorka na automatizovanim uređajima. U zavisnosti od tipa citološkog testa na tečnoj bazi, priprema uzorka varira, ali nezavisno od vrste testa krajnji korak je nanošenje uzorka na mikroskopsku pločicu i mikroskopska inspekcija uzorka. Dva najpoznatija citološka testa na

tečnoj bazi koja imaju FDA odobrenje su ThinPrep i SurePath. Njihove performanse su opisane i ispitivane u brojnim studijama [24-27].

Veliki broj studija poslednjih godina bavio se poređenjem specifičnosti i senzitivnosti LBC testa sa konvencionalnim Papanikolau testom. Iako podaci ne idu u prilog isključivo jednoj od ove dve citološke metode, razlike u senzitivnosti i specifičnosti nisu značajno velike. I dok jedni tvrde da je LBC metoda senzitivnija od konvencionalnog Papanikolau testa, drugi tvrde oprečno [28-30]. Međutim, ono što je sigurno je da se prednost LBC metode ogleda u kvalitetu prikupljenih cervikalnih uzoraka i mogućnosti izvođenja dodatnih molekularnih testova na istom uzorku koji je uzet za potrebe LBC testa, kao i da je procenat zadovoljavajućih uzoraka veći kod LBC u odnosu na procenat zadovoljavajućih uzoraka kod konvencionalne citologije [31]. U jednoj studiji pokazano je da je broj uzoraka nezadovoljavajućih za evaluaciju kod ThinPrep (0,57%) skoro dvostruko veći od broja nezadovoljavajućih uzoraka kod SurePath (0,27%), što je posledica metodologije procesiranja uzoraka, pri čemu se misli na tehnologiju baziranu na filtriranju kod ThinPrep i proces sedimentacije kod SurePath metode [32].

Broj nezadovoljavajućih uzoraka kod citologije na tečnoj bazi je manji nego kod konvencionalne citologije i interpretacija LBC zahteva manje vremena. S druge strane, LBC test je nešto skuplji od konvencionalnog, ali ako se uzme u obzir da na jednom LBC uzorku može da se izvrši i dodatno molekularno testiranje kao što je na primer HPV testiranje u slučaju detektovanja atipičnih skvamoznih ćelija neodređenog značaja (ASC-US), može se reći da je test isplativ. Takođe, LBC omogućava bolje prikupljanje epitelnih ćelija i zahvaljujući momentalnoj fiksaciji doprinosi očuvanju ćelija, a s obzirom da se prikupljanjem jednog uzorka mogu uraditi dva testa, izostaje problem koji neki autori navode a koji se javlja kod kotestiranja i tiče se uzimanja dva brisa uzastopno, jednog za Pap jednog za HPV test, pri čemu prednost ima prvi uzeti bris [33].

### 2.1.3 KOLPOSKOPIJA

Kolposkopiju je u kliničku praksu uveo nemački ginekolog Hinselman (Hans Hinselmann). On je pretpostavio da je moguće detektovati karcinom grlića materice u ranom stadijumu ukoliko se grlić posmatra pomoću uređaja sa uvećanjem i posebnim osvetljenjem. 1925. godine je konstruisao prvi monokularni kolposkop koji je do danas više puta usavršavan. 1928. godine Walter Schiller, histolog iz Beča, otkrio je da displastične i kancerozne strukture ne sadrže glikogen i vođen tim otkrićem napravio je test sa jodnim rastvorom za detekciju karcinoma koji Hinselman prihvata kao sastavni deo kolposkopije [34].

U kolposkopiji se pri pregledu koristi endocervikalni spekulum koji se uvodi u grlić materice i omogućava bolji pregled endocerviksa. Takođe, u kolposkopiji se koriste reagensi koji služe za otklanjanje sluzi i sekrecije (3-5% sirćetna kiselina). Korišćenjem sirćetne kiseline određene vrste epitela se dovode u nabubrela stanja, pa se tako kod ektopije vrlo jasno istaknu grozdići pri čemu je čitava površina vaginalnog dela vrata materice crvenkasto-beličasta. Drugi reagens koji se koristi u kolposkopiji je Lugolov rastvor (rastvor joda). Premazivanjem jodom zdravi pločasti epitel se boji mrko braon, jer ovaj epitel u intermedijalnom sloju u citoplazmi ćelija ima veliku količinu glikogena koji se vezuje za jod, dok izmenjeni epitel ostaje neobojen ili slabo obojen [35].

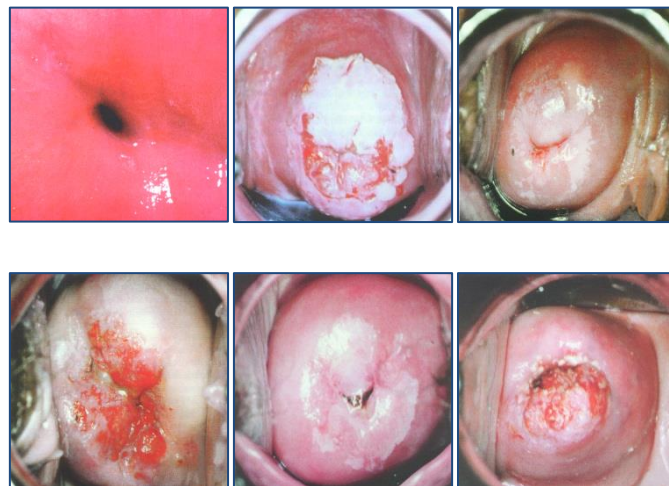
Hinselman je prvi opisao promene epitela grlića i dao im nazive koji su se većinom održali do danas. On je proučavao histološku građu i izvršio klasifikaciju patoloških promena. Kolposkopske slike se mogu klasifikovati u tri grupe:

1. Normalni kolposkopski nalazi
  - originalni pločasto-slojeviti epitel
  - cilindrični epitel
  - normalna zona transformacije
  
2. Abnormalni kolposkopski nalazi
  - aceto-beli epitel

- punktuacija (baza leukoplakija)
- leukoplakija
- jod-negativni epitel
- mozaik
- atipični krvni sudovi

### 3. Kolposkopski suspekti invazivni karcinom.

Atipična zona transformacije predstavlja deo grlića materice na kome se nalazi cervikalna intraepitelna neoplazija ili preklinički invazivni karcinom koja se vidi kao bela promena. Može biti predstavljena bilo kojim od atipičnih kolposkopskih slika kao što su: leukoplakija, mozaik, punktacije, atipični krvni sudovi, aceto-beli epitel [35].



**Slika 2.3** Kolposkopska slika normalnog skvamoznog epitela grlića materice (slika levo gore), Kolposkopska slika leukoplakije – belog epitela vidljivog pre aplikacije sirćetne kiseline, Histopatološki nalaz: CIN III (slika sredina gore); Kolposkopska slika mozaika koji označava prisustvo terminalnih kapilara koji okružuju blokove aceto-belog epitela, Histopatološki nalaz: CIN III (slika desno gore); Kolposkopska slika grlića materice sa atipičnim krvnim sudovima. Histopatološki nalaz: Mikroinvazivni karcinom (slika levo dole); Kolposkopska slika aceto-belog epitela – epitel koji postaje beo nakon aplikacije 3% do 5% sirćetne kiseline (slika sredina

*dole); Kolposkopska slika invazivnog karcinoma grlića materice (slika desno dole)*

[36]

Osnovni cilj kolposkopije je da se otkloni sumnja na invazivni karcinom. Na osnovu prethodno navedenih lezija, kao i intenziteta boje, površine, granica, brzine razvoja i trajanja bele boje lezije vrši se kolposkopska detekcija invazije. Za invazivni karcinom su karakteristični atipični krvni sudovi, dok je CIN predstavljen punktacijama, mozaikom i aceto-belim epitelom ili njihovom kombinacijom (slika 2.3).

Kolposkopija ima nisku specifičnost i u velikoj meri rezultati testa su određeni subjektivnim utiskom onog ko vrši pregled, te stoga nije pogodna kao primarna skrining metoda niti kao usamljena dijagnostička metoda. Senzitivnost kolposkopije za detekciju CIN2 i CIN3 je oko 60%-70%, a specifičnosti 50% [37]. Ipak, kolposkopija se koristi kao neizostavna pomoćna metoda za ranu dijagnostiku karcinoma grlića materice. Kolposkopijom se određuje i mesto odakle se uzima isečak promenjenog epitela za biopsiju, ukoliko za to ima indikacija, pa je od velikog značaja utvrditi da li kolposkopski nalazi odgovaraju stvarnim promenama na grliću.

#### **2.1.4 BIOPSIJA**

Biopsija je kratkotrajna i gotovo bezbolna operacija pri kojoj se uzima uzorak tkiva radi daljeg histopatološkog ispitivanja. Vršiti se otkidanjem patološkog tkiva kleštima za biopsiju ili presecanjem hirurškim makazama. Biopsija se radi u takozvanoj prelaznoj zoni, odnosno uzima se isečak koji sadrži atipično izmenjeno tkivo, zonu metaplazije, normalan skvamozan i cilindričan epitel, kao i stromu grlića materice. U slučajevima kada na svim mestima nije prisutan isti stepen atipije, radi se multifokalna biopsija.

Ukoliko je rezultat biopsije CIN III neophodno je uraditi konizaciju, što predstavlja širi isečak sa grlića materice u obliku konusa, što je kod povoljnog rezultata

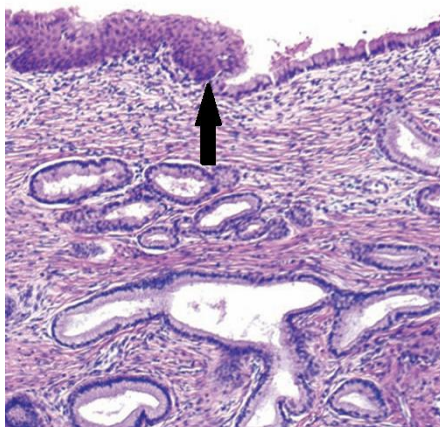
dovoljno i ne zahteva dodatne intervencije. Kod nepovoljnog rezultata neophodno je operativno lečenje koje obuhvata histerektomiju sa obostranom adnektomijom, što predstavlja vađenje genitalnih organa, a po potrebi i zračenje.

### 2.1.5 HISTOPATOLOGIJA

Histopatologija predstavlja zlatni standard u dijagnostici. Nažalost ni histopatologija ne pruža 100 % tačnost dijagnoze. Neoplastične promene koje dovode do razvoja karcinoma grlića materice najčešće nastaju u transformacionoj zoni (slika 2.4). Skvamozni epitel grlića materice je povezan sa epitelnim tkivom vagine preko vaginalnih svodova i oblaže egzocerviks do spoja sa cilindričnim epitelom endocerviksa. Granica između pločasto-slojevitog i cilindričnog epitela se pomera tokom života procesom metaplazije.

Osnovni parametri u dijagnostici su:

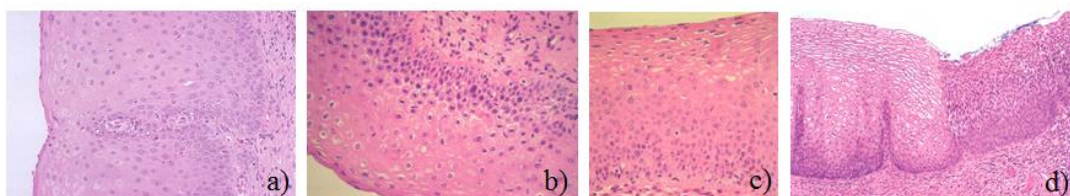
1. Diferencijacija ćelija
2. Jedarna atipija
3. Mitotska aktivnost



**Slika 2.4** Transformaciona zona grlića materice na kojoj se nalazi mesto promene skvamoznog epitela u kolumnarni epitel [38]



Diferencijacija ćelija predstavlja različit izgled ćelija u odnosu na normalni. Jedarna atipija predstavlja najpouzdaniji kriterijum. Smatra se da je jedan od osnovnih razloga što do atipije dolazi aneuploidni DNK sadržaj. Kod skvamoznih intraepitelnih lezija jedra su uvećana, hiperhromatična, nepravilna i nejednaka, a moguće je i prisustvo višejedarnih ćelija. Kod skvamoznih intraepitelnih lezija povećan je broj mitozna, a značajan je i njihov položaj u odnosu na slojeve epitela, kao i pojava patoloških mitotskih figura. Kod LSIL (CIN I i HPV lezija) diferencijacija je prisutna u gornje dve trećine epitela, jedarna atipija lakog stepena nalazi se u bazalnoj trećini i broj mitozna je blago povećan u bazalnoj trećini epitela. Kod HSIL (CIN II i CIN III) diferencijacija je prisutna u gornjoj polovini ili samo u gornjoj trećini epitela, jedarna atipija je jače izražena u svim slojevima epitela, dok su mitoze brojne i prisutne u svim slojevima epitela (slika 2.5) [35].



**Slika 2.5** a) Histološka slika normalnog cervikalnog skvamoznog epitela, b) Histološka slika CIN I – displastične ćelije zauzimaju manje od trećine skvamoznog epitelno sloja iznad bazalnog sloja, c) Histološka slika CIN II – displastične ćelije zauzimaju od jedne trećine do polovine debljine epitela, bazalni sloj je netaknut, d) Histološka slika CIN III – ozbiljna cervikalna skvamozna displazija koja se širi od centra na desno. Jedra displastičnih ćelija su veća, tamnija, a displastične ćelije su neorganizovano raspoređene u epitelu. Iako se displastične ćelije nalaze duž cele debljine epitela, bazalna membrana nije probijena [39].

#### 2.1.6 HPV DNK TESTIRANJE

Primarni etiološki faktor u genezi karcinoma grlica materice je infekcija određenim tipom Humanog papiloma virusa. Upravo je ovaj odnos između HPV

infekcije i invazivnog karcinoma grlića materice iskorišćen za razvoj molekularnih tehnologija za virusnu detekciju kako bi se uveo novi skrining test koji bi prevazišao ograničenja postojećih citoloških testova koje nemaju dovoljno visoku senzitivnost.

Postoji više od 40 različitih HPV virusa koji inficiraju anogenitalnu regiju. Utvrđeni su HPV tipovi visokog onkogenog rizika koji uključuju tipove: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59 i HPV68. Utvrđeno je i da su dva visoko-rizična HPV tipa, tip 16 i 18, zaslužna za oko 70% karcinoma grlića materice [14]. Najonkogeniji HPV tip je tip 16 i zaslužan je za oko 55-60% svih cervikalnih kancera. Sledeći je HPV tip 18 koji je zaslužan za oko 10-15% karcinoma, a preostalih 25-35% karcinoma izazvano je prisustvom preostalih 10 tipova HPV [40]. Pokazano je da infekcija izazvana sa više tipova HPV kod žena starosne dobi od 31-65 ima više izgleda za abnormalnom citologijom nego infekcija izazvana jednim HPV tipom [41]. FDA je u martu 2014. godine predložila primenu HPV DNK testa kao primarnog skrining testa, pri čemu se pacijenti koji imaju HPV 16 i 18 šalju direktno na kolposkopiju, a pacijenti pozitivni na druge visokorizične HPV tipove, na citološku trijažu. HPV infekcije se najčešće spontano očiste, naročito kod mlađih žena i zato detekcija HPV infekcije može dovesti do nepotrebnih kolposkopija, psihičkog stresa i povećanih troškova lečenja.

Pokazano je da primarni skrining vrHPV testom detektuje veći broj CIN2/3 i kancera u poređenju sa citologijom pri čemu je granica ASC-US ili LSIL, ali i da HPV test ima manju specifičnost od citologije. Takođe, incidencija CIN3 i kancera kod žena starijih od 30 godina koje su vrHPV negativne znatno je manja od incidencije kod žena koje imaju citološki negativan rezultat [42].

ACS (American Cancer Society) predlaže da se HPV DNK test koristi u kombinaciji sa citologijom za skrining žena starijih od 30 godina i za trijažu žena sa sumnjivim citološkim nalazom (ASC-US) [40]. S druge strane Evropske preporuke iz 2010. godine predlažu korišćenje HPV DNK testa za praćenje žena koje su lečene od CIN-a da bi se predvideo uspeh lečenja, kao testa koji će se koristiti za trijažu ASC-US

slučajeva, ali i kao primarne skrining metode [22]. U poslednjih 10 godina razvijeno je preko 125 HPV testova, ali nije potvrđena klinička upotrebna vrednost svih pa samo nekoliko ima dozvolu za kliničku upotrebu. HPV testovi: Hybrid Capture-2 (HC2) i GP5+/6+ PCR enzyme immunoassay (EIA) evaluirani su u više dugotrajnih studija i smatra se da su ova dva testa potpuno klinički i epidemiološki ispitani, pa se tako u odnosu na njih definišu norme koje treba da zadovoljavaju novi HPV testovi u pogledu senzitivnosti i specifičnosti, kao i ponovljivosti. Neki od HPV testova koji zadovoljavaju ove uslove su: Abbot RT hrHPV test, Cobas 4800 HPV test, PapilloCheck HPV-Screening test, BD Onclarity HPV assay, HPV-Risk assay, APTIMA assay, pri čemu na primer APTIMA (USA) ima sličnu senzitivnost, ali veću specifičnost od HC2, ali potrebne su dodatne studije koje će pratiti razvoj bolesti u narednim godinama, kako bi se potvrdila ova tvrdnja [42-44]. Najčešće korišćeni komercijalni HPV testovi prikazani su u tabeli 2.2.

**Tabela 2.2** Savremeni komercijalni HPV testovi [45]

HPV testovi	Proizvođač	Trenutni status
Hybrid Capture® 2(HC2) HPV DNA Test	QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD, USA	US FDA-odobren (2003)
EIA kit HPV GP HR	Diassay, Rijswijk, Netherlands	Klinički validiran
Cervista® HPV HR Test	Hologic, Madison, WI	US FDA-odobren (2009)
CareHPV™ Test	QIAGEN Inc., Gaithersburg, MD, USA	Klinički validiran
cobas® 4800 HPV Test	Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA	US FDA-odobren (2011)
RealTime High Risk HPV test	Abbott Molecular, Des Plaines, IL	Klinički validiran
Cervista HPV 16/18 Test	Hologic, Madison, WI	US FDA-odobren (2009)
PapilloCheck® HPV-Screening Test/High-risk Test	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany	Klinički validiran
Clart® HPV 2 – Papillomavirus Clinical Arrays	Genomica, Coslada, Spain	Široko korišćen test
APTIMA® HPV Test	Gen-Probe Inc., San Diego, CA	US FDA-odobren (2011)

## 2.2 OPTIČKO ISPITIVANJE EPITELNOG TKIVA GRLIĆA MATERICE

Konvencionalne skrining metode koje se koriste u kliničkoj praksi su vremenski zahtevne i skupe. Kao takve, ove medicinske tehnike su dostupne samo jednom ograničenom delu svetskog stanovništva. Skrining i detekcija bi mogli biti značajno unapređeni optičkim metodama koje su zastupljene u savremenim naučnim istraživanjima, ali koje još uvek nisu našle mesto u kliničkoj praksi. Optičke metode omogućavaju vizuelizaciju strukture tkiva i metabolizma na subćelijskom nivou, obezbeđujući na taj način funkcionalne informacije neophodne za identifikaciju prekanceroznih lezija. Optičke metode spektroskopije kao što su Ramanova spektroskopija, FTIR (Fourier Transform Infrared) i fluorescentna spektroskopija pokazale su se kao dobre alternativne metode za detekciju neoplastičnih promena u tkivu. Ove metode su brze, objektivne i mogu se razviti za *in vivo* skrining bolesti čime bi potencijalno isključile potrebu za izvođenjem bolne biopsije ukoliko bi se njihova tačnost približila ili izjednačila sa histopatologijom. Glavne prednosti ovih metoda se ogledaju u tome što one mogu da obezbede informacije o biohemijskim, strukturnim i patofiziološkim promenama koje se javljaju u tkivu. Karcinom grlića materice je tip maligniteta koji je u velikom broju studija ispitivan optičkim spektroskopskim metodama i to najviše FTIR, Raman i fluorescentnom spektroskopijom [45-48].

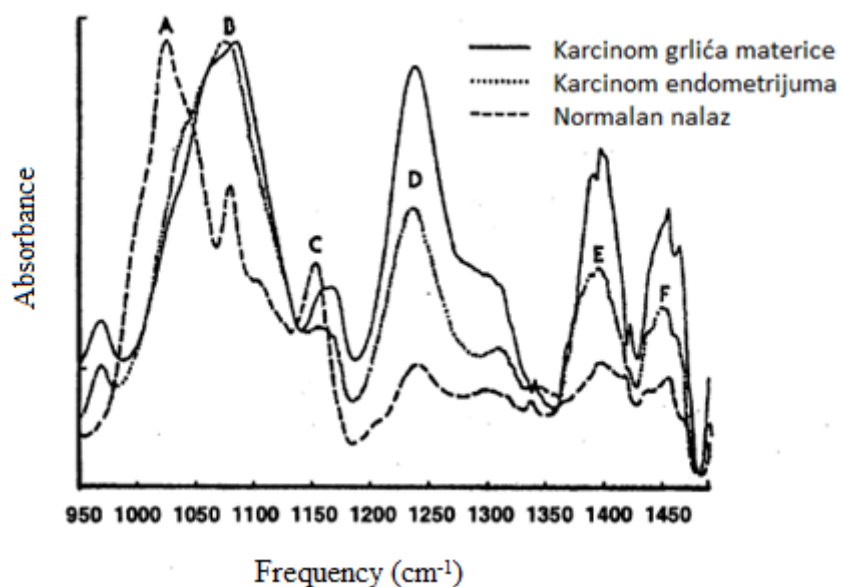
Dijagnostički kriterijumi na osnovu kojih FTIR spektar može razlikovati normalne od abnormalnih ćelija su promene različitih spektralnih parametara kao što je pozicija pikova, forma pikova, kao i odnosi intenziteta reflektanse/transmitanse koji su rezultat strukturnih promena na molekulskom nivou u ćelijama grlića materice.

Prema rezultatima istraživanja Sindhuphak et al, FTIR je dala visoku senzitivnost (96,3%) i specifičnost (96,4%), kao i dobru stopu lažno negativnih rezultata (3,7%) u detekciji karcinoma grlića materice. Pokazano je da postoji značajan šift talasnih brojeva na kojima se javljaju pikovi u spektrima normalnih i abnormalnih uzoraka (tabela 2.3) [46].

**Tabela 2.3** Srednja vrednost talasnih brojeva na kojima se javljaju pikovi (srednja vrednost  $\pm$  SD) normalnih i abnormalnih spektara i nosioci glavnih udela [46]

Taladni broj pikova ( $\text{cm}^{-1}$ )	Abnormalne ćelije	Normalne ćelije	Najveći udeo
A	$1027.16 \pm 4.32$	$1024.97 \pm 1.01$	Glikogen
B	$1081.60 \pm 1.96$	$1080.25 \pm 0.36$	Nukleinska kiselina
C	$1158.78 \pm 4.91$	$1155.66 \pm 0.96$	Ugljovodonik
D	$1236.86 \pm 1.70$	$1239.54 \pm 1.95$	Nukleinska kiselina
E	$1405.21 \pm 9.42$	$1414.48 \pm 7.72$	Protein
F	$1455.06 \pm 2.96$	$1454.37 \pm 2.43$	Protein
G	$1544.47 \pm 4.24$	$1547.33 \pm 2.76$	Protein (amidi II)
H	$1652.12 \pm 9.41$	$1647.63 \pm 11.84$	Protein (amid I)

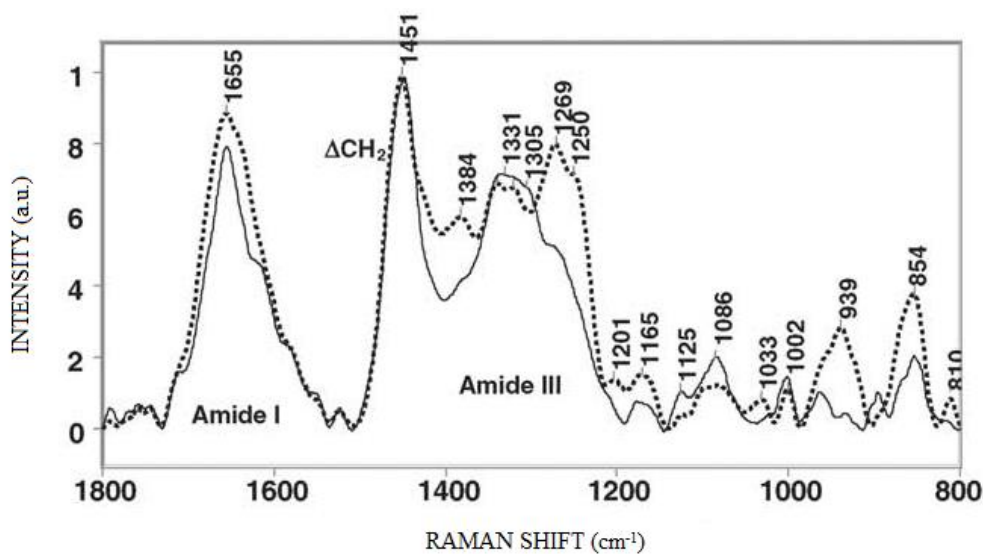
Reprezentativni FTIR spektri normalnih i abnormalnih cervikalnih uzoraka prikazani su na slici 2.6. Pikovi sa oznakama A-F javljaju se na talasnim brojevima  $1025 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1080 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1156 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1240 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1414 \text{ cm}^{-1}$  i  $1454 \text{ cm}^{-1}$  ( $9756 \text{ nm}$ ,  $9259 \text{ nm}$ ,  $8650 \text{ nm}$ ,  $8065 \text{ nm}$ ,  $7072 \text{ nm}$  i  $6878 \text{ nm}$ ), respektivno.



**Slika 2.6** FTIR spektar karcinoma grlića materice, karcinoma endometrijuma i zdravog tkiva [46]

S druge strane, visoka prostorna rezolucija (do 1  $\mu\text{m}$ ) koja se može postići Ramanovom spektroskopijom, korišćenje manje štetnog NIR zračenja, mogućnost primene u *in vivo/in situ* merenjima i rezultati istraživanja predstavljeni u studijama u kojima je ispitivana dijagnostička efikasnost ove metode ukazuju na veliku mogućnost primene Ramanove spektroskopije kao neinvazivne dijagnostičke metode za detekciju karcinoma grlića materice.

Tipičan Ramanov spektar normalnog i malignog tkiva (slika 2.7) prikazuje jasne razlike u spektralnim profilima ova dva stanja. Široki opseg amida I i pikovi na 1384, 1269, 939 i 854  $\text{cm}^{-1}$  koji karakterišu normalan spektar, ne javljaju se u spektru malignog tkiva. Raman spektroskopija tkiva zahvaćenog karcinomom grlića materice opisana je smanjenjem nivoa kolagena/elastina i relativnim povećanjem nivoa lipida, nukleinskih kiselina i ugljovodonika [47].



**Slika 2.7** Ramanov spektar (srednja vrednost) normalnog tkiva (tačkasta linija) i malignog tkiva (tanka linija) [47]

Potencijal NIR Ramanove spektroskopije u oblasti talasnog broja 2800-3700  $\text{cm}^{-1}$  primenjene u *in vivo* dijagnostici i detekciji prekanceroznih stanja grlića materice prikazan je u studiji u kojoj je korišćenjem algoritma na bazi analize glavnih komponenti i linearne diskriminantne analize, zajedno sa metodom unakrsne validacije, pokazano da Ramanova spektroskopija postiže dijagnostičku senzitivnost od 93.5% i specifičnost od 97.8% za detekciju displastičnog stanja

tkiva [48]. Nešto niža senzitivnost (72.5%) i specifičnost (89.2%) dobijeni kombinacijom Ramanove spektroskopije i GA-PLS-DA (Genetic Algorithm-partial least squares-discriminant analysis), kao i dovoljno visoki procenat tačnosti ukazuju na kliničku upotrebljivost ove metode [49].

Fluorescentna spektroskopija je često korišćena i testirana optička metoda za *in vivo* detekciju bolesti uopšte, a specijalno kancera. Biofizičke promene koje prate displastične promene u tkivu često dovode do izmene optičkih karakteristika tkiva. Fluorescentna spektroskopija kao optička metoda koja je osetljiva na takve promene, može doprineti razvoju kvalitativnog, neinvazivnog dijagnostičkog alata koji bi u realnom vremenu omogućio detekciju karcinoma grlića materice. Fluorescentna spektroskopija meri široki opseg optičkih karakteristika tkiva koje su osetljive na promene na molekularskom nivou, a do kojih dolazi usled širenja displazije. Različiti endogeni fluorescentni molekuli u tkivu apsorbuju ekscitaciono svetlo što dovodi do emisije fluorescentnog svetla. Biohemijske i morfološke promene povezane sa prekanceroznim stanjem unose poremećaje u procese apsorpcije i rasejanja, pa samim tim utiču i na fluorescentna svojstva tkiva [35]. Više od 85% kancera potiče iz epitelnog tkiva, dok ostatak od 15% pripada nekoj od sledećih grupa kancera: sarkoma, leukemija, limfoma i mijeloma, kanceri centralnog nervnog sistema. Većini epitelnih kancera prethode prekancerozne promene koje zahvataju površinski epitel i stromu. U dosadašnjim ispitivanjima primene fluorescentne spektroskopije u dijagnostici kanceroznog tkiva grlića materice utvrđeno je da su statistički značajni indikatori displazije povećano rasejanje svetla u epitelnom tkivu i apsorpcija u stromi koja potiče od hemoglobina.

Sve navedene optičke metode imaju potencijal da postanu deo alata za ranu dijagnostiku kancera. Međutim, još uvek ne postoji dovoljan broj podataka koji bi ukazao na to koja od ovih metoda bi mogla da pruži najefikasnije rezultate u skriningu i dijagnostici. Trenutno postoji velika potreba za metodom koja bi bila automatizovana, osetljiva i objektivna kako bi omogućila identifikaciju prekursora karcinoma sa dovoljnom tačnošću.

### 3. UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

#### 3.1 NEDOSTACI POSTOJEĆIH METODA U DIJAGNOSTICI

Uvođenjem Papanikolau testa u kliničku praksu šezdesetih godina prošlog veka značajno je smanjena incidencija i smrtnost kao posledica obolevanja od karcinoma grlića materice. Uspeh ove dijagnostičke metode u zdravstvu na globalnom nivou je neosporan, ali nedostatak koji se ne može zanemariti jeste da je ova metoda subjektivna i da se oslanja na ekspertizu tehničara koji priprema mikroskopske slajdove i patologa koji ih pregleda. Nepravilno prikupljanje uzoraka, fiksiranje i bojenje, tumačenje rezultata i zamor koji se javlja usled pregledanja velikog broja mikroskopskih pločica sa uzorcima ćelija grlića materice su faktori koji mogu dovesti do pogrešno postavljenih dijagnoza. Dok je specifičnost Papanikolau testa visoka (95-99%), svi malopre navedeni faktori prouzrokuju nisku senzitivnosti Papanikolau testa, koja se kreće u opsegu od 50% do 85% i dovodi do postavljanja velikog broja lažno negativnih dijagnoza [50].

Iako je uvođenjem Papanikolau testa u programe za rano otkrivanje karcinoma grlića materice postignuto značajno smanjenje incidencije cervikalnog karcinoma u razvijenim zemljama, u slabo razvijenim zemljama gde se javlja više od 80% slučajeva karcinoma grlića materice od ukupnog broja obolelih u svetu, citološki skrining je skup i logistički komplikovan za implementaciju. Zato se u slabo razvijenim zemljama kao alternativni skrining test često koristi vizuelni pregled sa sirćetnom kiselinom, jer je jednostavan i jeftin. Vizuelni pregled sa sirćetnom kiselinom bazira se na upotrebi 3-5% sirćetne kiseline koja kad se primeni na grlić boji displastični epitel u belo i tako ga čini vidljivim za evaluaciju golim okom. Studije skorašnjeg datuma prijavljuju senzitivnost vizuelne inspekcije koja se kreće od 21,9 - 96% i specifičnost od 37 - 98%, što ukazuje na veliku subjektivnost testa, ali i zadovoljavajući procenat senzitivnosti i specifičnosti za korišćenje ove metode u delovima sveta gde ne postoje uslovi za izvođenje zahtevnijih skrining testova [51-54]. Uvođenje skrininga na bazi HPV testiranja i vakcinacije protiv onkogenih HPV tipova u slabo razvijene zemlje za sada nije moguće, pre svega zbog cene ovih



testova, ali i zbog neodgovarajuće infrastrukture. Zato se danas razvijaju jeftiniji HPV DNK testovi koji su tehnološki dostupniji i lakši za izvođenje, kao što je careHPV koji je u studiji sprovedenoj u Indiji, Nikaragvi i Ugandi, pokazao zadovoljavajući stepen tačnosti. Senzitivnost cervikalnog careHPV testa za detekciju CIN2+ iznosila je u proseku 81.5%, a za detekciju CIN3+ iznosila je 85.3%, dok je specifičnost ovog testa iznosila 91.6% [54]. Međutim, iako bi u idealnoj situaciji korišćenje HPV DNK testa značajno poboljšalo trenutno stanje u nerazvijenim zemljama, upotreba citološkog testa se i dalje ne može izbeći, što kao trijažnog testa, što kao primarnog testa kod žena mlađih od 30 godina.

U cilju povećanja tačnosti izvornog Papanikolau testa tokom proteklih nekoliko decenija radilo se na poboljšanju ove metode i kao rezultat razvijena je citologija na tačnoj bazi. Uvođenje LBC u kliničku praksu za skrining prekursora kancera grlića materice, revolucionarizovalo je tradicionalni Papanikolau test. Prednost LBC u odnosu na konvencionalni Papanikolau test je u tome što se ostatak uzorka koji se ne iskoristi za citološko testiranje može iskoristiti u složenijim slučajevima za HPV testiranje. Iako je LBC metoda znatno doprinela boljoj pripremi uzoraka i samim tim smanjila broj nezadovoljavajućih uzoraka, studije pokazuju različite rezultate u slučaju kada treba prosuditi da li se korišćenjem LBC tehnike postiže veća senzitivnost i specifičnost u poređenju sa konvencionalnom citologijom. Uticaj LBC tehnike na smanjenje nezadovoljavajućih Papanikolau razmaza, u odnosu na konvencionalnu citologiju priznata je u brojnim studijama [17, 32]. I dok deo kliničkih studija predlaže LBC kao senzitivniju od tradicionalnog Pap testa u detekciji cervikalnih skvamoznih intraepitelnih lezija, druge studije nisu uspele da dokažu ove tvrdnje [31, 55-59].

Činjenica da je svaki karcinom grlića materice povezan sa visoko-rizičnim HPV tipovima omogućava ranu detekciju karcinoma grlića materice i daje prednost molekularnim testovima u odnosu na druge skrining testove, u cilju prevazilaženja ograničenja povezanih sa citološkim testovima. Od trenutka uvođenja Papanikolau testa u kliničku praksu, pregledi su se sprovodili uglavnom na godišnjem nivou, pri čemu bi u slučaju pozitivnog rezultata pacijentkinja bila upućena na kolposkopiju sa ili bez biopsije i ukoliko bi to bilo potrebno, na dalje lečenje. Danas je ova

jednostavna praksa zamenjena komplikovanim procedurama sa preporukama koje variraju od države do države. Naime, nakon odluke FDA da odobri da se HPV test koristi kao primarni skrining test umesto citologije u Martu 2014. godine, saveti Svetske Zdravstvene Organizacije po pitanju procedura skrining programa su postali kompleksniji i sve dok se u potpunosti ne sprovede tranzicija, postojaće nedoslednosti u organizovanju programa, protivrečnost rezultata i teškoća u tumačenju različitih kombinacija rezultata i dijagnostičke procedure koja sledi [60]. Takođe, postoji i problem koji se ogleda u definisanju vremenskog intervala u kojem bi trebalo ponavljati skrining testove, uzevši u obzir studije koje predviđaju porast rizika od nastajanja karcinoma grlića materice nakon negativnih HPV i LBC testova sa povećanjem skrining intervala [33]. HPV testiranje bi imalo poseban značaj u okruženjima u kojim se žene podvrgavaju skriningu samo jednom ili dvaput u životu, s obzirom da pored toga što ovo testiranje identifikuje žene koje imaju cervikalno oboljenje, HPV DNK test identifikuje i žene koje imaju rizik za razvijanje CIN u narednih 3-10 godina, što je posebno važno za zemlje u razvoju koje nemaju dovoljno sredstava da skriningu podvrgnu sve žene u intervalu od 5 do 10 godina.

Prednost korišćenja HPV DNK testa kao primarnog skrining testa ogleda se u većoj senzitivnosti za detekciju CIN2+ u odnosu na senzitivnost Papanikolau testa (94,6% u odnosu na 55,4%) [61]. Međutim, naučnici i lekari još uvek nisu dali konačan odgovor na pitanje: da li je bolje HPV DNA testiranje koristiti kao primarni skrining test ili u kombinaciji sa citološkim testom? HPV testiranje na onkogene tipove može se razmotriti kao primarni test za skrining umesto citologije ili kotestiranja i ima potencijal da smanji broj obolelih i umrlih od karcinoma grlića materice, ali još uvek postoje pitanja koje treba razrešiti, a tiču se primarnog HPV testiranja kod žena mlađih od 30 godina i trijaže pacijentkinja sa pozitivnim rezultatima [62]. Takođe, HPV DNA test ne može da utvrdi da li je infekcija HPV prolazna ili ne, pa može da proizvede veliki broj nepotrebnih uputa na dalja ispitivanja, što predstavlja dodatni trošak i stres za pacijenta. Nedavno objavljena studija koja poredi efikasnost HPV testa sa efikasnošću Papanikolau testa, u retrospektivnoj analizi pacijenata sa histološki dijagnostikovanim karcinomom

grlića materice kojima je u godini koja je prethodila dijagnozi urađen HPV i/ili Papanikolau test, pronalazi da je HPV test bio negativan kod 9.8% žena u kratkom periodu pre dijagnoze karcinoma. Papanikolau test je u ovoj studiji imao i nešto veći procenat lažno negativnih rezultata (16,7%). Negativne vrHPV rezultate autori objašnjavaju nedostatkom ćelija lezija u prikupljenom uzorku, ali i činjenicom da postoje tumori (kao što su neki neobični tipovi adenokarcinoma) koji nisu etiološki povezani sa HPV i stoga takvi nalazi mogu biti smatrani tačno negativnim. Treći razlog negativnih HPV testova u slučaju histološki potvrđenih karcinoma grlića materice, jesu određeni tipovi HPV koji mogu izazvati mali broj karcinoma a koji nisu obuhvaćeni HPV testom. Moguća objašnjenja pojave negativnih Papanikolau testova kod žena sa kancerom, obuhvataju nedovoljno dobro uzimanje cervikalnog uzorka kao i pogrešno tumačenje uzorka [63].

Prema podacima istraživanja u kojem su obrađeni rezultati četiri odvojene kontrolisane studije u cilju poređenja učinka HPV DNK testa i citologije kao pojedinačnih skrining testova, pokazano je da se specifičnost HPV DNK testa povećava sa godinama pacijenta. Dok u grupi žena od 20 do 34 godine citologija ima značajno veću specifičnost od HPV DNK testa, u grupi žena starijih od 30 godina, specifičnosti ova dva testa se gotovo preklapaju pri detekciji CIN2+. Na osnovu ovih rezultata, autor istraživanja predlaže korišćenje HPV DNK testa kod žena starijih od 30 godina. Skrining HPV DNK testom u populaciji žena mlađih od 30 godina mogla bi dovesti do tretiranja prolaznih HPV infekcija i nepotrebnog daljeg lečenja. Ova studija takođe prijavljuje da HPV DNK ima veću senzitivnost od citologije u detekciji CIN2+ nakon jednog završenog kruga skrininga [64]. I drugi autori ispitivali su efikasnost skrininga na bazi HPV DNK testa kao meru prevencije invazivnog karcinoma i predlažu skrining na bazi HPV DNK testa sa trijažom u intervalu od 5 godina, što bi smanjilo broj nepotrebnih kolposkopija i biopsija u poređenju sa češćim citološkim pregledima [65].

Rezultati velike ATHENA trogodišnje studije koja je započeta u Sjedinjenim Američkim Državama 2008. godine sa ciljem da oceni primarno HPV skrining testiranje žena starijih od 25 godina i da odredi koje HPV pozitivne žene bi trebalo da se upućuju na kolposkopiju, potvrđuje da HPV DNK test kao primarni skrining

test ima veću senzitivnost u poređenju sa citologijom i da kotestiranje obezbeđuje minimalnu povećanu zaštitu od razvoja CIN2+ ili CIN3+ u poređenju sa HPV primarnim skriningom [66]. HPV test na tipove 16 i 18 bi trebalo koristiti kao dodatni skrining test kod žena starijih od 30 godina, naročito kod onih žena koje imaju negativni citološki rezultat, dok je testiranje na druge visoko rizične HPV tipove preporučljivo s obzirom da su oni zaslužni za 30 % slučajeva karcinoma grlića materice [14].

Iako brojne aktuelne studije pokazuju da se najbolja optimizacija specifičnosti i senzitivnosti postiže kombinacijom HPV DNK testa sa citologijom, sa stanovišta troškova, kotestiranje doprinosi dupliranju cene skrininga s obzirom da se koriste dva testa. Takođe, istovremeno izvođenje dva testa komplikuje dalju proceduru praćenja pacijenata.

Uočavanje kritične uloge HPV infekcije u razvoju karcinoma grlića materice otvorilo je put razvitku vakcine protiv HPV kao mere preventive u borbi protiv ove opake bolesti [67]. Podatak da je skoro 100% karcinoma grlića materice povezano sa prisustvom HPV virusa ukazuje na uticaj koji bi vakcina protiv HPV mogla da ima u budućnosti [68-70]. Vakcinisanje devojčica, pa i dečaka, koji su prenosioci ovog virusa, protiv HPV tipova koji izazivaju oko 70% karcinoma grlića materice, postalo je dodatna mogućnost u okviru programa prevencije karcinoma grlića materice, ali glavni uticaj ove mere biće poznat tek za nekoliko decenija kada devojčice koje su sada vakcinisane budu imale trideset i četrdeset godina. Iako bi vakcinacija protiv HPV mogla da predstavlja najbolju preventivnu strategiju, skrining i dalje mora biti nastavljen, jer neće sve žene primiti vakcinu, a takođe i žene koje su već izložene HPV infekciji ne mogu imati koristi od vakcine. Takođe, postojeće vakcine ne pružaju zaštitu od svih onkogenih HPV tipova i zato je skrining neophodan čak i za vakcinisane žene.

### 3.2 UOČAVANJE PROBLEMA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Čak i ako bi svi navedeni savremeni skrining testovi postali potpuno dostupni populaciji u zemljama sa najvećim procentom slučajeva karcinoma grlića materice, bio bi rešen jedan aspekt problema, a to je visoka incidencija karcinoma na globalnom nivou, dok problem tačnosti ovih skrining testova i dalje ne bi bio rešen.

Skrining testovi za detekciju karcinoma grlića materice su efikasni, ali nisu statistički zadovoljavajuće tačni. Može se desiti da pacijent dobije rezultat testa koji ukazuje na prisustvo abnormalnih ćelija, a ćelije su zapravo normalne (lažno pozitivan nalaz) ili da je nalaz normalan, a zapravo su prisutne abnormalnosti koje nisu detektovane (lažno negativan nalaz). Ograničenje postojećih skrining testova se ogleda i u tome što oni ne mogu utvrditi da li je HPV infekcija prolazna i stoga upućuju na mnogo veći broj kolposkopija što predstavlja dodatni psihički teret za pacijenta i trošak za državu. Većina HPV infekcija je prolazna i dovodi do privremenih promena u cervikalnim ćelijama, pa zato prečesti skrining može detektovati HPV infekcije ili promene na cervikalnim ćelijama koje nikada neće izazvati kancer. Takođe, kontrolni testovi i lečenje mogu biti neugodni, a neki vidovi lečenja koji uključuju uklanjanje tkiva grlića materice, kao što su LEEP i konizacija imaju potencijal da oslabe grlić materice, mogu uticati na plodnost i blago povećati rizik od prevremenog porođaja u zavisnosti od toga koliko je tkiva uklonjeno.

Naučni cilj ove doktorske disertacije je istraživanje epitela grlića materice pomoću Optomagnetne imidžing spektroskopije i razvijanje automatizovanog algoritma za razvrstavanje stanja epitela grlića materice po grupama kako bi se poboljšala preciznost konvencionalnih metoda dijagnostike uz uštedu vremena i novca.

Polazi se od činjenice da su postojeće metode za dijagnostiku stanja cervikalnog epitelnog tkiva, naročito karcinoma grlića materice, subjektivne – zavise od stručnosti lica koje ih izvodi, vremenski su zahtevne i skupe. Naročito je važno uočiti da i pored velikog značaja konvencionalnih metoda u smanjenju broja

obolelih od ove bolesti i dalje postoji problem lažno negativnih nalaza u dijagnostici. Korišćenjem fenomena interakcije svetlosti i materije, odnosno tkiva, dobijamo informaciju o karakteristikama tkiva na osnovu kojih možemo izvršiti klasifikaciju po grupama. Realizacija automatizovanog algoritma za klasifikaciju na osnovu podataka o stanju cervikalnog epitelnog tkiva stvorila bi uslove za prevazilaženje problema subjektivnosti postojećih metoda, dok bi inovacija u vidu eliminisanja procesa bojenja uzoraka koji je sastavni deo Papanikolau metode za dijagnostiku karcinoma grlića materice, dovela do znatne uštede u vremenu i novcu.

Ciljevi istraživanja mogu se sažeti u sledeće tri celine:

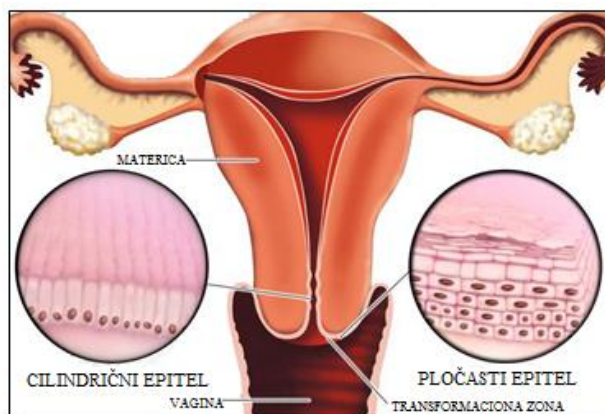
1. Ispitivanje epitela grlića materice Optomagnetnom imidžing spektroskopijom
2. Utvrđivanje mogućnosti ispitivanja uzoraka ćelija grlića materice koji nisu bojeni
3. Razvijanje algoritma za automatsko razvrstavanje stanja epitela grlića materice po grupama

## 4. MATERIJAL

### 4.1 ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA EPITELA GRLIĆA MATERICE

Grlić materice (*cervix uteri*) je suženi, donji deo materice, čija je dužina oko 3 cm kod žena koje nisu rađale, a oko 2 cm kod žena koje su rađale. Grlić materice ima oblik cilindra i deli se na dva dela: gornji, slobodni, nadvaginalni (*portio supravaginalis*) i donji vaginalni deo (*portio vaginalis*). Gornji deo grlića materice napred je u vezi sa dnom mokraćne bešike, a pozadi sa prednjim zidom rektuma. Na vrhu grlića materice nalazi se otvor (*ostium uteri*) koji vodi u šupljinu materice. Ovaj otvor je okrugao kod žena koje nisu rađale, dok je oblika horizontalne pukotine dužine 10-15 mm kod žena koje su rađale.

U grliću materice se nalazi kanal grlića materice (*canalis cervicis*) koji je vretenastog oblika i dugačak oko 2,5 cm. Vaginalni deo grlića materice je, kao i zid vagine, pokriven pločasto-slojevitim (skvamoznim) epitelom, dok je cervikalni kanal pokriven jednorednim cilindričnim (kolumnarnim) epitelom koji oblaže površinu i glandularne strukture (slika 4.1). Pločasto-slojevit epitel bez orožavanja pokriva vaginalni deo grlića materice (*portio vaginalis*) i nastavlja se epitelom vagine. Sastoji se od 15 do 20 redova ćelija u generativnom periodu, a u trudnoći i do 30 redova.



**Slika 4.1** Prikaz ćelija pločasto-slojevitog epitela, cilindričnog epitela i transformacione zone

Originalni pločasto-slojevit epitel egzocerviksa čine sledeći slojevi: bazalni sloj koji se sastoji od jednog reda nezrelih ćelija sa velikim jedrima i malom količinom citoplazme, parabazalni sloj koji ima dva do četiri reda nezrelih ćelija, intermedijalni sloj koji se sastoji od dva do četiri reda nezrelih ćelija sa velikom količinom citoplazme i superficijalni sloj, koji ima pet do osam redova spljoštenih ćelija sa malim uniformnim jedrima i citoplazmom ispunjenom glikogenom. Uzimanjem brisa za Papanikolau test ispituju se upravo ove ćelije.

Skvamozni epitel vaginalnog dela vrata materice retikulinskim vlaknima je razdvojen od strome i tu zonu ne možemo nazvati bazalnom membranom u klasičnom smislu, već je nazivamo „zona limitans“. Zona limitans ima odbrambenu ulogu. Pločasto-slojevit epitel vaginalnog dela grlića materice ne poseduje ni vezivna vlakna ni krvne kapilare. Ishrana ovog epitela vrši se difuzijom pomoću kapilara. Na osnovu mrežastog rasporeda ovih kapilara mogu se pretpostaviti neki neregularni, pa čak i maligni procesi na grliću materice.

Kanal grlića materice je obložen jednorednim cilindričnim epitelom od svetlih ćelija koje proizvode mukus. Ove ćelije su dugačke 20-35 $\mu$ m, a široke oko 5-9  $\mu$ m. Proksimalni deo je pokriven cilijama, a jedra su postavljena ekscentrično. Ove ćelije su sitne vakuolizovane protoplazme u kojoj se uglavnom nalazi sluz. Deskvamiraju i neotporne su, brzo degenerišu, pa se u razmazu ovih ćelija vidi samo jedro. Uglavnom deskvamiraju u grupama, a njihova pojava u vaginalnom brisu ukazuje na neki patološki proces. Cervikalni epitel podleže transformaciji slično vaginalnom epitelu i najveća proliferacija i sekrecija nastupa u periodu ovulacije. Skvamocilindrična prelazna zona predstavlja spoj pločasto-slojevitog i cilindričnog epitela grlića materice. Prelaz pločasto-slojevitog epitela u cilindrični epitel sastoji se od široke trake ektopičnog cilindričnog epitela koji je prekriven pločastim epitelom.

Procesom metaplazije koji predstavlja pretvaranje cilindričnog epitela u pločasto-slojeviti epitel, nastaje površina koja se zove transformaciona zona. Ova transformacija se odvija na sledeći način: stvaranjem estrogena u ovarijumima na početku menarhe stimuliše se sazrevanje cervikalne i vaginalne skvamozne



mukoze. Kao morfološki odraz ovog sazrevanja javlja se veća količina glikogena u ćelijama pločasto-slojevitog epitela. Kada ove ćelije deskvamiraju glikogen predstavlja supstrat za rast endogenih vaginalnih aeroba i anaeroba, što dovodi do pada vaginalnog pH. S obzirom da je endocerviks osetljiv na promene hemijske okoline i bakterijske flore, on reaguje na te promene transformacijom jednorednog cilindričnog epitela u skvamozni epitel [71].

Nezrele metaplastične ćelije imaju velika jedra i malu količinu citoplazme, bez glikogena. Pri sazrevanju, ove ćelije stvaraju glikogen i formiraju četiri sloja pločasto-slojevitog epitela.

Mesto zone transformacije pomera se tokom života. Ova granica između jednorednog cilindričnog epitela cervikalnog kanala i pločasto-slojevitog epitela grlića materice ne odgovara uvek spoljašnjem ušću materice, osim kod mlađih žena i devojaka. U većini slučajeva, zona transformacije se nalazi ili na egzocerviksu i to kod polno zrelih žena ili u cervikalnom kanalu, odn. endocerviksu u klimakterijumu, a može biti i duboko smešten u senijumu. U transformacionoj zoni nastaju prekancerogene lezije i karcinom grlića materice i zato je veoma važno da se prikupljanje ćelija obavi pravilno kako bi uzorak koji se ispituje sadržao dovoljnu količinu ćelija iz transformacione zone.

## **4.2 FIZIČKE I OPTIČKE OSOBINE EPITELA**

U kliničkoj praksi za dijagnostiku karcinoma grlića materice već se koriste neke od karakteristika ćelija čije promene u slučaju prisustva prekanceroznih i kanceroznih lezija izazivaju čitav spektar promena u optičkim karakteristikama tkiva (apsorpcija, rasejanje, fluorescencija). To su morfološka obeležja epitelnih ćelija, metaboličke aktivnosti i diferencijacija, stromalna angiogeneza i dr. Tako se, na primer, osvetljavanjem tkiva zelenom svetlošću tokom kolposkopskog pregleda omogućava vizuelizacija krvnih sudova, kao posledica pojave da hemoglobin apsorbuje zelenu svetlost (hemoglobin ima karakterističan apsorpcioni spektar sa

pikovima na 420 nm, 542 nm i 577 nm). S druge strane, primena sirćetne kiseline pojačava rasejanje svetlosti neoplastičnih lezija, pa abnormalno tkivo izgleda belje nego normalno kao posledica izmenjene morfologije jedra, optičke gustine i promena u teksturi hromatina. Promene u arhitekturi tkiva, morfologiji ćelija i biohemijskom sastavu umnogome bi mogle da pomognu u detekciji različitih stanja epitelnog tkiva, ali i dalje nisu dovoljno iskorišćene.

U interakciji svetlosti sa tkivom, svetlost može biti apsorbirana sa ili bez reemisije ili rasejanja površinskim ili subpovršinskim interakcijama [72]. Osnovna interakcija svetlosti sa tkivom se odvija kroz elastično rasejanje. Na putu prostiranja svetlosti kroz tkivo, rasejanje će zavisiti od talasne dužine upadne svetlosti i od struktura u tkivu. Teorijski proračuni rasejanja svetlosti u ćelijama otkrili su neke zanimljive činjenice koje se odnose na doprinos jedra rasejanju. Naime, ukoliko se jedro modeluje kao homogena struktura, rasejanje pod velikim uglovima ne menja se značajno sa povećanjem veličine jedra. Međutim, primećuje se veći intenzitet rasejanja pod velikim uglovima u jedru sa većim DNK sadržajem i to upravo zbog rasejanja o njegove unutrašnje strukture. Pokazano je da do 40% ćelijskog rasejanja svetlosti potiče od jedra i da je povratno rasejanje pod uglovima većim od  $110^\circ$  korelisano sa DNK sadržajem ćelija [73]. Drezek et al pokazuje da se intenzitet rasejanja svetlosti o cervikalne ćelije povećava sa progresijom cervikalnih intraepitelnih neoplazija i da se najdrastičnija razlika uočava između CIN 2 i CIN3, gde su najnaglašenije razlike u veličini jedra i DNK sadržaja [74].

Većina prekanceroznih lezija visokog stepena povezana je sa vaskularnim promenama usled razvoja novih krvnih sudova. Takođe, cervikalni prekancer povezan je sa smanjenim stromalnim rasejanjem koje se pripisuje degradaciji kolagenih vlakana usled izlučivanja enzima proteaze. Razlika u rasejanju između zdravog i prekanceroznog epitela pripisuje se povećanoj veličini jedra i promenama u teksturi hromatina koja se javlja u ćelijama kancera [75].

### **4.3 METODE PRIKUPLJANJA MATERIJALA (UZORAKA) ZA ISPITIVANJE**

U ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“, u kojoj su prikupljeni uzorci, za skrining karcinoma grlića materice se koristi konvencionalna Papanikolau metoda, koja podrazumeva prikupljanje uzoraka ćelija grlića materice pomoću drvene špatule i endocervikalne četkice i nanošenje ćelija na staklenu pločicu, nakon čega se ćelije boje i pregledaju pod mikroskopom. Dimenzije staklene pločice su 75mm x 25mm x 1mm.

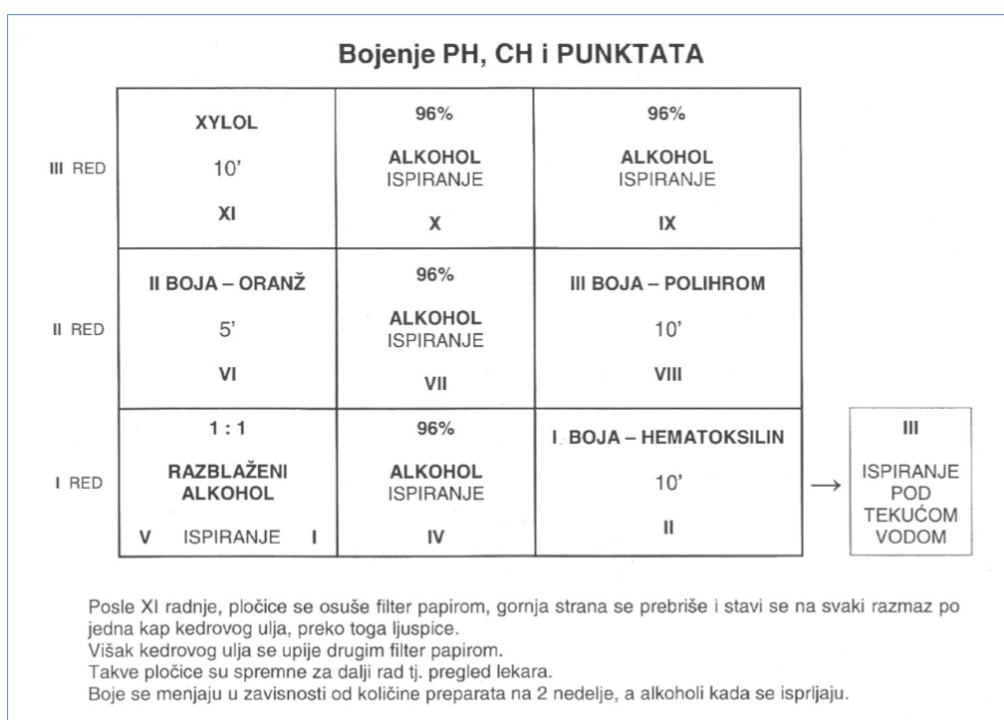
Za potrebe istraživanja u okviru ove doktorske disertacije korišćeni su uzorci ćelija grlića materice koji su prikupljeni i bojeni prema Papanikolau proceduri (bojeni uzorci) i uzorci ćelija grlića materice koji nisu bojeni niti fiksirani (nebojeni uzorci). U oba slučaja, ćelije se prikupljaju četkicama i nanose se na mikroskopske pločice, nakon čega u slučaju bojjenih uzoraka sledi fiksiranje i procedura bojenja koja traje oko 50 minuta. Nakon što je uzorak fiksiran i obojen, može da se razmatra u bilo kojem trenutku s obzirom da je struktura ćelija očuvana fiksiranjem. Nebojeni uzorci koji nisu fiksirani se razmatraju odmah nakon prikupljanja, u roku od 5 minuta.

### **4.4 BOJENI I NEBOJENI UZORCI**

U konvencionalnoj Papanikolau metodi mikroskopski se analiziraju bojeni uzorci kako bi se ustanovile promene koje mogu da ukažu na oboljenje karcinoma grlića materice. Proces bojenja uzorka ćelija grlića materice prema Papanikolau proceduri traje oko 50 minuta u proseku, nakon čega se uzorak šalje patologu na pregled. Na rezultate Papanikolau testa se u privatnim praksama čeka dva dana, dok je taj period nešto duži u državnim ambulancama.

Prvi korak u izvođenju Papanikolau testa je prikupljanje materijala sa egzocerviksa i iz cervikalnog kanala (endocerviks) korišćenjem drvene špatule i endocervikalne četkice, respektivno. Cervikalna četkica se uvodi u cervikalni kanal i istovremeno

rotira i na taj način se prikupljaju deskvamirane ćelije iz cervikalnog kanala. Ćelije se sa četkice nanose na mikroskopsku pločicu u jednom potezu. Drvena špatula služi za prikupljanje cervikalnih ćelija sa cele površine egzocerviksa. Istim postupkom kao kod cervikalne četkice, na mikroskopsku pločicu se u jednom potezu nanosi razmaz. Predmetna pločica se fiksira u 96% alkoholu najmanje 10 minuta, a zatim se boji po metodi Papanikolau hematoksilinom, metiloranžom i polihromom. Po završenom bojenju, na predmetnu pločicu se stavlja kedrovo ulje i pokrovna ljspica, a zatim se pod mikroskopom vrši analiza citološkog preparata (slika 4.2).



**Slika 4.2** Postupak bojenja uzoraka

Bojenje ćelija omogućava uočavanje ćelijskih struktura, jer različite ćelijske strukture imaju različite afinitete prema boji, pa se samim tim različito boje. Jačina obojenosti stuktura zavisi od hemijskog afiniteta objekta prema boji i obrnuto, gustine objekta i permeabilnosti ćelijskih struktura prema boji.

Bojenje je hemijski proces tokom kojeg se obojeni joni boja, koji mogu biti pozitivno ili negativno naelektrisani vezuju za tkivne konstituente. U zavisnosti od naelektrisanja obojenih jona boje će biti obeležene kao kisele ili bazne. Obojeni joni

se vezuju za suprotno naelektrisane grupe ćelijskih struktura. Ribonukleinske kiseline ribozoma su anjonske, pa se vezuju za katjonsku boju metilen plavu ili toluidin plavu. Nukleus je bazofilan, a citoplazma eozinofilna. Pri pH 5-6 citoplazma je katjonska, pa se vezuju za anjonsku boju eozin ili oranž.

Bazne boje nose ukupno pozitivno naelektrisanje, pa se bazne boje vezuju sa ćelijskim komponentama koje su negativno naelektrisane. Tkiva koja se dobro boje baznim bojama se nazivaju bazofilnim. Hematoksilin je bazna boja, a DNK, RNK i neki elementi citoplazme su bazofilni (odnosno fosfati, sulfati i karboksilne grupe u njima). S druge strane, oranž G (OG) i eozin su acidofilni i boje mitohondrije, citoplazmu.

Hematein je kisela boja koja se najčešće upotrebljava u citologiji i histologiji. Hematin se može ekstrahovati iz biljke *Haematoxylon campechianum* Linn, iz čijeg drveta se vadi hematoksilin koji je bezbojan, a oksidacijom postaje crvenkast i zove se hematein. Hematein je oksidisana forma hematoksilina negativno naelektrisana i nalazi se u rastvoru za bojenje koji sadrži sirćetnu kiselinu i  $K_2SO_4Al_2(SO_4)_3 \cdot 24H_2O$ . Uzorak se stavlja u ovaj rastvor i zatim ispira čime se podiže pH, hematin postaje pozitivno naelektrisan, kači se za negativno naelektrisane fosforne grupe DNK i hromatin se boji plavo. Hromatinski materijal se dobro boji baznim bojama, zato se i kaže da je hromatinski materijal bazofilan [76]. Bojenje hematoksilinom obično traje 1 do 2 minuta. Plava boja je zadovoljavajuća, ljubičasta predstavlja nedovoljno bojenje plavom, siva ivice, dok je braon nezadovoljavajuća. Opseg optičke gustine treba da bude dovoljan da se pod uvećanjem mikroskopa od 400 puta vide hromatinski delovi u jedrima skvamoznih ćelija srednjeg sloja. Blaga prebojenost citoplazme je dozvoljena. Jaka obojenost ukazuje na to da je vreme bojenja predugo trajalo ili je rastvor previše koncentrovan.

Oranž G treba da se pojavi kao žuta do nijanse narandžaste (boji keratin), a 15 sekundi do 1 minuta je uobičajeno vreme bojenja. Bojenje sa EA (mešavina eozina, svetlo zelene i Bizmark plave) daje sledeće rezultate: eozin daje pink boju citoplazmi zrelih skvamoznih ćelija, jedarcetu, cilijama; svetlo zelena boja boji

citoplazmu metabolički aktivnih ćelija u plavo (parabazalne skvamozne ćelije, intermedijalne skvamozne ćelije i kolumnarne ćelije). Bizmark plava ne daje karakterističnu boju citoplazmi. EA je problematičan zbog osnovnih ograničenja njegovog hemijskog sastava. U idealnom slučaju, trebalo bi da se vide nijanse zelene i crvene u odvojenim ćelijama. Vreme bojenja manje od 3 minuta najčešće favorizuje upijanje eozina, pri čemu eozin i svetlo zelena često zauzimaju različite oblasti iste ćelije. Većina EA optimalno reaguju u opsegu od 6-8 minuta. OG i EA vremena bojenja su nezavisna, ali će previše vremena u OG zasititi ćelije sa oranž G i blokirati prihvatanje eozina koje sledi.

Na kraju procesa bojenja vrši se čišćenje ksilolom, koji predstavlja bezbojnu, hemijski nereaktivnu supstancu koja ima skoro isti refraktivni indeks (1,494) kao staklo što omogućava najbolju moguću transparentnost slike.

Bojenje obezbeđuje fiksiranje ćelija i očuvanje njihove strukture, pa se takvi uzorci mogu čuvati godinama. U GAK „Narodni Front“ obojeni uzorci se čuvaju godinu dana, nakon čega se uništavaju po propisima zdravstvene i ekološke službe. Nebojeni uzorci ćelija grlića materice, koji se prikupljaju na isti način kao pri izvođenju Papanikolau testa, stavljaju se na mikroskopske pločice, ali se ne fiksiraju niti se boje. Uzorci pripremljeni na ovaj način razmatraju se odmah nakon prikupljanja, a zatim se uništavaju po propisima zdravstvene i ekološke službe.

## 5. METODE I TEHNIKE

Osnovna metoda koja je korišćena u ekperimentalnom delu istraživanja jeste Optomagnetna imidžing spektroskopija (OMIS). Nakon što su prikupljeni, eksperimentalni podaci su podvrgnuti analizi, zatim je izvršena selekcija atributa i klasifikacija podataka različitim metodama mašinskog učenja.

### 5.1 OPTOMAGNETNA IMIDŽING SPEKTROSKOPIJA

#### 5.1.1 Osnovni principi Optomagnetne imidžing spektroskopije

Optomagnetna imidžing spektroskopija je nova metoda za karakterizaciju različitih materijala, sa akcentom na biološke materijale. Do sada, Optomagnetna imidžing spektroskopija korišćena je uspešno u ispitivanju Epstein-Bar virusa, vodoničnih veza i kože [77-79].

Optomagnetna imidžing spektroskopija se bazira na interakciji svetlosti i materije, tačnije bele difuzne svetlosti i valentnih elektrona materije. Proračuni na osnovu orbitalne brzine valentnih elektrona daju odnos magnetnih i električnih sila  $F_M/F_E \approx 10^{-4}$ . Kako je sila u direktnoj relaciji sa kvantnim dejstvom izraženim Plankovom konstantnom,  $h = F \times d \times t$ , gde je  $F$  sila čije su vrednosti u opsegu 0,01 – 1.0 nN,  $d$  pomeraj čije su vrednosti u opsegu 0,1 – 5.0 nm, a  $t$  vreme čije su vrednosti u opsegu  $10^{-8}$ - $10^{-10}$ s, može se zaključiti da su magnetske sile u materiji za četiri reda veličine bliže kvantnom dejstvu od električnih sila. Znajući da su za konformacione promene u materiji primarno zaslužna kvantna stanja bioloških makromolekula, možemo reći da će promene u stanju uzorka biti otkrivene posmatrajući magnetske sile pre nego električne sile [80].

Da bi se detektovale magnetske osobine materije metodom OMIS, koristi se bela difuzna svetlost koja se emituje prvo u pravcu normalnim na uzorak, a zatim pod određenim uglom koji treba da omogući polarizaciju upadne svetlosti u interakciji

sa uzorkom. Ovaj ugao se naziva Brusterov ugao i on omogućava slabljenje većeg dela upadne svetlosti i odbijanje manjeg dela koji postaje polarizovan. Svetlost koja je polarizovana pod Brusterovim uglom gubi deo inteziteta magnetske komponente, pa se oduzimanjem odziva reflektovane polarizovane svetlosti od odziva bele difuzne svetlosti koji sadrži ravnomerno električnu i magnetsku komponentu dobijaju magnetske osobine uzorka (slika 5.1) [80].



**Slika 5.1** Prikaz relativnih pozicija izvora svetlosti za belu difuznu (levo) i reflektovanu polarizovanu svetlost (desno). Stepenn polarizacije svetlosti je 95.4%, dok je razlika između uglova  $\theta$  i  $\theta_1 \pm 1:6^\circ$  (šest belih LED dioda postavljeno je u krug) [78, 80]

### 5.1.2 OMIS uređaj

OMIS uređaj sastoji se od kućišta koje objedinjuje digitalnu kameru (Canon digital camera model IXUS 105, 12.1 MP), sistem za osvetljavanje uzorka i držač uzorka. Sistem za osvetljavanje uzorka sastoji se od šest LED dioda (Lucky Light LL-304WC4B-W2-3PD) poređanih u krug i postavljenih ispred objektiva kamere i obezbeđuje osvetljavanje uzorka belim difuznim svetlom, pri čemu je prečnik vidnog polja 25 mm. Držač uzorka dizajniran je posebno za mikroskopske pločice (slika 5.2).





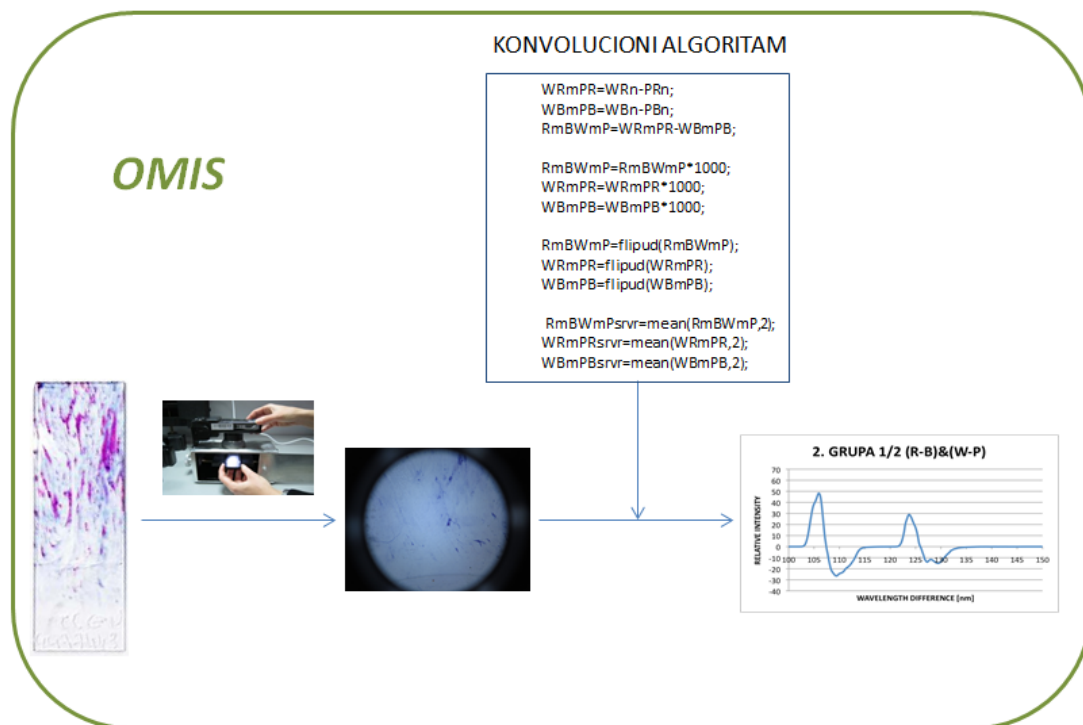
***Slika 5.2** Uređaj B53 razvijen na Mašinskom fakultetu, u Nanolabu – laboratoriji za Biomedicinsko inženjerstvo, koji se koristi za primenu Optomagnetne imidžing spektroskopije u ranoj dijagnostici kancera epitelnog tkiva*

Procedura snimanja uzoraka OMIS metodom je opisana u sledeća tri koraka (slika 5.3):

1. Uzorak na mikroskopskoj pločici se prvo obasjava belom difuznom svetlošću, pri čemu je pravac upadne svetlosti normalan na površinu uzorka i meri se reflektansa koja je upravna na uzorak, odnosno snima se prva digitalna slika uzorka.
2. Uzorak na mikroskopskoj pločici se zatim obasjava belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom i snima se druga digitalna slika uzorka na bazi reflektovane svetlosti koja je polarizovana.

Ovaj postupak se za biološke uzorke ponavlja 20 puta: 10 puta se snima odziv obasjavanja uzorka belom difuznom svetlošću pod pravim uglom i 10 puta se snima odziv obasjavanja uzorka belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom.

3. Nakon što su uzorci snimljeni, digitalne slike uzoraka se obrađuju algoritmom za spektralnu konvoluciju razvijenim u MATLAB® 2013a (MathWorks, USA). Algoritam za spektralnu konvoluciju zasnovan je na dijagramu hromatičnosti nazvanom „Maksvelov trougao“, odnosno na dvodimenzionalnom predstavljanju boja i na aproksimacijama tog dijagrama koje se koriste u digitalnoj fotografiji. Algoritam za spektralnu konvoluciju proizvodi Optomagnetne spektre uzoraka.



**Slika 5.3** Procedura snimanja uzorka Optomagnetnom Imidžing Spektroskopijom: prikupljeni uzorak se nanosi na mikroskopsku pločicu po Papanikolau proceduri, pločica sa uzorkom se postavlja u OMIS uređaj, zatim se slika 20 puta, pod belom difuznom svetlošću i belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom. Digitalne slike uzorka se obrađuju algoritmom spektralne konvolucije u programskom paketu MATLAB koji formira OMIS spektar uzorka

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

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

## 5.2 METODE MAŠINSKOG UČENJA

Mašinsko učenje se fokusira na algoritme koji su sposobni da prilagode svoju strukturu na osnovu skupa posmatranih podataka. Kao takvo, mašinsko učenje obezbeđuje metode koje mogu da posluže kao pomoćne tehnike za rešavanje dijagnostičkih problema u raznim domenima medicine. Mašinsko učenje se u tom smislu koristi za analizu podataka, uočavanje regularnosti u podacima, predikciju progresije bolesti analizom i određivanjem značaja određenih kliničkih parametara, klasifikaciju u dijagnostikovanju bolesti, odabir terapije i dr. Uspešna implementacija metoda mašinskog učenja mogla bi značajno da potpomogne integraciju kompjuterskih sistema u zdravstvene ustanove, a samim tim i da poboljša rad medicinskih stručnjaka.

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćene su različite metode mašinskog učenja za klasifikaciju rezultata dobijenih OMIS metodom u više različitih grupa, odnosno klasa. Definisano je više različitih vrednosti praga između zdravih i bolesnih pacijenata, OMIS podaci su analizirani pomoću PCA metode, dok je klasifikacija uzoraka izvršena pomoću Naive Bayes klasifikatora, metode potpornih vektora (Support Vector Machine - SVM) i Stabla odlučivanja (Decision Trees - DT).

Predikcija klasa je nadgledani metod učenja u kojem algoritam uči iz obučavajućeg skupa podataka (poznatih uzoraka) i utvrđuje pravilo predikcije za klasifikaciju test skupa novih uzoraka. Razvoj algoritma za predikciju klasa sastoji se iz odabira obeležja (atributa) i podešavanja predikcionog modela kako bi se razvilo pravilo klasifikacije korišćenjem obučavajućeg skupa. Primarni kriterijumi za evaluaciju

performanse klasifikacionog algoritma su senzitivnost (sensitivity - SN), specifičnost (specificity - SP) i tačnost (accuracy AC), kao i pozitivna prediktivna vrednost (positive predictive value - PPV) i negativna prediktivna vrednost (negative predictive value - NPV) (tabela 5.1). Senzitivnost je mera tačnosti koja predstavlja proporciju tačno pozitivno klasifikovanih od ukupnog broja obolelih i odnosi se na sposobnost modela/testa/sistema da identifikuje one pacijente koji stvarno imaju bolest:

$$SN = \frac{TP}{TP + LN} \quad [5.1]$$

Specifičnost je mera tačnosti koja se odnosi na sposobnost metode da isključi postojanje bolesti. Izračunava se kao proporcija tačno negativnih od ukupnog broja zdravih:

$$SP = \frac{TN}{LP + TN} \quad [5.2]$$

Tačnost metode/testa se određuje kao odnos tačnih rezultata i ukupnog broja uzoraka:

$$Tačnost = \frac{TP + TN}{N} \quad [5.3]$$

**Tabela 5.1** Određivanje tačnosti metode/dijagnostičkog testa na osnovu zlatnog standarda (TP – tačno pozitivni, LP – lažno pozitivni, LN – lažno negativni, TN – tačno negativni, N – ukupan broj uzoraka)

		STVARNI STATUS BOLESTI NA OSNOVU REFERENTNOG - ZLATNOG STANDARDA		
		OBOLELI	ZDRAVI	
REZULTAT INDEKSNOG TESTA	POZITIVAN	TP	LP	$PPV = \frac{TP}{TP + LP}$
	NEGATIVAN	LN	TN	$NPV = \frac{TN}{LN + TN}$
		$SENZITIVNOST = \frac{TP}{TP + LN}$	$SPECIFIČNOST = \frac{TN}{LP + TN}$	

Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) vezuje se za pacijente koji imaju pozitivan rezultat testa i izračunava se kao odnos broja obolelih i ukupnog broja test pozitivnih:

$$PPV = \frac{TP}{TP + LP} \quad [5.4]$$

Negativna prediktivna vrednost (NPV) vezuje se za pacijente koji imaju negativan test rezultat i izračunava se kao odnos zdravih i ukupnog broja negativnih na testu:

$$NPV = \frac{TN}{LN + TN} \quad [5.5]$$

Na prethodno prikazan način određuju se senzitivnost i specifičnost testova koji imaju dihotoman ishod (pozitivan /negativan rezultat testa). Za testove koji imaju više od dva moguća ishoda, senzitivnost i specifičnost se određuju u odnosu na više mogućih vrednosti praga.

### 5.2.1 ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI

Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis - PCA) je nenadgledani metod za smanjenje dimenzionalnosti podataka [81]. To je jedan od najkorišćenijih metoda za ekstrakciju obeležja. Broj obeležja nekog skupa podataka određuje dimenzionalnost prostora obeležja i kompleksnost problema klasifikacije. S druge strane, podatke je vizuelno lakše analizirati ako je broj obeležja smanjen na dovoljan minimum. Ukoliko imamo fiksnu količinu podataka, veći broj obeležja dovodi do preteranog prilagođavanja podataka.

Ideja ove metode je da podatke predstavi u što manje-dimenzionom prostoru u odnosu na početnu dimenzionalnost, a da se pri tome sačuva varijansa višedimenzionalnog prostora koliko je to moguće. PCA to postiže upravo tako što pronalazi mali broj dimenzija, tj. glavnih komponenti, pri čemu svaka glavna

komponenta predstavlja linearnu kombinaciju originalnih obeležja. Postoji onoliko glavnih komponenti koliko ima originalnih obeležja. Prva glavna komponenta je normalizovana linearna kombinacija originalnih obeležja koja ima najveću varijansu. Druga glavna komponenta je linearna kombinacija obeležja sa najvećom varijansom u odnosu na sve linearne kombinacije koje nisu u korelaciji sa prvom glavnim komponentom. Svaka naredna komponenta može da se definiše na isti način: ona treba da ima najveću varijansu pod uslovom da nije u korelaciji sa prethodnim komponentama.

Ukoliko pretpostavimo da imamo  $n \times p$  matricu  $\mathbf{X}$  koja se sastoji od  $n$  obučavajućih observacija u  $p$ -dimenzionom prostoru ( $n$  merenja skupa od  $p$  obeležja), podaci se mogu posmatrati kao  $n$  tačaka u  $p$ -dimenzionalnom prostoru. Ovih  $p$  obeležja opisuje varijabilnost sistema, odnosno podataka. Međutim, često se ta varijabilnost sadrži u  $k$  ( $k < p$ ) glavnih komponentata koje sadrže istu količinu informacija.

PCA nam daje  $p$  novih promenljivih koje predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih obeležja. Te nove promenljive, glavne komponente, dobijaju se projekcijom originalnih promenljivih na koordinatne ose novog koordinatnog sistema koji se dobija rotacijom starog sistema. Glavne komponente zapravo predstavljaju pravce u prostoru obeležja u kojima podaci najviše variraju, pri čemu je prva glavna komponenta linija koja se nalazi najbliže  $n$  merenjima u smislu srednjeg Euklidskog rastojanja. Nakon proračunavanja glavnih komponenti, one se projektuju duž pravaca u  $p$ -dimenzionalnom prostoru obeležja.

Glavne komponente se definišu kao linearne kombinacije originalnih promenljivih:

$$\xi_1 = \omega_{11}X_1 + \omega_{12}X_2 + \dots + \omega_{1p}X_p \quad [5.6]$$

$$\xi_2 = \omega_{21}X_1 + \omega_{22}X_2 + \dots + \omega_{2p}X_p \quad [5.7]$$

.

.

.

$$\xi_p = \omega_{p1}X_1 + \omega_{p2}X_2 + \dots + \omega_{pp}X_p \quad [5.8]$$

gde su  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_p$  glavne komponente, a  $\omega_{ij}$  su svojstveni vektori (konstante koje čine koeficijente  $j$ -te promenljive za  $i$ -tu glavnu komponentu) koji zadovoljavaju sledeće uslove: ukupna varijansa je suma varijansi svih originalnih promenljivih, pri čemu se deo te ukupne varijanse objašnjen jednom glavnom komponentom naziva svojstvena vrednost; svojstvena vrednost je najveća u prvoj glavnoj komponenti i prva glavna komponenta objašnjava maksimum varijanse iz podataka. Takođe postavlja se i uslov da je zbir kvadrata konstanti iznosi 1 i da je obezbeđena međusobna nekorelisanost novih promenljivih:

$$\omega_{i1}^2 + \omega_{i2}^2 + \dots + \omega_{ip}^2 = 1, \quad i = 1, \dots, p \quad [5.9]$$

$$\omega_{i1}\omega_{j1} + \omega_{i2}\omega_{j2} + \dots + \omega_{ip}\omega_{jp} = 0, \text{ za sve } i \neq j \quad [5.10]$$

Pravilo da druga glavna komponenta ne sme biti u korelaciji sa prvom, treća sa drugom, itd., je ekvivalentno uslovu da pravac druge glavne komponente mora biti normalan na pravac prve glavne komponente, itd.

Postavlja se pitanje koliko je glavnih komponenti potrebno da se vizuelizuju podaci. Ne postoji jednostavan odgovor na ovo pitanje. Bilo bi zgodno da se koristi samo prvih par glavnih komponenti i to bi bilo potuno opravdano, s obzirom da se najčešće varijansa podataka može opisati samo pomoću prve glavne komponente. Odluka o broju glavnih komponenti koje će biti razmatrane je subjektivna i određena problemom koji se rešava. U praksi se najčešće posmatraju prve dve glavne komponente i ukoliko se pronađe neki šablon koji je interesantan, razmotri se i naredna glavna komponenta i tako sve dok šablon ne nestane.

PCA je korišćen za analizu podataka dobijenih OMIS metodom, kako bi se odredile OMIS veličine koje najviše doprinose dobrom razdvajanju po klasama. S obzirom da je postojala težnja da se izvorne veličine sačuvaju u cilju povezivanja obeležja izvornih promenljivih sa klasama i da ovom ispitivanju nisu bile od značaja novoformirane promenljive (glavne komponente), njihova klasifikacija nije bila deo rada.

## 5.2.2 STABLA ODLUČIVANJA

Metode na bazi stabla odlučivanja podrazumevaju uslojavanje i segmentaciju prostora prediktora u veći broj jednostavnih regija [82]. Da bi se napravilo predviđanje za datu observaciju, obično se koristi srednja vrednost observacija iz obučavajućeg skupa podataka u regiji kojoj ona pripada. S obzirom da se skup pravila koji se koriste da bi se podelio prostor prediktora može sažeti u stablo, ovaj pristup je označen kao metod stabla odlučivanja. Stabla odlučivanja su jednostavna i zgodna za interpretaciju, međutim nisu u rangu najboljih metoda nadgledanog učenja po pitanju tačnosti predviđanja. Poboljšanja u tačnosti predviđanja se postižu kombinovanjem većeg broja stabala.

Stabla odlučivanja se mogu primeniti i na regresione i na klasifikacione probleme. Klasifikaciona stabla su slična regresionim, sa razlikom u tome što se klasifikaciona stabla koriste za predikciju kvalitativnog odgovora pre nego kvantitativnog. Kod klasifikacionog stabla, predviđa se da svaka observacija pripada klasi obučavajućih observacija u regiji kojoj pripada i koja se najčešće javlja. Za generisanje klasifikacionog stabla koristi se rekurzivno binarno deljenje (splitting), dok se kao kriterijum za binarnu podelu koristi stopa greške klasifikacije (classification error rate) koja predstavlja frakciju obučavajućih observacija u regiji koji ne pripadaju najverovatnijoj klasi:

$$E = 1 - \max_k(\widehat{p}_{mk}) \quad [5.11]$$

gde  $\widehat{p}_{mk}$  predstavlja proporciju obučavajućih observacija u  $m$ -toj regiji koje pripadaju  $k$ -toj klasi. Međutim, ispostavlja se da klasifikaciona greška nije dovoljno osetljiva za gajenje stabla, pa se u praksi koriste druge dve mere:

1. *Gini indeks:*

$$G = \sum_{k=1}^K \widehat{p}_{mk}(1 - \widehat{p}_{mk}) \quad [5.12]$$



koji je definisan kao mera totalne varijanse preko K klasa. Očigledno je da Gini indeks uzima male vrednosti ako su sve  $\widehat{p}_{mk}$  blizu nule ili jedinice. Stoga se Gini indeks označava kao mera „čistoće“ čvorova, gde mala vrednost označava da čvor sadrži pretežno observacije iz jedne klase.

2. Cross-entropy:

$$D = - \sum_{k=1}^K \widehat{p}_{mk} \log \widehat{p}_{mk} \quad [5.13]$$

S obzirom da je  $0 \leq \widehat{p}_{mk} \leq 1$ , sledi da je  $0 \leq -\widehat{p}_{mk} \log \widehat{p}_{mk}$ . Može se pokazati da će unakrsna entropija imati vrednost blisku nuli ako su  $\widehat{p}_{mk}$  svi blizu nuli ili jedinici. Stoga, kao i Gini indeks, unakrsna entropija će imati malu vrednost ako je m-ti čvor čist.

Da bi se smanjila kompleksnost rezultujućeg stabla i da bi se izbeglo preterano prilagođavanje podataka, pribeže se tzv. podrezivanju stabla (pruning).

Bilo koji od tri navedena pristupa može se koristiti za podrezivanje stabla, ali ukoliko je cilj tačnost predikcije finalnog podrezanog stabla, bolje je koristiti stopu klasifikacione greške. Da bismo odredili najbolji način za podrezivanje stabla, možemo izabrati podstablo koje vodi do najniže test stope greške koju možemo proceniti korišćenjem unakrsne validacije. Međutim, procena greške unakrsnom validacijom za svako moguće podstablo bila bi suviše zahtevna, s obzirom da postoji ekstremno veliki broj mogućih podstabala. Zato je potrebno pronaći način da se odabere mali broj podstabala koji će biti razmotren. Jedan od načina je podrezivanje poznato pod nazivom „najslabija karika“, koji umesto da razmatra svako moguće postablo, razmatra sekvencu stabala indeksiranih nenegativnim parametrima  $\alpha$ . Za svaku vrednost  $\alpha$  postoji odgovarajuće podstablo  $T \subset T_0$  ( $T_0$  je veoma veliko stablo). Parametar  $\alpha$  kontroliše kompromis između kompleksnosti podstabla i njegove aproksimacije obučavajućim podacima. Kada je  $\alpha = 0$  tada će podstablo  $T$  biti jednako stablu  $T_0$ . Sa porastom  $\alpha$ , grane se podrezuju po ugnježdenom i predvidivom maniru. Vrednost  $\alpha$  se može odabrati korišćenjem

validacionog skupa ili unakrsne validacije, nakon čega se iz celokupnog skupa podataka dobija podstablo koje odgovara  $\alpha$ .

Metode stabla odlučivanja koriste se u slučaju kada je veza između prediktora i odziva veoma kompleksna i nelinearna, te u tom slučaju ove metode mogu dati bolje rezultate nego klasični pristup za regresiju i klasifikaciju. Takođe, u nekim slučajevima, predikcija korišćenjem stabla odlučivanja može biti bolji izbor zbog lakše interpretacije ili vizuelizacije.

Da bi se sagradili moćniji predikcioni modeli na bazi stabla odlučivanja, koriste se tehnike kao što su Bagging i Random Forest. „Bagging“ ili „bootstrap aggregation“ predstavlja proceduru koja uzimanjem ponavljajućih uzoraka iz jednog obučavajućeg skupa podataka (eng. bootstrap), generiše  $B$  različitih „bootstrapped“ obučavajućih skupova podataka, a zatim obučava metod na  $b$ -tom bootstrapped obučavajućem skupu podataka i usrednjava sve predikcije. U slučaju klasifikacije, praktično to izgleda ovako: za dati skup observacija, beleže se klase koje je svako od  $B$  stabala predvidelo, a zatim se konačna predikcija određuje kao klasa koja se najčešće javlja među  $B$  predikcijama. Veoma je lako proceniti grešku testiranja ovakvog modela, jer u proseku svako bagged stablo koristi oko dve trećine observacija, tako da preostala jedna trećina nije korišćena za aproksimaciju datog stabla (ovo su tzv. „out-of-bag“ – OOB observacije). Stoga se može napraviti predikcija za  $i$ -tu observaciju korišćenjem svakog od stabala za koje je ta observacija bila OOB observacija, pri čemu će postojati  $B/3$  predikcija za  $i$ -tu observaciju. Da bi se dobila jedinstvena predikcija za  $i$ -tu observaciju, glasa se za najverovatniju, pa se iz nje računa greška klasifikacije.

Slučajne šume (eng. Random Forests) kao i kod bagging procedure grade više stabala odlučivanja na „bootstrapped“ obučavajućim uzorcima. Međutim, kada god treba da se dogodi grananje na stablu, slučajni uzorak od  $m$  prediktora se bira kao kandidat za podelu iz celokupnog skupa prediktora. Prilikom svakog grananja, novi uzorak od  $m$  prediktora se bira tako da je broj prediktora koji se razmatra pri svakom grananju približno jednak kvadratnom korenu ukupnog broja prediktora. Slučajne šume mogu se koristiti i za ocenu važnosti atributa.

### 5.2.3 NAIVE BAYES KLASIFIKATOR

Korišćenje Bajesovog klasifikatora je posebno prikladno kada je dimenzija  $p$  prostora obeležja velika [83]. Bajesov klasifikator koristi informaciju o statističkoj distribuciji vektora obeležja u prostoru obeležja i dodeljuje svakom vektoru najverovatniju klasu. Pretpostavimo da su obeležja koja želimo da klasifikujemo predstavljena sa  $N$ -dimenzionalnim vektorima obeležja  $\mathbf{x}$ , čije su komponente merenja koja opisuju prostor obeležja. Neka postoji  $M$  primera vektora obeležja čije su klase poznate od kojih je sačinjen obučavajući skup. Neka postoji  $C$  klasa obeležja  $\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_C$  kojima obeležje može biti dodeljeno. Tada mogu da se definišu a priori verovatnoće  $p(\omega_1), p(\omega_2), \dots, p(\omega_C)$  kao poznate verovatnoće da vektor obeležja pripada svakoj od klasa. Neka uslovna verovatnoća  $p(\omega_j|\mathbf{x})$  predstavlja gustinu verovatnoće pripadanja klasi  $\omega_j$  za zadatu pojavu vektora obeležja  $\mathbf{x}$ .

Sa svim navedenim pretpostavkama može se definisati Bajesovo pravilo odlučivanja kao pravilo koje dodeljuje  $\mathbf{x}$  najverovatnijoj klasi na sledeći način:

*ako  $p(\omega_j|\mathbf{x}) > p(\omega_k|\mathbf{x})$  za sve vrednosti  $k \neq j$  tada dodeli  $\mathbf{x}$  klasi  $\omega_j$*

Na osnovu Bajesove teorije odlučivanja:

$$p(\omega_j|\mathbf{x}) = \frac{p(\mathbf{x}|\omega_j)p(\omega_j)}{p(\mathbf{x})} \quad [5.14]$$

Bajesovo pravilo odlučivanja može se napisati u obliku:

*ako  $p(\mathbf{x}|\omega_j)p(\omega_j) > p(\mathbf{x}|\omega_k)p(\omega_k)$  za sve  $k \neq j$  tada dodeli  $\mathbf{x}$  klasi  $\omega_j$*

gde je  $p(\mathbf{x}|\omega_j)$  uslovna gustina verovatnoće koja se može opisati kao verovatnoća za pojavljivanje vektora  $\mathbf{x}$  onda kada se zna da obeležje pripada klasi  $\omega_j$ .  $p(\mathbf{x})$  nezavisno je od oznake klase i ne ulazi u pravilo odlučivanja.

Naive Bayes klasifikator redukuje kompleksnost uzoraka koja je neophodna za obučavanje Bajesovih klasifikatora uvođenjem pretpostavke uslovne nezavisnosti koja dramatično umanjuje broj parametara koje treba proceniti pri modelovanju  $p(\mathbf{x}|\omega)$ . Drugim rečima, Naive Bayes algoritam je klasifikacioni algoritam baziran na Bajesovom pravilu i skupu pretpostavki o uslovnoj nezavisnosti. Algoritam pravi „naivne“ pretpostavke da su svi atributi statistički nezavisni i podjednako važni.

#### 5.2.4 KAPPA STATISTIKA

Kapa statistika je mera koja poredi posmatranu tačnost sa očekivanom tačnošću [84]. Kapa statistika se koristi kako za evaluaciju jednog klasifikatora tako i za uporednu evaluaciju više klasifikatora. Računanje posmatrane tačnosti i očekivane tačnosti je značajno za razumevanje kapa statistike i najlakše se opisuje preko matrice konfuzije.

Pretpostavimo da imamo model koji je napravljen korišćenjem nadgledanog mašinskog učenja na obeleženim podacima (Kapa statistika se često koristi kao mera pouzdanosti između dva čoveka-ocenjivača). Kolone neka odgovaraju jednom ocenjivaču dok vrste odgovaraju drugom ocenjivaču. U nadgledanom mašinskom učenju, jedan ocenjivač oslikava prave vrednosti svake instance koja se klasifikuje (u medicini bi to bio rezultat testa koji se smatra zlatnim pravilom odn. rezultat referentnog testa), koja je dobijena od obeleženih podataka, a drugi ocenjivač je klasifikator mašinskog učenja koji se koristi da izvrši klasifikaciju (u principu nije važno da li su kolone ili vrste rezultati referentnog testa/klasifikatora kod računanja kapa statistike).

Posmatrana tačnost (OA od eng. Observed Accuracy) predstavlja broj instanci koje su tačno klasifikovane kroz celu matricu konfuzije, odnosno broj instanci koje su obeležene sa Zdravo referentnim testom, a zatim klasifikovane kao Zdrave klasifikatorom mašinskog učenja, ili obeležene kao Bolesno referentnim testom, a

zatim klasifikovane kao Bolesno klasifikatorom mašinskog učenja. Da bi se izračunala Posmatrana tačnost, treba da se saberu brojevi instanci za koje se klasifikator i referentni test slažu i da se taj broj podeli sa ukupnim brojem instanci.

Očekivana tačnost (EA od eng. Expected Accuracy) se definiše kao tačnost koju bi trebalo da postigne bilo koji random klasifikator na osnovu matrice konfuzije. Očekivana tačnost je direktno povezana sa brojem instanci svake klase (zdravo i bolesno) zajedno sa brojem instanci za koje se klasifikator složio sa referentnim testom. Da bi se izračunala očekivana tačnost, prvo se pomnože marginalne frekvencije za Zdravo za jednog ocenjivača i marginalne frekvencije za Zdravo za drugog ocenjivača i zatim se taj broj podeli sa ukupnim brojem instanci.

Na osnovu ovih vrednosti, kapa se može izračunati korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Kappa} = (\text{OA} - \text{EA}) / (1 - \text{EA})$$

Vrednosti kape se kreću u opsegu od 0 do 1, pri čemu je u idealnom slučaju kapa=1 za klasifikator koji klasifikuje sve uzorke sa 100% tačnošću.

### 5.2.5 SVM

Metoda potpornih vektora (eng. Support Vector Machine - SVM) predstavlja generalizaciju jednostavnog i intuitivnog klasifikatora koji se zove klasifikator maksimalne margine [82]. Ukoliko podaci mogu idealno da se razdvoje korišćenjem hiper-ravni, zapravo će postojati beskonačan broj takvih ravni, jer se takva razdvajajuća hiper-ravan može često pomeriti malo gore ili dole ili se može rotirati tako da ne dođe u kontakt sa bilo kojom od observacija. Stoga, mora postojati opravdan način za odabir jedne od beskonačno mnogo hiper-ravni koji će se koristiti za modelovanje klasifikatora. Prirodan izbor je hiper-ravan maksimalne margine (optimalna razdvajajuća hiper-ravan) koja predstavlja razdvajajuću hiper-ravan najudaljeniju od observacija obučavajućeg skupa. Može se izračunati

normalno rastojanje svake od observacija obučavajućeg skupa u odnosu na datu hiper-ravan, pri čemu najmanje rastojanje predstavlja minimalno rastojanje observacije od hiper-ravni i poznato je pod nazivom margina. Hiper-ravan maksimalne margine je razdvajajuća hiper-ravan za koju je margina najveća, odnosno predstavlja hiper-ravan koja ima najudaljenije minimalno rastojanje od observacija obučavajućeg skupa. Tada se observacija iz test skupa može klasifikovati na osnovu toga sa koje strane hiper-ravni maksimalne margine se nalazi. Klasifikator koji radi na ovom principu naziva se klasifikator maksimalne margine.

U slučajevima kada je potrebno izvršiti klasifikaciju u dve klase između kojih se može povući linearna granica odlučivanja prirodan izbor je klasifikator potpornih vektora (Support Vector Classifier). Klasifikator potpornih vektora se još naziva i klasifikator meke margine (eng. Soft Margin Classifier) jer za razliku od klasifikatora maksimalne margine (eng. Maximal margin classifier) koji traži najveću moguću marginu tako da je svaka observacija ne samo na pravoj strani hiper-ravni nego i na pravoj strani margine, klasifikator meke margine dozvoljava da se pojedine observacije nađu na pogrešnoj strani margine ili čak na pogrešnoj strani hiper-ravni koja razdvaja podatke. Klasifikator potpornih vektora klasifikuje observacije iz test skupa u zavisnosti od toga na kojoj strani hiper-ravni leže. Hiper-ravan je izabrana tako da tačno razdvaja većinu observacija iz obučavajućeg skupa u dva skupa, ali može pogrešno klasifikovati nekoliko observacija, odnosno predstavlja rešenje optimizacionog problema:

$$\underset{\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_p, \epsilon_1, \dots, \epsilon_n}{\text{maximize}} \quad M$$

$$\text{tako da} \quad \sum_{j=1}^p \beta_j^2 = 1$$

$$y_i(\beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_p x_{ip}) \geq M(1 - \epsilon_i),$$

$$\epsilon_i \geq 0, \quad \sum_{i=1}^n \epsilon_i \leq C \quad [5.15]$$

gde je  $C$  nenegativni parametar greške koji određuje broj i stepen pogrešno klasifikovanih observacija koji će biti tolerisani i u praksi se najčešće bira preko kros-validacije.  $M$  je širina margine koju želimo da povećamo koliko god je moguće, a  $\epsilon_1, \dots, \epsilon_n$  su promenljive koje dozvoljavaju pojedinačnim observacijama da budu na pogrešnoj strani margine ili hiper-ravni. Rešavanjem gore navedenih jednačina, test observacija  $\mathbf{x}^*$ , koja predstavlja  $p$ -vektor obeležja  $(x_1^*, x_2^*, \dots, x_p^*)$ , se klasifikuje tako što se odredi na kojoj strani hiper-ravni se nalazi, odnosno na osnovu znaka  $f(\mathbf{x}^*) = \beta_0 + \beta_1 x_1^* + \beta_2 x_2^* + \dots + \beta_p x_p^*$ . Ispostavlja se da na klasifikator potpornih vektora utiču samo observacije koje ili leže na margini ili se nalaze sa pogrešne strane margine i kao takve utiču na hiper-ravan. Drugim rečima, observacije koje leže striktno na pravoj strani margine ne utiču na klasifikator potpornih vektora. Observacije koje leže direktno na margini ili se nalaze sa pogrešne strane margine u odnosu na njihovu klasu nazivaju se potporni vektori. Kada je parametar  $C$  veliki, margina je široka, te se mnoge observacije nalaze sa pogrešne strane margine i ima mnogo potpornih vektora, a klasifikator je pristrasniji, ali ima manju varijansu.

U slučaju kada postoji nelinearna veza između prediktora i ishoda, klasifikator potpornih vektora može se koristiti za rešavanje problema klasifikacije ali pod uslovom da se prostor obeležja poveća korišćenjem kvadratnih, kubnih, pa čak i polinomijalnih funkcija višeg reda. Tako će, na primer, umesto da se klasifikator potpornih vektora aproksimira korišćenjem  $p$  obeležja  $X_1, X_2, \dots, X_p$ , aproksimacija vršiti korišćenjem  $2p$  obeležja  $X_1, X_1^2, X_2, X_2^2, \dots, X_p, X_p^2$ . Tada jednačine [5.15] postaju:

$$\underset{\beta_0, \beta_{11}, \beta_{12}, \dots, \beta_{p1}, \beta_{p2}, \epsilon_1, \dots, \epsilon_n}{\text{maximize}} \quad M$$

$$\text{tako da } y_i(\beta_0 + \sum_{j=1}^p \beta_{j1} x_{ij} + \sum_{j=1}^p \beta_{j2} x_{ij}^2) \geq M(1 - \epsilon_i), \quad [5.16]$$

$$\sum_{i=1}^n \epsilon_i \leq C, \quad \epsilon_i \geq 0, \quad \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^2 \beta_{jk}^2 = 1.$$

U uvećanom prostoru obeležja, granica odlučivanja koja proističe iz [5.16] je zapravo linearna, ali u originalnom prostoru obeležja, granica odlučivanja je oblika

$q(x)=0$ , gde je  $q$  kvadratni polinom i njegova rešenja su generalno nelinearna. Osim polinoma višeg stepena, može se koristiti i neka druga funkcija prediktora, ali mora se voditi računa o tome da se povećanjem prostora obeležja povećava broj obeležja, pa proračuni mogu biti veoma zahtevni. Metod potpornih vektora predstavlja generalizaciju klasifikatora potpornih vektora koja omogućava uvećanje prostora obeležja za rešavanje problema nelinearnih granica između klasa uz efikasno proračunavanje korišćenjem kernela. Drugim rečima, kada je klasifikator potpornih vektora kombinovan sa nelinearnim kernelom kao što je na primer polinomijalni kernel reda  $d$ , gde je  $d$  pozitivan ceo broj veći od 1:

$$K(x_i, x_{i'}) = \left(1 + \sum_{j=1}^p x_{ij} x_{i'j}\right)^d \quad [5.17]$$

rezultujući klasifikator se naziva SVM. Za  $d=1$  SVM se svodi na klasifikator potpornih vektora. Pored polinomijalnog kernela višeg stepena, koriste se i radijalni kerneli oblika:

$$K(x_i, x_{i'}) = \exp\left(-\gamma \sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{i'j})^2\right) \quad [5.18]$$

gde je  $\gamma$  pozitivna konstanta.

SVM je u principu binarni klasifikator, ali SVM može biti prilagođen i slučajevima kada imamo proizvoljan broj klasa veći od dva. Dva najpopularnija pristupa u slučaju većeg broja klasa su jedan protiv jednog i jedan protiv svih. Jedan protiv jednog pristup pravi  $\binom{K}{2}$  SVM gde svaki SVM poredi par klasa. Test observacije se klasifikuju korišćenjem svakog od  $\binom{K}{2}$  klasifikatora i prati se koliko puta je test observacija pridodata svakoj od  $K$  klasa. Konačno, test observacija se dodeljuje klasi kojoj je najčešće dodeljivana tokom  $\binom{K}{2}$  klasifikacija.

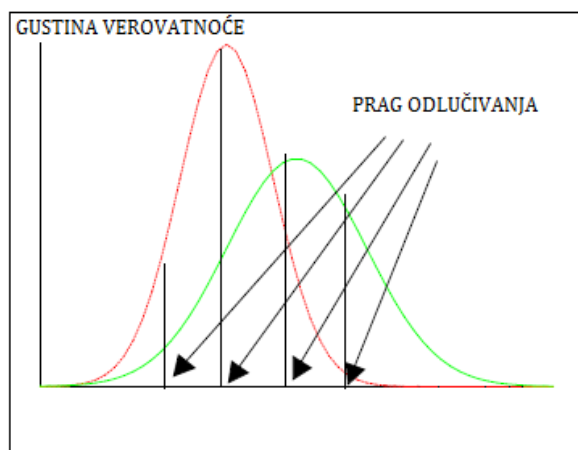
Princip jedan protiv svih podrazumeva aproksimaciju  $K$  SVM, pri čemu se svaki put poredi jedna od  $K$  klasa sa preostalim  $K-1$  klasa. Ako sa  $\beta_{0k}, \beta_{1k}, \beta_{2k}, \dots, \beta_{pk}$  obeležimo parametre koji proizilaze iz aproksimacije SVM koji poredi  $k$ -tu klasu sa



preostalim klasama, a sa  $x^*$  test observaciju, observacija će biti dodeljena klasi za koju je  $\beta_{0k} + \beta_{1k}x_1^* + \beta_{2k}x_2^* + \dots + \beta_{pk}x_p^*$  najveće.

### 5.2.6 ROC KRIVA

ROC analiza se koristi u kliničkoj epidemiologiji za kvantifikovanje dijagnostičkih testova ili sistema, odnosno za određivanje tačnosti sa kojom dijagnostički testovi mogu da razlikuju dva stanja pacijenta (bolestan/zdrav) [85]. ROC kriva se bazira na pojmu skale razdvajanja na kojoj rezultati za zdrave i bolesne formiraju par distribucija koje se preklapaju (slika 5.4), pri čemu bi potpuno odvojene distribucije ukazivale na idealni dijagnostički test, dok bi potpuno preklapanje ukazivalo da nema razdvajanja.

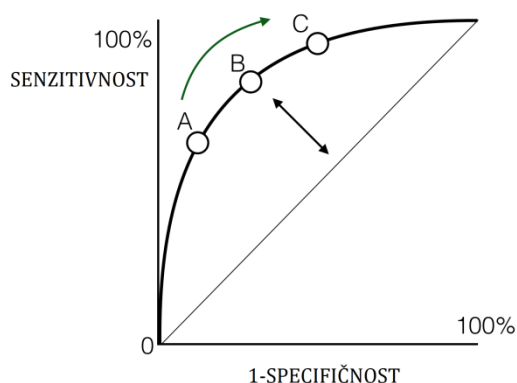


**Slika 5.4** Preklapajuće distribucije za bolesne (desna) i zdrave (leva) sa četiri različite vrednosti praga odlučivanja [85]

Vrednost praga (granična vrednost) predstavlja vrednost testa koja razdvaja pozitivne i negativne rezultate. U zavisnosti od kriterijuma tj. vrednosti praga koji važe za postavljanje dijagnoze, odluka da li je rezultat pozitivan ili negativan će varirati. Posledično, sa pooštavanjem kriterijuma, dolazi do smanjenja senzitivnosti i povećanja specifičnosti, dok primena blažih kriterijuma dovodi do povećanja senzitivnosti i smanjenja specifičnosti. Često je teško definisati samo

jednu graničnu vrednost za donošenje odluke da li je rezultat pozitivan ili negativan, pa se tačnost dijagnostičkog testa procenjuje za više različitih graničnih vrednosti.

ROC kriva prikazuje odnos senzitivnosti i specifičnosti, tako što je senzitivnost prikazana na  $y$ -osi, a stopa lažno pozitivnih rezultata na  $x$ -osi. Test sa velikom dijagnostičkom tačnošću biće predstavljen krivom koja je bliža levom gornjem uglu, dok će test bez dijagnostičke tačnosti biti predstavljen linijom koja ide od donjeg levog ugla ka gornjem desnom uglu (slika 5.5).



**Slika 5.5** ROC kriva [86]

Za ocenu jednog dijagnostičkog testa ali i za upoređivanje više dijagnostičkih testova može se koristiti površina ispod ROC krive (AUC od eng. Area Under Curve). Sa povećanjem tačnosti testa raste i površina ispod krive. Maksimalna vrednost  $AUC=1$  znači da je dijagnostički test idealan, što se dešava u slučaju kada se distribucije rezultata testa ne preklapaju. Vrednost  $AUC=0$  znači da test netačno klasifikuje sve bolesne pacijente kao negativne i sve sve zdrave pacijente kao pozitivne. Minimalna vrednost površine ispod ROC krive trebalo bi da bude 0.5 [85].

## 6. PROTOKOL ISTRAŽIVANJA

U periodu od 2011. godine do 2015. godine, eksperimenti za potrebe doktorske disertacije i u okviru projekta III41006 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja su rađeni u Ginekološko akušerskoj klinici „Narodni Front“ u Beogradu i prikupljeno je ukupno 2293 uzoraka od 1057 pacijenata. Od ovog broja, određen broj uzoraka je odbačen (uzorci za koje naknadno iz nekog razloga nije dobijen rezultat Papanikolau testa isključeni su iz razmatranja, kao i uzorci pacijenata za koje je nedostajao jedan od uzoraka iz kanala ili sa površine grlića materice), pa je konačan broj razmatranih uzoraka OMIS metodom iznosio 2126 uzoraka prikupljenih od 851 pacijenta. Od ukupnog broja prikupljena su 1672 bojena uzorka i 454 nebojena uzorka (tabela 6.1).

**Tabela 6.1** Prikaz broja uzoraka po Papanikolau grupama prikupljenih u periodu od 2011. godine do 2015. godine

<b>BOJENI UZORCI</b>	<b>II PAP GRUPA</b>	<b>III PAP GRUPA</b>	<b>IV PAP GRUPA</b>	<b>V PAP GRUPA</b>	
2011. godina	70	68	56	64	
2012. godina	514	674	26	38	
2013. godina	118	42	0	2	
2014. godina	0	0	0	0	
<b>UKUPNO</b>	<b>702</b>	<b>784</b>	<b>82</b>	<b>104</b>	<b>1672</b>
<b>NEBOJENI UZORCI</b>	<b>II PAP GRUPA</b>	<b>III PAP GRUPA</b>	<b>IV PAP GRUPA</b>	<b>V PAP GRUPA</b>	
2011. godina	0	0	0	0	
2012. godina	226	38	0	0	
2013. godina	118	42	0	0	
2014. godina	0	0	14	16	
<b>UKUPNO</b>	<b>344</b>	<b>80</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>454</b>

Razmatrani su bojena i nebojena uzorka ćelija grlića materice. Bojena uzorka podrazumevali su predmetne pločice sa razmazom ćelija grlića materice koje su fiksirane u 96% alkoholu najmanje 10 minuta i obojene po metodi Papanikolau

hematoksilinom, metiloranžom i polihromom. Nebojeni uzorci nisu fiksirani niti su bojeni.

Svaka pločica sa uzorkom ćelija grlića materice (bojena i nebojena) je postavljena u kućište OMIS uređaja i slikana 20 puta: 10 puta pod belom svetlošću i 10 puta pod belom svetlošću pod Brusterovim uglom. Svih 454 nebojenih uzoraka snimljeno je neposredno nakon pregleda pacijenta, u roku od 5 minuta. Napravljeno je ukupno 42.520 digitalnih slika koje su obrađene u programskom paketu MATLAB korišćenjem konvolucionog algoritma, a kao rezultat su dobijeni OMIS spektri. Svaka digitalna slika je prvo kropovana, pri čemu je u prvoj fazi ispitivanja izdvajan centralni deo slike, veličine 1000 piksela x 1000 piksela, a zatim se pristupilo digitalnoj obradi cele slike uzorka.

U nastavku je dat detaljan prikaz brojnog stanja uzoraka po fazama istraživanja od 2011. godine do 2015. godine.

## 6.1 I FAZA (2011. godina)

U prvoj fazi ispitivanja prikupljeni su Papanikolau razmazi retroaktivno, iz 2010. godine koji su obuhvatili uzorke iz sve četiri Papanikolau grupe. Razmatrana su po dva brisa iz grlića materice svake pacijentkinje: jedan iz unutrašnjosti kanala (U) i jedan sa spoljašnje površine kanala grlića materice (S). Iz svake od četiri grupe prikupljen je sledeći broj uzoraka:

II Papanikolau grupa: 35 pacijenata=70 Papanikolau razmaza (70 pločica)

III Papanikolau grupa: 34 pacijenta=68 Papanikolau razmaza (68 pločica)

IV Papanikolau grupa: 35 pacijenata, od kojih je 7 imalo samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=63 Papanikolau razmaza (63 pločice)

V Papanikolau grupa: 35 pacijenata, od kojih je 3 imalo samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=67 Papanikolau razmaza (67 pločica)

Ukupno je prikupljeno: 268 bojениh uzoraka od 139 pacijenata. Od ukupnog broja prikupljenih uzoraka, odbačeni su uzorci onih pacijenata za koje je falio po jedan uzorak, pa je ukupno razmatrano **129 pacijenata** (35 II Pap, 34 III Pap, 28 IV Pap, 32 V Pap), odnosno **258 uzoraka** (70 II Pap, 68 III Pap, 56 IV Pap, 64 V Pap).

## 6.2 II FAZA (2012. godina)

U drugoj fazi počelo je prikupljanje nebojenih uzoraka, kako bi se rezultati dobijeni za bojene uporedili sa rezultatima dobijenim za nebojene uzorke i kako bi se ustanovila mogućnost korišćenja nebojenih uzoraka u dijagnostici pomoću OMIS metode. Svi nebojeni uzorci su obeleženi sa S ili U u zavisnosti od toga da li sadrže razmaz ćelija iz kanala grlića materice (U) ili ćelije sa spoljašnje površine grlića materice (S). Nebojeni uzorci nisu fiksirani i razmatrani su odmah nakon uzimanja brisa. Deo bojениh razmaza nije obeležen sa U/S, jer se ne raspolaže informacijom o mestu uzimanja brisa. Takvi uzorci su obeleženi sa 1 ili 2.

### I. BOJENI UZORCI

**Ia BOJENI UZORCI ZA KOJE SE NE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (neobeleženi uzorci, oznake pločica su 1 i 2):**

II Papanikolau grupa: 214 pacijenta, 10 pacijenata je imalo samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=418 Papanikolau razmaza (418 pločica)

III Papanikolau grupa: 335 pacijenta, 7 pacijenata je imalo samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=663 Papanikolau razmaza (663 pločica)

IV Papanikolau grupa: 15 pacijenata, 2 pacijenta su imala samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=28 Papanikolau razmaza (28 pločica)

V Papanikolau grupa: 20 pacijenata, 1 pacijent je imao samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=39 Papanikolau razmaza (39 pločica)

**Ib BOJENI UZORCI ZA KOJE SE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (obeleženi uzorci, oznake pločica su U i S):**

II Papanikolau grupa: 55 pacijenata, 2 pacijenta su imala samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=108 Papanikolau razmaza (108 pločica)

III Papanikolau grupa: 10 pacijenata, 1 pacijent je imao samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=19 Papanikolau razmaza (19 pločica)

IV Papanikolau grupa: 0 pacijenata

V Papanikolau grupa: 0 pacijenata

Ukupno je prikupljeno: 1275 bojenih uzoraka od 649 pacijenata. Od ukupnog broja prikupljenih uzoraka, odbačeni su uzorci onih pacijenata za koje je nedostajao po jedan uzorak, pa je ukupno razmatrano **626 pacijenata** (257 II Pap (204 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa U/S + 53 pacijenta čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S), 337 III Pap (328 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa U/S + 9 pacijenata čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S), 13 IV Pap (13 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa U/S + 0 pacijenata čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S), 19 V Pap (19 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa U/S + 0 pacijenata čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S)), odnosno **1252 uzoraka** (514 II Pap (408 obeleženih + 106 neobeleženih), 674 III Pap (656 obeleženih + 18 neobeleženih), 26 IV Pap (26 obeleženih + 0 neobeleženih), 38 V Pap (38 obeleženih + 0 neobeleženih)).

**II. NEBOJENI UZORCI**

Od ukupnog broja nebojenih uzoraka, oduzeti su oni uzorci za koje nisu postojali odgovarajući bojene uzorci (nisu svi prikupljeni ili su ponovljeni, pa ih nismo dobili).

Bojeni uzorci su prikupljeni od pacijentkinja koje su došle na pregled u GAK „Narodni Front“. Uzimana su 4 brisa: dva za standardnu Papanikolau proceduru testiranja koja podrazumeva fiksiranje ćelija i zatim bojenje i dva koja se neće niti fiksirati niti bojiti. Prvo su uzeti brisevi za standardni Papanikolau test, a zatim za ispitivanje OMISom (nebojeni uzorci).

Prvobitno su na istu pločicu nanošeni bris iz kanala grlića materice i bris sa površine grlića materice, pa su ti uzorci isključeni iz razmatranja (bilo je ukupno 48 ovakvih slučajeva). Zatim je usledilo prikupljanje uzoraka koji se nisu bojili ni fiksirali na dve zasebne pločice, kako bi se mogli uporediti sa njihovim odgovarajućim obojenim parovima.

**IIa NEBOJENI UZORCI ZA KOJE SE NE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (neobeleženi uzorci, oznake pločica su 1 i 2):**

II Papanikolau grupa: 65 pacijenata, 5 pacijenata je imalo samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=125 Papanikolau razmaza (125 pločica)

III Papanikolau grupa: 11 pacijenata=22 Papanikolau razmaza (22 pločica)

IV Papanikolau grupa: 0 pacijenata

V Papanikolau grupa: 0 pacijenata

**IIb NEBOJENI UZORCI ZA KOJE SE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (obeleženi uzorci, oznake pločica su U i S):**

II Papanikolau grupa: 55 pacijenata, 2 pacijenta su imala samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=108 Papanikolau razmaza (108 pločica)

III Papanikolau grupa: 9 pacijenata, 1 pacijent je imao samo jedan uzorak (odn. jednu pločicu)=17 Papanikolau razmaza (17 pločica)

IV Papanikolau grupa: 0 pacijenata

V Papanikolau grupa: 0 pacijenata

Ukupno je prikupljeno 428 nebojenih pločica sa uzorcima od 188 pacijenata, međutim isključene su pločice koje su sadržale dva brisa (48) i pacijenti za koje nismo naknadno dobili obojene uzorke, pa je taj broj sveden na: 280 nebojenih pločica (uzoraka) od 140 pacijenata. Od ovog broja prikupljenih uzoraka, odbačeni su uzorci onih pacijenata za koje je nedostajao po jedan uzorak, pa je ukupno razmatrano **132 pacijenata** (113 II Pap (60 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa

U/S + 53 pacijenta čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S), 19 III Pap (11 pacijenata čiji uzorci nisu obeleženi sa U/S + 8 pacijenata čiji uzorci jesu obeleženi sa U/S), 0 IV Pap, 0 V Pap, odnosno **264 uzoraka** (226 II Pap (120 obeleženih + 106 neobeleženih), 38 III Pap (22 obeleženih + 16 neobeleženih), 0 IV Pap, 0 V Pap.

### 6.3 III FAZA (2013. godina)

U trećoj fazi prikupljeni su dodatni uzorci iz II i III Papanikolau grupe. Poreklo ćelija (kanal grlića materice/površina grlića) je poznato kod svih nebojenih uzoraka, dok to nije slučaj kod bojenih uzoraka. Za svakog pacijenta postoje 4 pločice sa uzorcima ćelija iz grlića materice, 2 uzorka su bojena a dva nebojena. Samo za jednog pacijenta kojem je dijagnostikovana V Papanikolau grupa, ne postoje nebojeni uzorci.

**Ia BOJENI UZORCI ZA KOJE SE NE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (neoboeleženi uzorci, oznake pločica su 1 i 2):**

II Papanikolau grupa: 59 pacijenata=118 Papanikolau razmaza (118 pločica)

III Papanikolau grupa: 21 pacijent=42 Papanikolau razmaza (42 pločica)

IV Papanikolau grupa: 0 pacijenata

V Papanikolau grupa: 1 pacijent=2 Papanikolau razmaza (2 pločica)

**Ib NEBOJENI UZORCI ZA KOJE SE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (obeleženi uzorci, oznake pločica su U i S):**

II Papanikolau grupa: 59 pacijenata=118 Papanikolau razmaza (118 pločica)

III Papanikolau grupa: 21 pacijent=42 Papanikolau razmaza (42 pločica)

IV Papanikolau grupa: 0 pacijenata

V Papanikolau grupa: 0 pacijenata



Ukupno je prikupljeno 162 bojenih uzoraka i 160 nebojenih uzoraka od 81 pacijenta. Od tog broja oduzeti su uzorci pacijenata koji nisu imali obe pločice, pa je konačan broj razmatranih bio **81 pacijent** (59 II Pap, 21 III Pap, 0 IV Pap, 1 V Pap), odnosno **322 uzoraka** (236 II Pap (118 obeleženih + 118 neobeleženih), 84 III Pap (42 obeleženih + 42 neobeleženih), 0 IV Pap, 2 V Pap).

#### 6.4 IV FAZA (2014. godina)

U četvrtoj fazi prikupljeni su nebojeni uzorci pacijenata koji imaju dijagnostikovanu IV i V Papanikolau grupu.

**Ia** NEBOJENI UZORCI ZA KOJE SE ZNA DA LI SU PRIKUPLJENI IZ KANALA GRLIĆA ILI SA SPOLJAŠNJE POVRŠINE (obeleženi uzorci, oznake pločica su U i S):

II Papanikolau grupa: 0 pacijenata

III Papanikolau grupa: 0 pacijenata

IV Papanikolau grupa: 7 pacijenata=14 Papanikolau razmaza (14 pločica)

V Papanikolau grupa: 8 pacijenata=16 Papanikolau razmaza (16 pločica)

Ukupno, razmatrano je **30 nebojenih uzoraka** (0 II Pap, 0 III Pap, 14 IV Pap, 16 V Pap) od **15 pacijenata** (0 II Pap, 0 III Pap, 7 IV Pap, 8 V Pap).

## 7. REZULTATI

Rezultati dobijeni eksperimentalnim merenjima prikazani su u nastavku teksta pomoću slika, tabela i dijagrama. Optomagnetni spektri uzoraka grlića materice prikazani su za ispitivane bojene i nebojene uzorke zasebno, kao i uporedno i objedinjeni su na osnovu Papanikolau grupe kojoj uzorci pripadaju i na osnovu mesta sa kog su ćelije prikupljene (kanal grlića materice/površina grlića). Takođe, napravljena je razlika između dela digitalne slike uzorka koji je razmatran, te su stoga prvo prikazani rezultati obrade digitalnih slika uzoraka iz kojih je iz centra kropovan deo veličine 1000 pix x 1000 pix, a zatim i rezultati obrade digitalnih slika uzoraka iz kojih je kropovana regija koja obuhvata ceo uzorak snimljen OMIS uređajem.

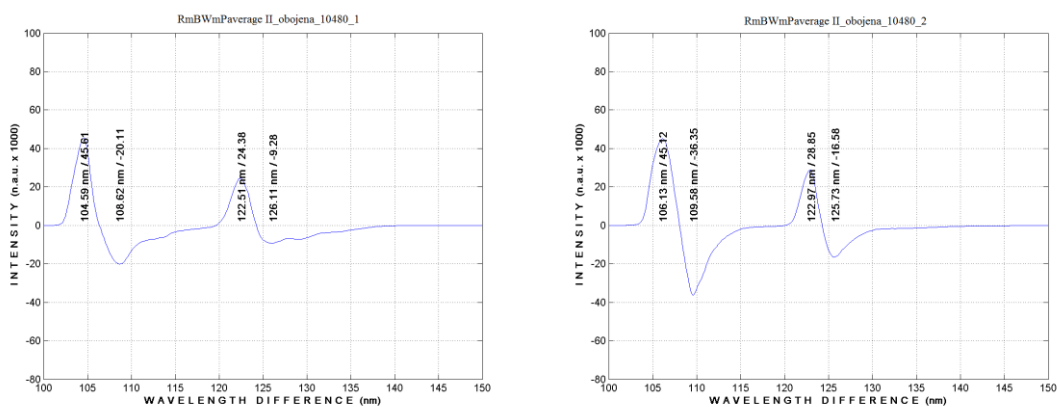
Urađena je klasifikacija OMIS spektara uzoraka, pri čemu su korišćene različite metode mašinskog učenja kako bi se utvrdio model klasifikacije koji sa zadovoljavajućom tačnošću razvrstava uzorke ćelija grlića materice na osnovu njihovih OMIS spektara. Rezultati klasifikacije prikazani su grafički i dati uporedno za sve testirane metode: Naive Bayes, Decision Trees, Random Forest, SVM i to u vidu procenata postignute senzitivnosti, specifičnosti i tačnosti modela. Za međusobno poređenje testiranih modela binarne klasifikacije korišćena je ROC kriva posebno za bojene i nebojene uzorke grlića materice.

### 7.1 REZULTATI ISPITIVANJA UZORAKA OMIS METODOM

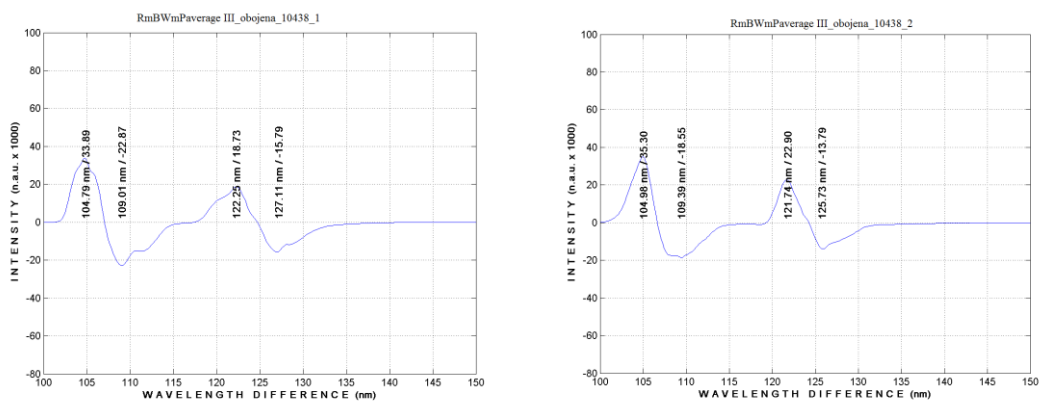
#### 7.1.1 BOJENI UZORCI ĆELIJA GRLIĆA MATERICE

Na osnovu karakterističnih pikova i razlike talasnih dužina na kojima se oni nalaze u okviru OMIS spektara dobijenih za bojene uzorke ćelija grlića materice, izvršena je analiza OMIS spektara uzoraka u odnosu na rezultate dobijene konvencionalnom Papanikolau metodom koja je korišćena kao referentna metoda [87].

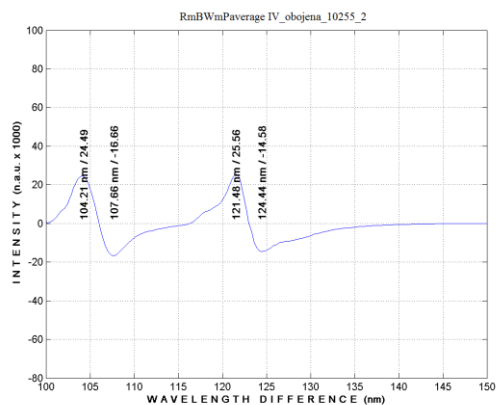
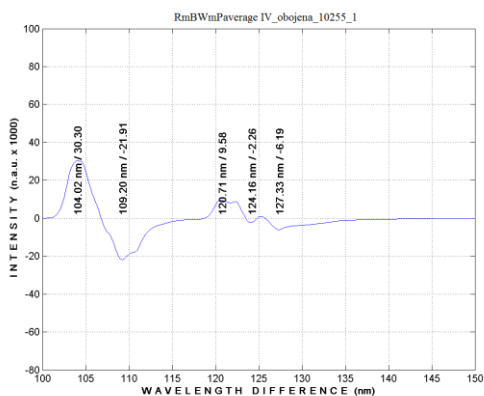
Kao što je napomenuto, svakom pacijentu pripadaju dve pločice sa uzorcima ćelija grlića materice: jedna koja sadrži uzorak ćelija grlića materice uzet iz kanala grlića materice i drugi koji sadrži ćelije grlića materice uzete sa površine kanala grlića materice. Prilikom izvođenja Papanikolau testa u klinici, na pločicama ne stoji oznaka koji je uzorak od dva navedena na toj pločici, tako da je podatak o tome izostao u prvoj fazi ispitivanja i pločice su obeležene sa 1 i 2, time označavajući samo dva različita uzorka istog pacijenta. Na slikama 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 su prikazani OMIS spektri dobijeni za uzorke-karakteristične predstavnike sve četiri Papanikolau grupe. Za generisanje OMIS spektara korišćen je konvolucioni algoritam razvijen u programskom paketu MATLAB® 2013.



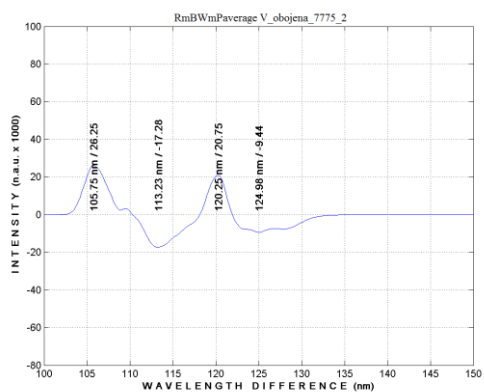
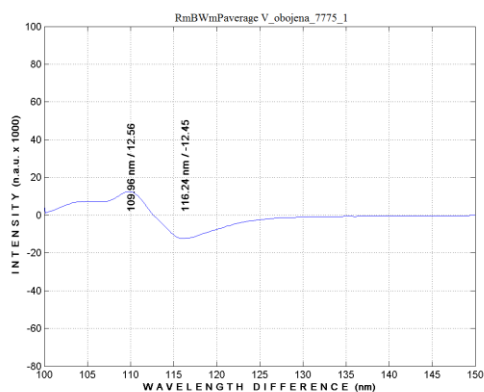
**Slika 7.1** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz II Papanikolau grupe oznake 10480\_1 (levo) i 10480\_2 (desno).



**Slika 7.2** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz III Papanikolau grupe oznake 10438\_1 (levo) i 10438\_2 (desno).



**Slika 7.3** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz IV Papanikolau grupe oznake 10255\_1 (levo) i 10255\_2 (desno).



**Slika 7.4** OMIS spektri dobijeni za bojene uzorke iz V Papanikolau grupe oznake 7775\_1 (levo) i 7775\_2 (desno).

### 7.1.2 REZULTATI UPOREDNOG ISPITIVANJA BOJENIH I NEBOJENIH UZORAKA ČELIJA GRLIĆA MATERICE OMIS METODOM

U drugoj fazi ispitivanja, razmatrane su po 4 pločice sa uzorcima ćelija grlića materice svake pacijentkinje: dve nebojene i dve odgovarajuće bojene. U ovoj fazi razmatrano je ukupno: 162 bojena uzorka i 160 nebojenih uzoraka ćelija grlića materice prikupljenih od 81 pacijentkinje. Pod nebojenom pločicom sa uzorkom podrazumevamo mikroskopsku pločicu na koju je nanesen bris iz grlića materice, koji nije fiksiran u alkoholu niti bojen po Papanikolau standardu. Svakoj pacijentkinji odgovaraju po dve nebojene pločice: na jednu je nanesen bris iz cervikalnog kanala, a na drugu bris koji je uzet sa površine grlića materice. Nebojene pločice sa razmazima su odmah nakon ginekološkog pregleda pacijentkinja, prenošene u laboratoriju i u vremenskom periodu od maksimum 5 minuta su podvrgnute ispitivanju Optomagnetnom spektroskopijom. Bojene pločice sa odgovarajućim razmazima ćelija grlića materice, kao i rezultati Papanikolau testa, naknadno su dobijeni, s obzirom da je za postupak bojenja potrebno oko sat vremena, a za rezultate nekoliko dana.

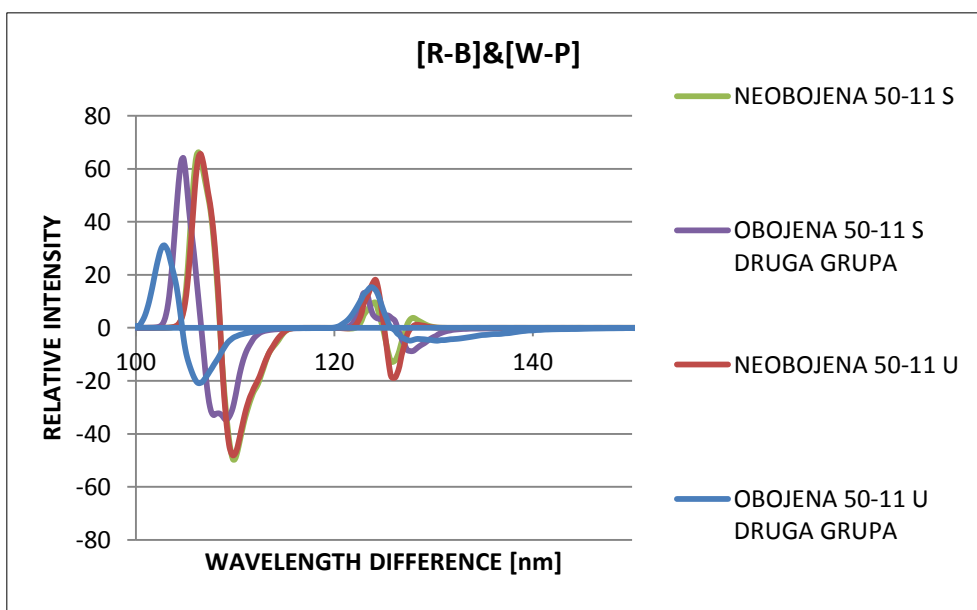
Oznaka 1/2 u naslovu dijagrama označava da je u pitanju prva od dve bojene pločice koje odgovaraju jednoj pacijentkinji. Prilikom ispitivanja samo bojениh pločica (u prvoj fazi kada nisu razmatrane nebojene pločice), nije bilo poznato koja od dve bojene pločice odgovara brisu uzetom iz cervikalnog kanala, a koja odgovara brisu uzetom sa same površine grlića materice, jer postupak dijagnostike koju sprovodi bolnica nije uključivao obeležavanje odgovarajućih pločica. U drugoj fazi, uvedeno je označavanje pločica prilikom uzimanja brisa, pri čemu se slovo S pored oznake pločice odnosi na bris koji je uzet sa spoljašnje površine grlića materice, a slovo U se odnosi na bris koji je uzet iz cervikalnog kanala. Deo bojениh i nebojenih razmaza nije obeležen sa U/S, jer se ne raspolaže informacijom o mestu uzimanja brisa. Takvi uzorci su obeleženi sa 1 ili 2.

Analizirajući intenzitete pikova koji se javljaju na određenim talasnim dužinama, a na osnovu rezultata dobijenih Papanikolau testom, uočeno je da postoji doslednost

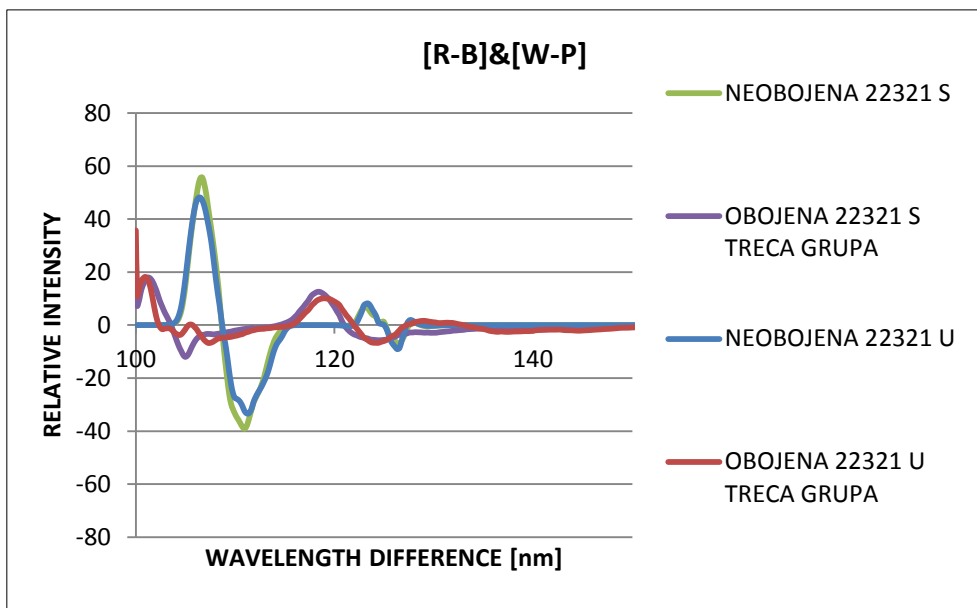
OMIS metode u razdvajanju uzoraka u četiri Papanikolau grupe. Intenzitet maksimalnih pikova opada idući od grupe uzoraka iz II grupe koja predstavlja normalan nalaz, do uzoraka iz V grupe koji predstavlja invazivni karcinom, gde su maksimumi najmanjeg intenziteta (slike 7.1-7.4)

Analizom podataka dobijenih primenom Optomagnetne spektroskopije na bojene i njima odgovarajuće nebojene uzorke, primećeno je da isti trend postoji i kod nebojenih pločica. Intenzitet glavnog (najvećeg) maksimalnog pika najveći je kod predstavnika II grupe i opada idući ka V grupi (tabele 7.5-7.14).

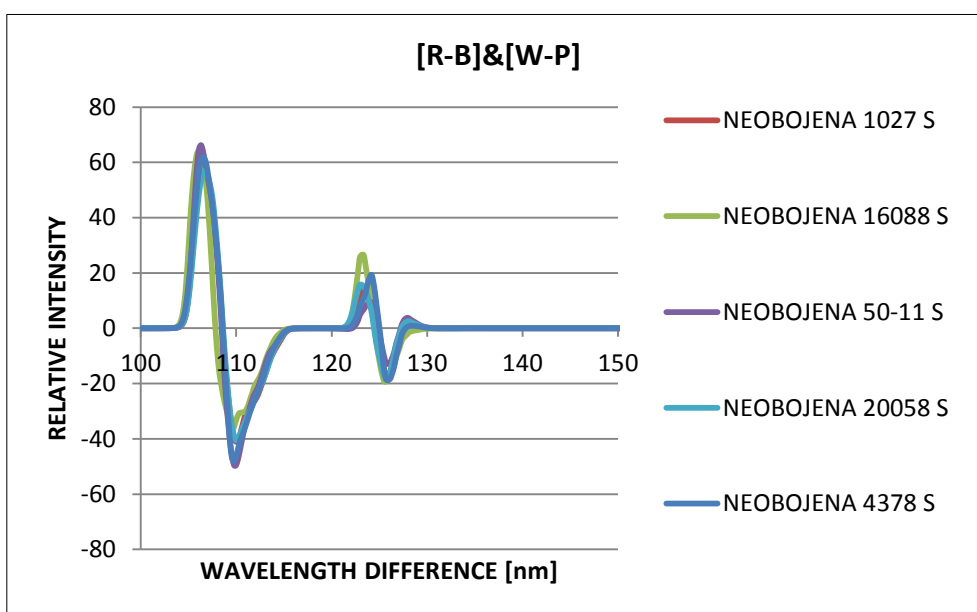
Na slikama koje slede su predstavljeni rezultatni dijagrami dobijeni primenom Optomagnetne spektroskopije na ispitivanje bojениh i nebojenih pločica iz II i III PAP grupe.



**Slika 7.5** OMIS spektri predstavnika II grupe (oznaka pločice 50-11): prikazani su spektri dobijeni obradom digitalnih slika bojениh i nebojenih pločica sa razmazom brisa cervikalnih ćelija jedne pacijentkinje



*Slika 7.6 OMIS spektri predstavnika III grupe (oznaka pločice 22321): prikazani su spektri dobijeni obradom digitalnih slika bojenih i nebojenih pločica sa razmazom brisa cervikalnih ćelija jedne pacijentkinje*

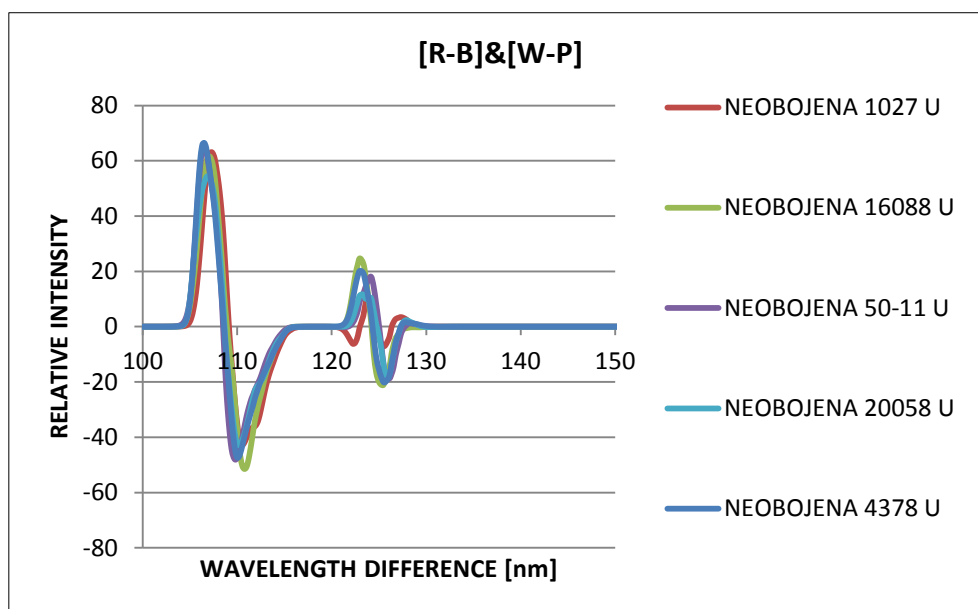


*Slika 7.7 OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)*

Primećuje se da su OMIS spektri nebojenih uzoraka dosledniji u odnosu na spektre bojenih uzoraka koji potiču od iste pacijentkinje, odnosno da se karakteristični pikovi u OMIS spektru javljaju na istim talasnim dužinama i da su bliskih intenziteta (tabele 7.1-7.4).

**Tabela 7.1** Karakteristični pikovi, razlike talasne dužine na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 nebojenih pločica sa razmazima uzetih sa površine grlića materice (S) iz II PA grupe (5 pacijentkinja) (WLD-wavelength difference, I-intensity)

II PA S OZNAKA PLOČICE	I MAKSIMUM		I MINIMUM		II MAKSIMUM		II MINIMUM	
	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I
1027	106,51	58,85	109,96	-41,03	123,34	13,95	125,73	-17,15
16088	106,13	64,38	109,58	-36,80	123,34	26,50	125,73	-19,20
50-11	106,32	66,23	109,96	-49,66	124,16	9,41	125,73	-12,82
20058	106,71	56,93	109,96	-40,46	122,97	15,78	125,73	-18,25
4378	106,51	62,00	109,77	-47,99	124,16	19,33	125,73	-18,62

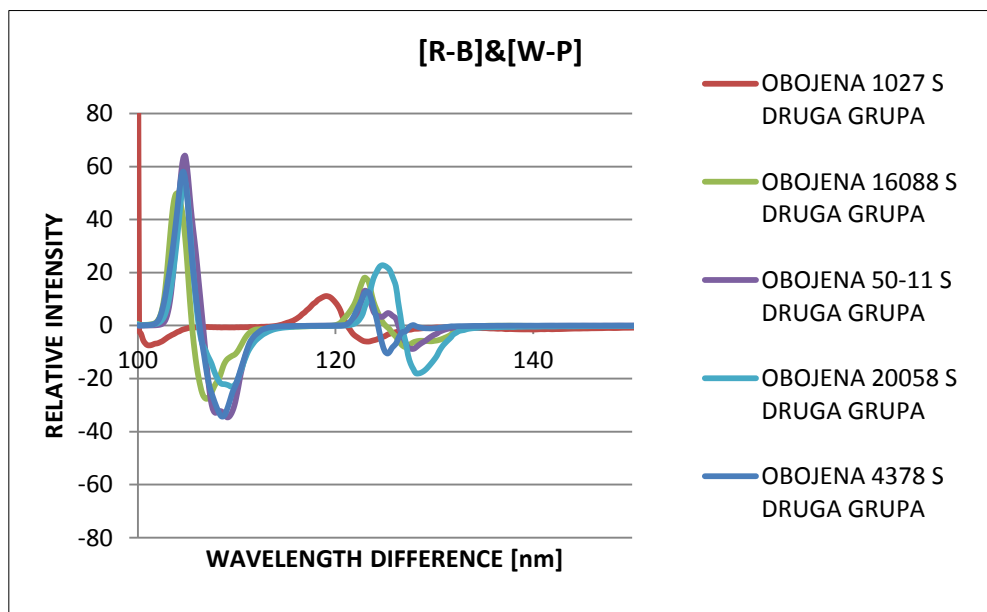


**Slika 7.8** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

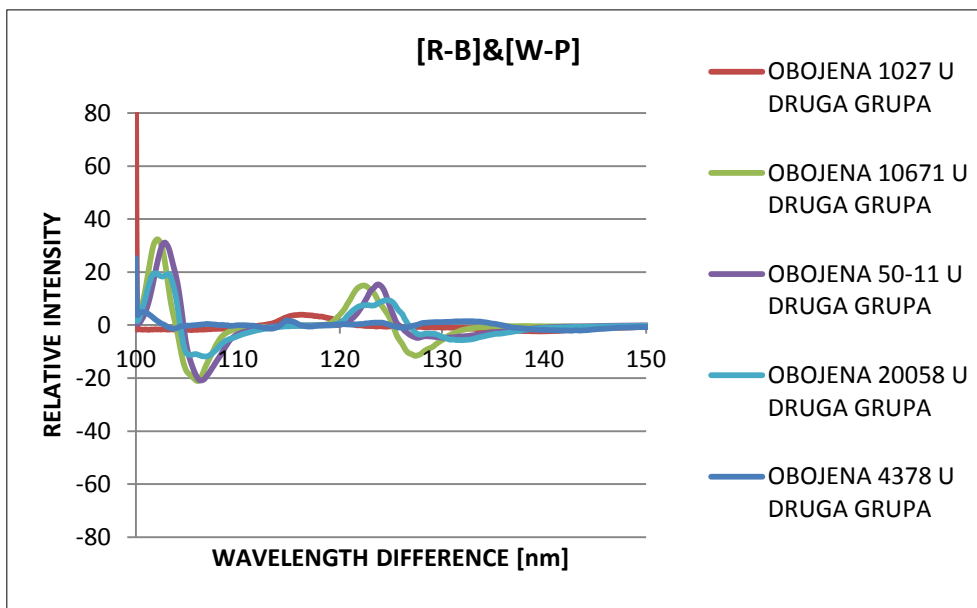


**Tabela 7.2** Karakteristični pikovi, razlike talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 nebojenih pločica sa razmazima uzetih iz cervikalnog kanala (U) iz II PA grupe (5 pacijentkinja) (WLD-wavelength difference, I-intensity)

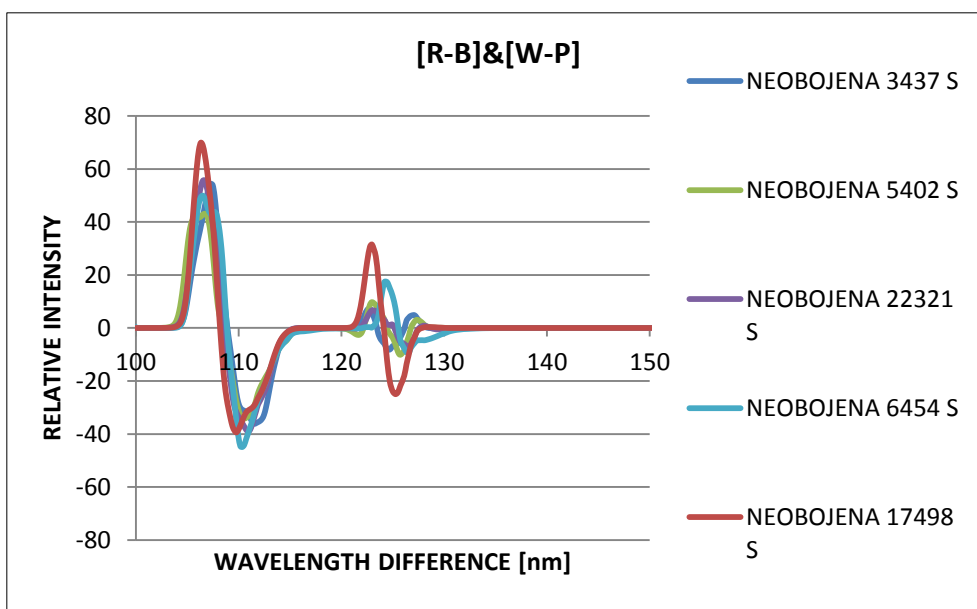
II PA U OZNAKA PLOČICE	I MAKSIMUM		I MINIMUM		II MAKSIMUM		II MINIMUM	
	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I
1027	107,28	63,16	110,54	-42,79	123,83	10,99	125,5	-7,17
16088	107,09	61,56	110,74	-51,47	122,97	24,73	125,26	-21,07
50-11	106,51	65,65	109,77	-48,11	124,16	18,08	126,11	-18,79
20058	106,9	54,51	110,16	-42,95	123,34	11,63	125,73	-17,56
4378	106,51	66,48	109,96	-47,25	122,97	20,21	125,50	-20,14



**Slika 7.9** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)



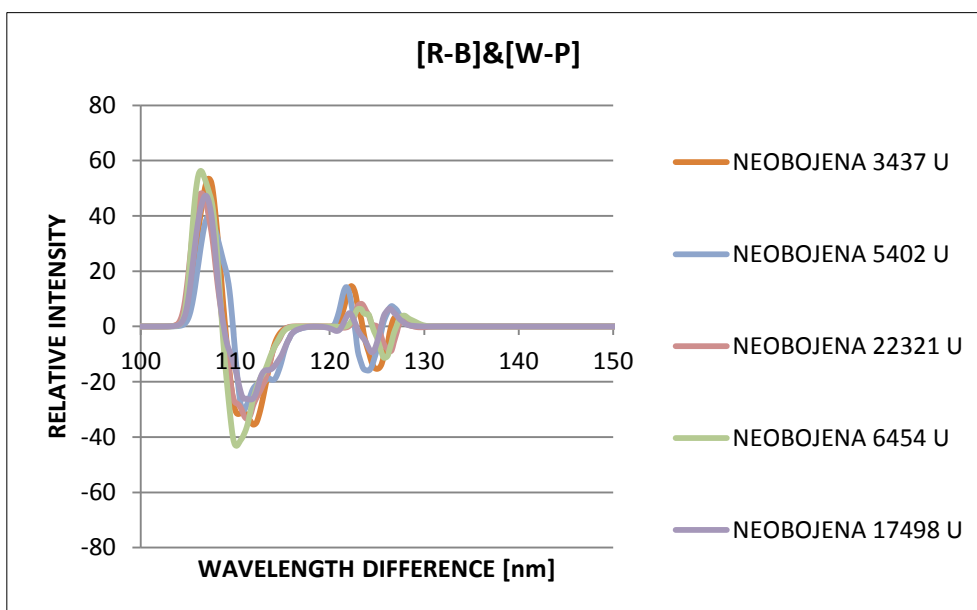
*Slika 7.10 OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz II grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)*



*Slika 7.11 OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)*

**Tabela 7.3** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 nebojenih pločica sa razmazima uzetim sa površine grlića materice (S) iz III PA grupe (5 pacijentkinja) (WLD-wavelength difference, I-intensity)

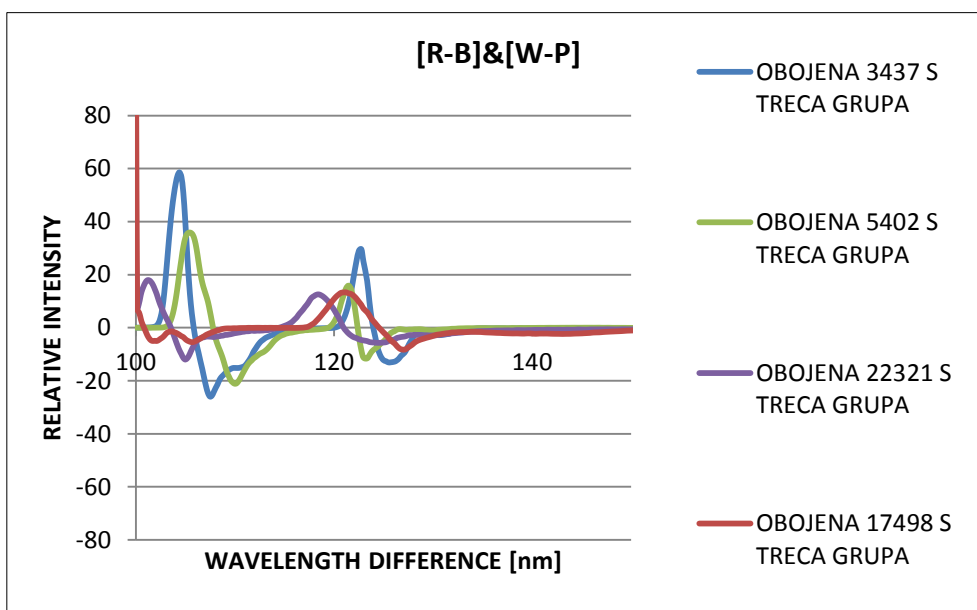
III PA S OZNAKA PLOČICE	I MAKSIMUM		I MINIMUM		II MAKSIMUM		II MINIMUM	
	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I
3437	107,28	54,38	111,50	-36,18	122,76	7,31	124,71	-8,12
5402	106,71	43,09	110,54	-34,20	122,97	9,76	125,73	-10,11
22321	106,71	55,59	110,93	-39,13	122,97	6,67	126,56	-7,23
6454	106,51	49,91	110,35	-44,91	124,44	17,31	126,56	-9,28
17498	106,32	69,90	109,77	-39,41	122,97	31,44	125,26	-24,97



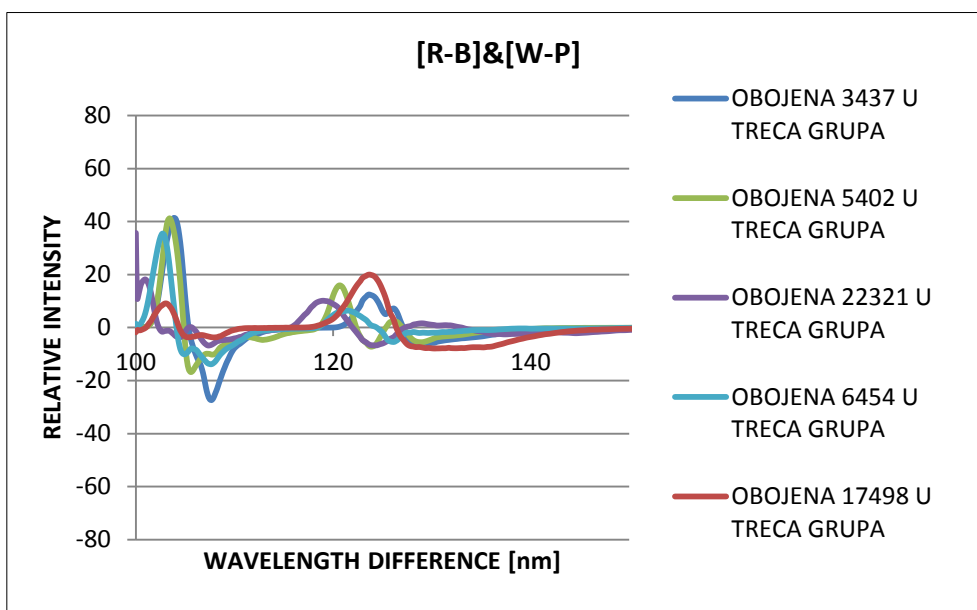
**Slika 7.12** OMIS spektri nebojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)

**Tabela 7.4** Karakteristični pikovi, razlika talasnih dužina na kojima se javljaju i njihovi intenziteti za 5 nebojenih pločica sa razmazima uzetim iz cervikalnog kanala (U) iz III PA grupe (5 pacijentkinja) (WLD-wavelength difference, I-intensity)

III PA U OZNAKA PLOČICE	I MAKSIMUM		I MINIMUM		II MAKSIMUM		II MINIMUM	
	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I	WLD (nm)	I
3437	107,28	53,34	111,86	-35,48	122,25	14,59	124,98	-15,36
5402	107,28	39,96	110,93	-30,36	121,74	14,27	124,16	-15,88
22321	106,51	48,06	111,31	-33,40	123,34	8,21	126,32	-9,07
6454	106,32	56,28	110,16	-43,19	122,97	6,29	125,73	-11,31
17498	106,90	47,32	111,69	-26,41	121,99	4,71	124,44	-9,38



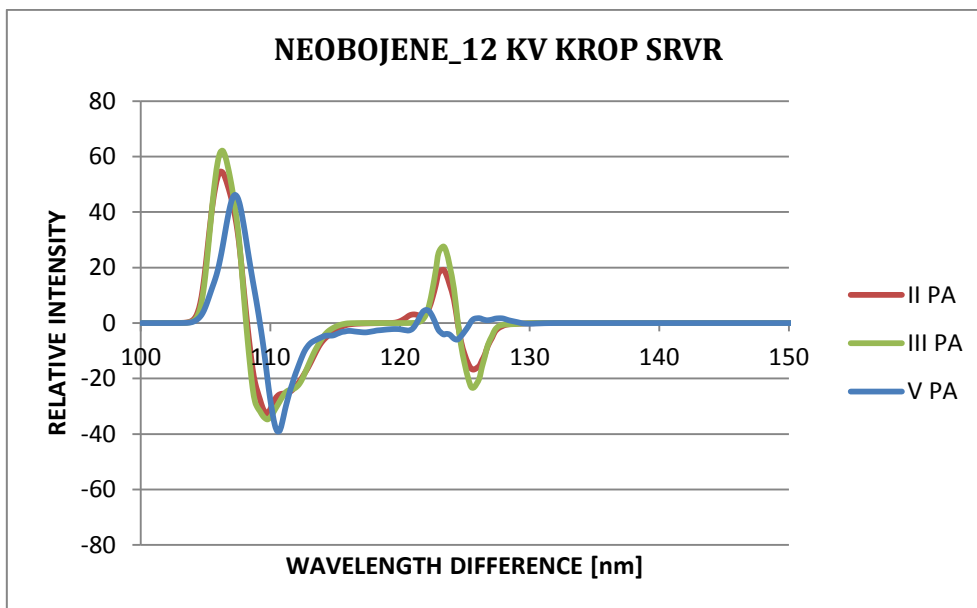
**Slika 7.13** OMIS spektri bojenih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti sa površine grlića materice (S)



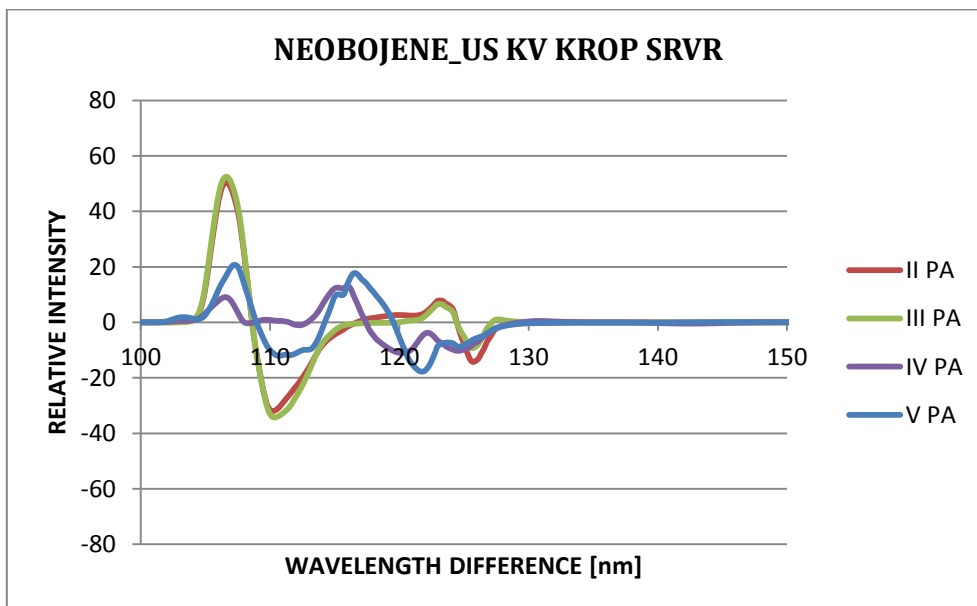
*Slika 7.14 OMIS spektri bojnih uzoraka cervikalnih ćelija pet pacijentkinja iz III grupe; uzorci su uzeti iz cervikalnog kanala (U)*

U trećoj fazi ispitivanja koja je izvedena tokom 2013. godine, prikupljeni su dodatni uzorci iz II i III Papanikolau grupe, kako bojani tako i nebojeni, dok je četvrta faza, izvedena 2014. godine, imala za cilj da obezbedi što veći broj uzoraka iz IV i V Papanikolau grupe, koje su najmanje zastupljene u ovom istraživanju.

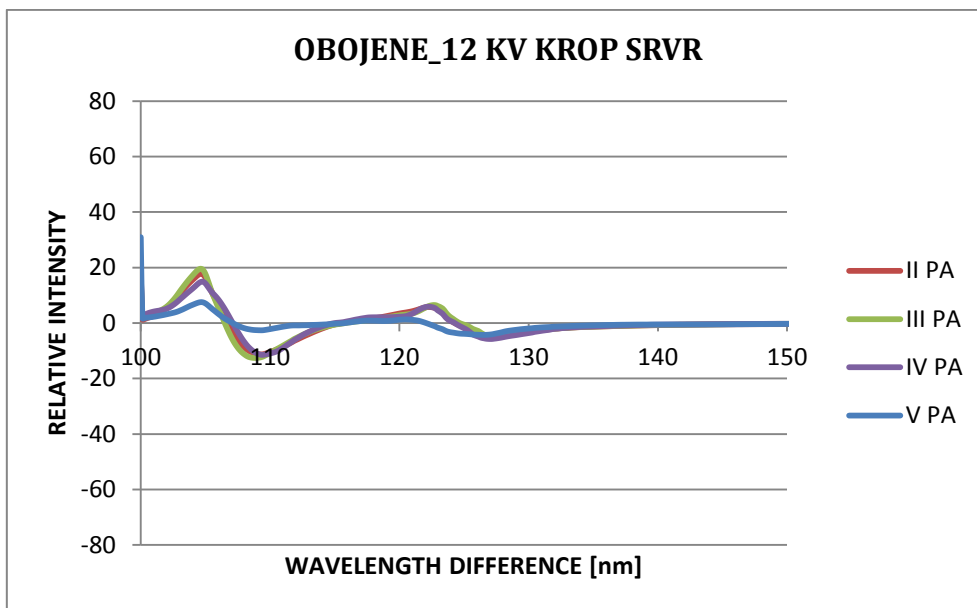
Nakon što su svi prikupljeni podaci dobijeni Optomagnetnom imidžing spektroskopijom objedinjeni i razvrstani po grupama na osnovu referentnog Papanikolau testa, pronađena je srednja vrednost svih merenja po grupama, po kategorijama: bojani/nebojeni uzorci, kao i po kategorijama: unutrašnjost kanala/spoljašnja površina grlića materice. Rezultantni OMIS spektri prikazani su na slikama 7.15-7.18.



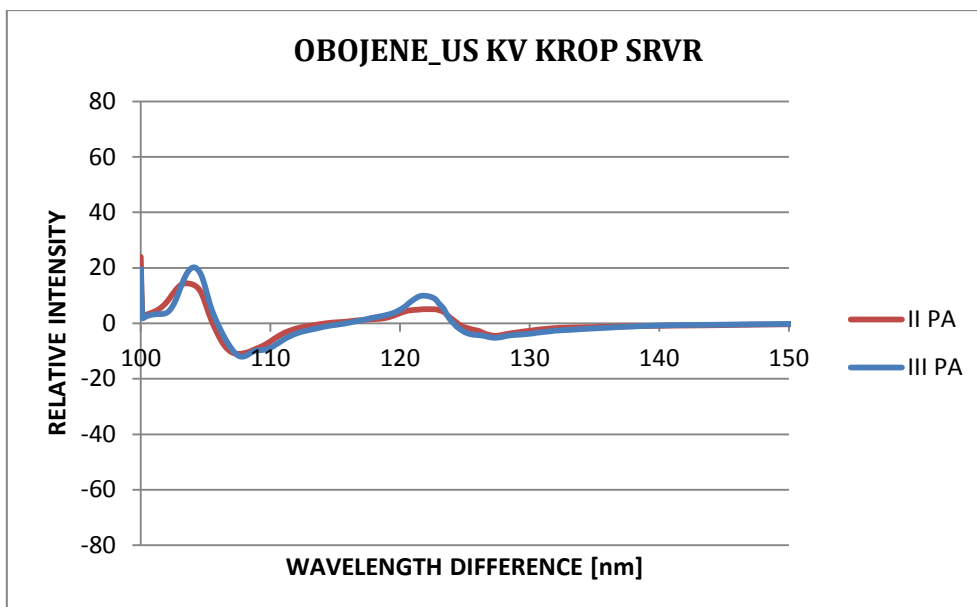
**Slika 7.15** Srednje vrednosti OMIS spektara nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan nebojeni uzorak sa oznakom 12 iz IV Papanikolau grupe



**Slika 7.16** Srednje vrednosti OMIS spektara nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US)



**Slika 7.17** Srednje vrednosti OMIS spektara bojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12)



**Slika 7.18** Srednje vrednosti OMIS spektara bojenih uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV i V Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan bojeni uzorak sa oznakom 12 iz navedenih Papanikolau grupa

### 7.1.3 POREĐENJE BOJENIH I NEBOJENIH UZORAKA ĆELIJA GRLIĆA MATERICE OBRADOM CELOKUPNE REGIJE OD INTERESA

Nakon što su Optomagnetnom imidžing spektroskopijom razmotreni bojeni i nebojeni uzorci ćelija grlića materice tako što je iz digitalne slike uzorka izvučena regija veličine 1000 piksela x 1000 piksela iz centralnog dela slike, prišlo se analizi celokupne regije uzorka (slika 7.19), pri čemu celokupna regija podrazumeva sliku uzorka kružnog oblika koja je izvučena iz originalne slike („kružno kropovanje“). Kružno kropovanje se vrši automatski u algoritmu za određivanje stanja epitelnog tkiva.



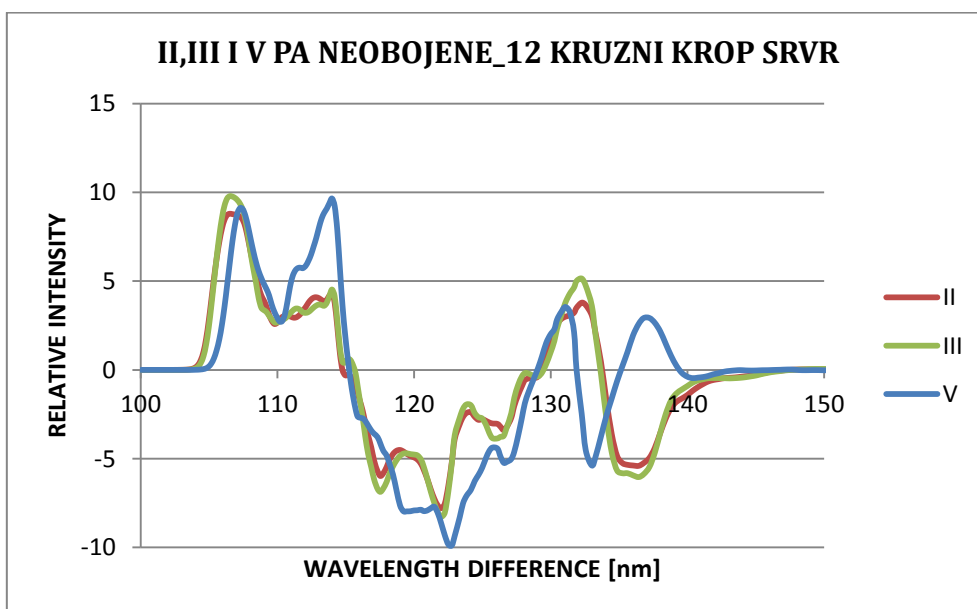
**Slika 7.19** Prikaz različitih delova iz originalne slike uzorka (a) koji su razmatrani: kvadratni krop iz centra slike (b) i kružni krop (c)

Za te potrebe razvijen je algoritam koji automatski obrađuje svih 2126 uzoraka i formira jednu Excel tabelu u koju upisuje sve relevantne podatke, kao i oznaku pacijenta, oznaku uzorka i Papanikolau grupu kojoj uzorak pripada.

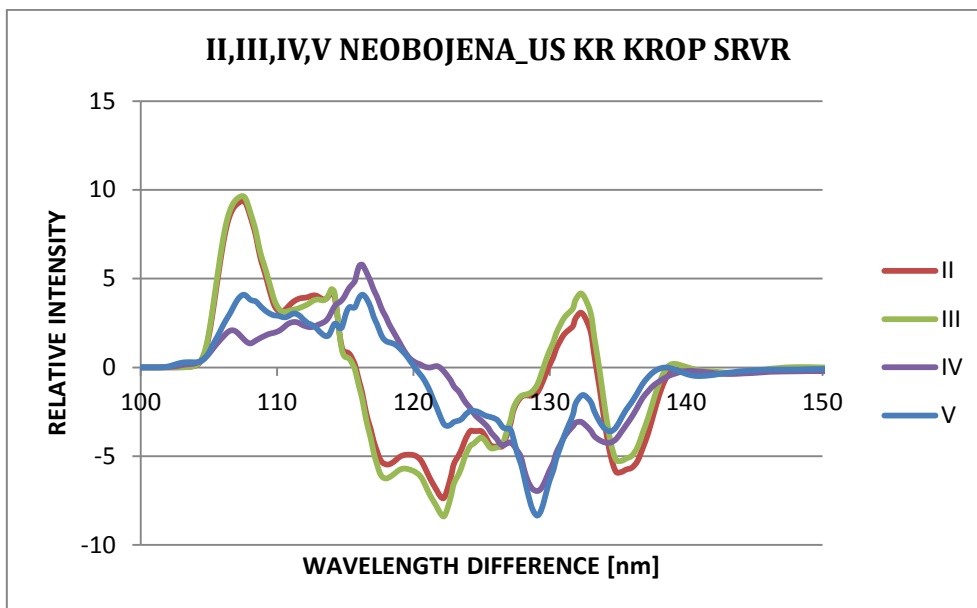
Rezultati obrade kružnog krova iz slike uzorka koji obuhvata celu površinu prikupljenog uzorka prikazani su na sledećim slikama i obuhvataju uporedne usrednjene OMIS spektre za II, III, IV i V grupu. Na dijagramima su, kao i u slučaju prethodno prikazanih OMIS rezultata za kvadratni krop dimenzija 1000 piksela x 1000 piksela, odvojeno prikazani slučajevi za koje znamo da li je uzorak iz kanala ili sa površine grlića materice (US) koji su namenski prikupljeni za potrebe ovog istraživanja i slučajevi za koje ne znamo koji je bris uzet iz kanala, a koji sa



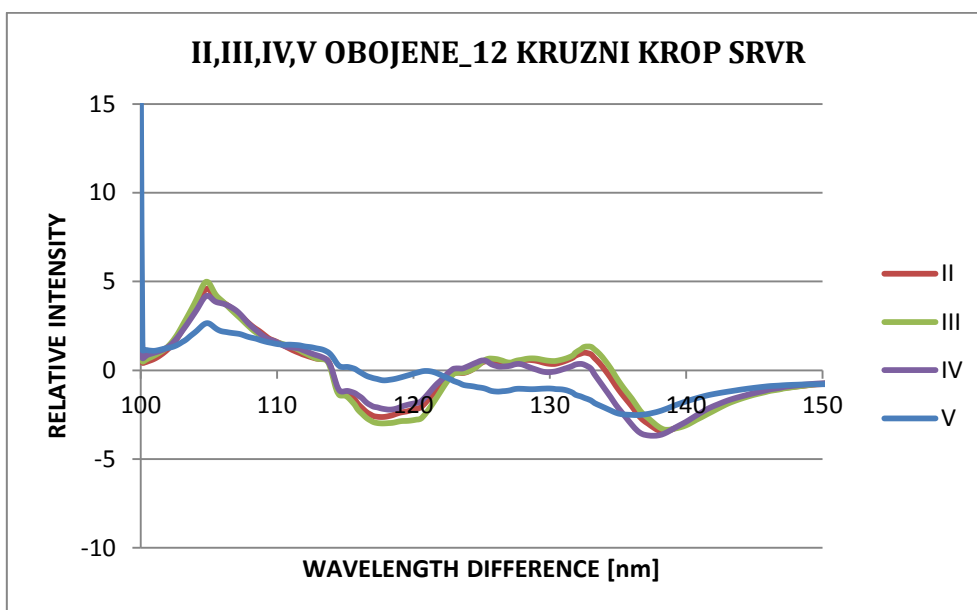
površine grlića (uzorci obeleženi sa 12) što predstavlja standardni postupak pri uzimanju uzoraka u kliničkoj praksi. Bilo je značajno utvrditi da li na rezultate utiče činjenica da je od jedne pacijentkinje prikupljeno četiri brisa, pri čemu su prvo prikupljeni brisevi za potrebe Papanikolau testa, a zatim brisevi za potrebe istraživanja. Mogući problemi se u ovom slučaju mogu javiti u vidu nezadovoljavajućeg uzorka u smislu nedovoljnog broja ćelija. Međutim, kao što se da videti sa slika koje slede (slike 7.20-7.23), to ovde nije bio slučaj.



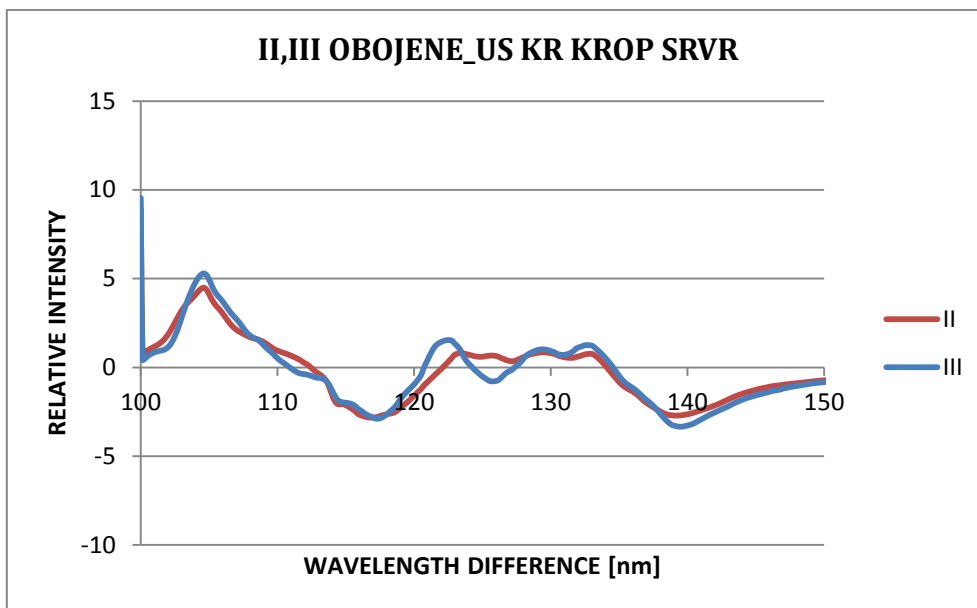
**Slika 7.20** Usrednjeni OMIS spektri nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan nebojeni uzorak sa oznakom 12 iz IV Papanikolau grupe



**Slika 7.21** Usrednjeni OMIS spektri nebojenih uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US)



**Slika 7.22** Usrednjeni OMIS spektri bojениh uzoraka koji pripadaju II, III, IV i V Papanikolau grupi za koje se ne zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka 12)



**Slika 7.23** Usrednjeni OMIS spektri bojjenih uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi za koje se zna da li su iz kanala grlića ili sa površine (oznaka US). Nije prikazan rezultat za uzorke iz IV i V Papanikolau grupe, jer nije postojao nijedan bojjen uzorak sa oznakom 12 iz navedenih Papanikolau grupa

## 7.2 KLASIFIKACIJA OMIS PODATAKA

Uzorci ćelija grlića materice prikupljeni u periodu od 4 godine, podvrgnuti su ispitivanju Optomagnetnom imidžing spektroskopijom, a zatim se, nakon objedinjenja svih prikupljenih OMIS podataka pristupilo testiranju različitih modela za klasifikaciju rezultata dobijenih OMIS metodom u cilju najboljeg razdvajanja normalnih od uzoraka ćelija grlića materice koji sadrže abnormalnosti.

Preliminarna analiza i ispitivanje optomagnetnih spektara uzoraka ćelija grlića materice u cilju njihove klasifikacije, koja je izvršena na početku ovih istraživanja, uključila je razmatranje kako nebojenih tako i bojjenih uzoraka i ispitivala je tačnost Naive Bayes klasifikatora sa unakrsnom validacijom u razdvajanju zdravih uzoraka od uzoraka karcinoma. Na prvobitno korišćenom setu od ukupno 135 bojjenih uzoraka, od kojih je bilo 69 uzoraka koji pripadaju II Papanikolau grupu i

66 uzoraka koji pripadaju V Papanikolau grupi (karcinom), klasifikator je pokazao visok procenat tačnosti: senzitivnost od 97.92% i specifičnost od 78.16% [88]. Drugo preliminarno ispitivanje izvršeno je na nebojenim uzorcima, na setu od ukupno 320 uzoraka ćelija grlića materice, koji je obuhvatio 249 uzoraka iz II Papanikolau grupe, 50 uzoraka iz III Papanikolau grupe, 16 uzoraka iz IV Papanikolau grupe i 14 uzoraka iz V Papanikolau grupe. Korišćenjem istog klasifikatora, Naive Bayes, i četiri atributa, dobijeni su senzitivnost od 75% i specifičnost od 97% za klasifikaciju uzoraka u dve grupe (zdravo/kancer) [89].

Na osnovu ovih rezultata pristupilo se testiranju još tri dodatna klasifikatora, te su na svim prikupljenim uzorcima testirana ukupno 4 različita modela klasifikacije: Naive Bayes klasifikator, Stabla odlučivanja, Random Forest i SVM. Upoređivanjem performansi navedenih klasifikatora za bojene i nebojene uzorke, doneta je odluka o izboru klasifikatora koji će se koristiti u algoritmu za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva grlića materice. Algoritam za testiranje svih navedenih klasifikatora razvijen je u R paketu. Efikasnost klasifikatora procenjena je na osnovu senzitivnosti, specifičnosti i ROC krive odnosno površine ispod ROC krive (AUC).

Skup podataka bojениh uzoraka obuhvatao je 1632 observacije, dok je skup podataka nebojenih uzoraka obuhvatao 336 observacija. Skupovi podataka podeljeni su na podatke za obučavanje i podatke za testiranje u razmeri 80% : 20% slučajnim izborom. U odnosu na OMIS parametre koji su korišćeni kao atributi u klasifikaciji, razmatrana su dva tipa klasifikacije sa različitim atributima: u prvom korišćeno je 6 atributa za svaku observaciju: intenzitet glavnog maksimuma i minimuma (I+,I-), talasne dužine na kojima se glavni maksimum i minimum nalaze (WD+, WD-) i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova (P+,P-) iz OMIS spektra, dok je u drugom odabrano 160 intenziteta iz OMIS spektra na talasnim dužinama u opsegu od 103.54 nm do 143.483 nm koji su korišćeni kao atributi u klasifikaciji. Dati opseg je odabran s obzirom da se u njemu javljaju promene u spektru koje su karakteristične za određene Papanikolau grupe, odnosno stanje tkiva.

## 7.2.1 BINARNA KLASIFIKACIJA

U odnosu na granicu između zdravih i bolesnih uzoraka, urađena su dva tipa binarne klasifikacije. Prvi tip binarnog klasifikatora je uzorke klasifikovao u 2 grupe: zdravo/bolesno, pri čemu je granica između zdravog i bolesnog postavljena na LSIL, odnosno nalazi uzoraka LSIL+ smatrali su se pozitivnim. Drugi tip binarne klasifikacije podrazumevao je klasifikaciju: zdravo/kancer i u tom slučaju granica između ove dve klase postavljena je na IV Papanikolau grupu, odnosno klasifikacija je vršena u grupe: (II PA i III PA)/(IV PA i V PA).

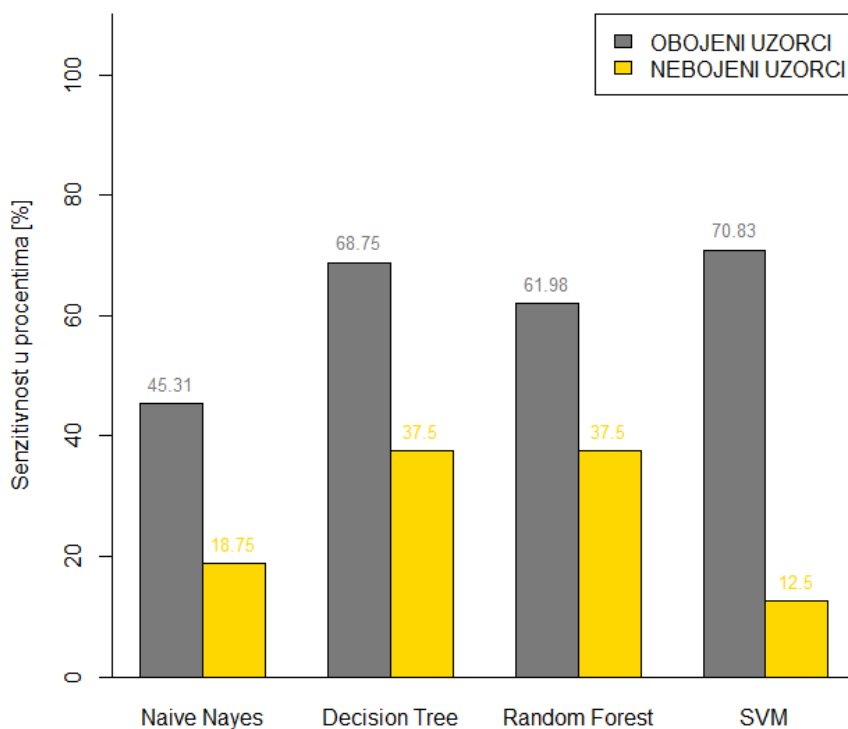
Algoritmi razvijeni u paketu R koji su korišćeni za binarnu klasifikaciju OMIS podataka učitavaju OMIS podatke (spektre), izdvajaju parametre koji se koriste kao obeležja, korišćenjem funkcije createDataPartition vrši podelu podataka na obučavajući skup i test skup u odnosu 80:20% tako što slobodnim izborom bira podatke u okviru svake klase čuvajući pritom ukupnu distribuciju klasa podataka, zatim treniraju sve testirane modele i vrše predikciju na test skupovima, računaju specifičnost, senzitivnost i ostale parametre efikasnosti modela, da bi na kraju grafički prikazali rezultate klasifikacije i iscrtali ROC krive.

### **7.2.1.1 Binarna klasifikacija na osnovu 6 OMIS parametara: intenzitet glavnog maksimuma i minimuma, talasne dužine na kojima se glavni maksimum i minimum nalaze i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova**

Iz OMIS spektara korišćeni su sledeći parametri: intenzitet glavnog maksimuma i minimuma, talasne dužine na kojima se glavni maksimum i minimum nalaze i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova. Ukupno 6 parametara je korišćeno za svaku observaciju (odnosno svako OMIS merenje). Rezultati klasifikacije dati su u odeljku I i II za 6 parametara, a zatim i za 160 parametara u odeljku 7.2.1.2 pri čemu je algoritam prilagođen posebno za taj slučaj.

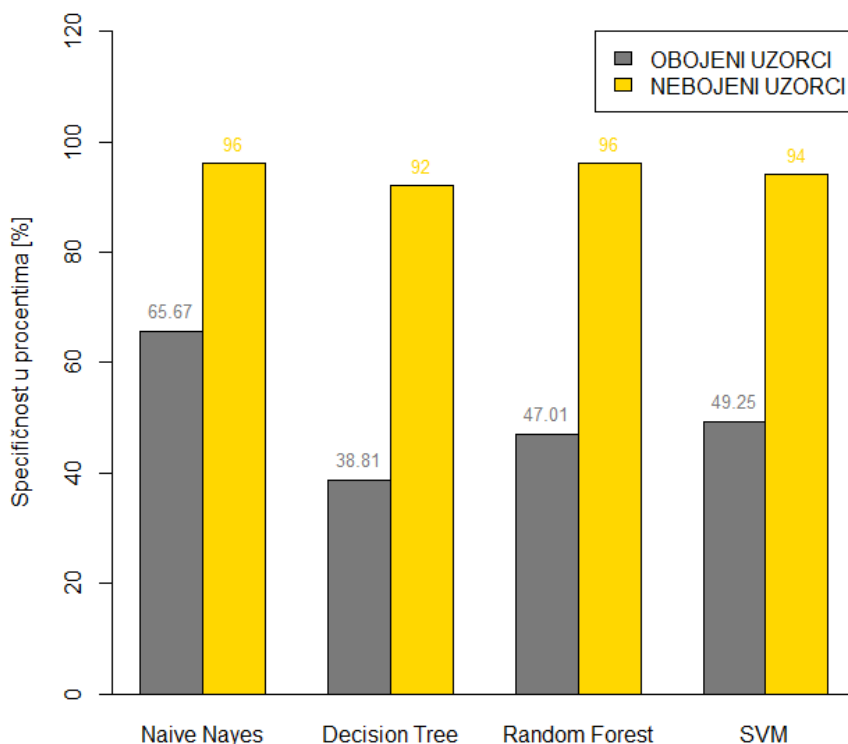
## I. Granica između grupa: LSIL

U prvom slučaju granica između zdravih i bolesnih uzoraka postavljena je na LSIL. Klasu I činili su uzorci iz II Papanikolau grupe, a klasu II uzorci iz III, IV i V Papanikolau grupe. Skup podataka je činilo 1632 bojena uzorka i 336 nebojena uzorka, pri čemu je bojениh uzoraka iz klase I bilo 672, a iz klase II 960. Nebojenih uzoraka iz klase I bilo je ukupno 254, iz klase II 82. Kod SVM klasifikatora testirani su radijalni i polinomni kernel pri klasifikovanju obojenih i nebojenih uzoraka. Uporedni rezultati efikasnosti četiri korišćena klasifikatora prikazani su na slikama koje slede. Na slici 7.24 prikazana je senzitivnost kao mera efikasnosti za četiri klasifikatora dobijena za bojene i nebojene uzorke.



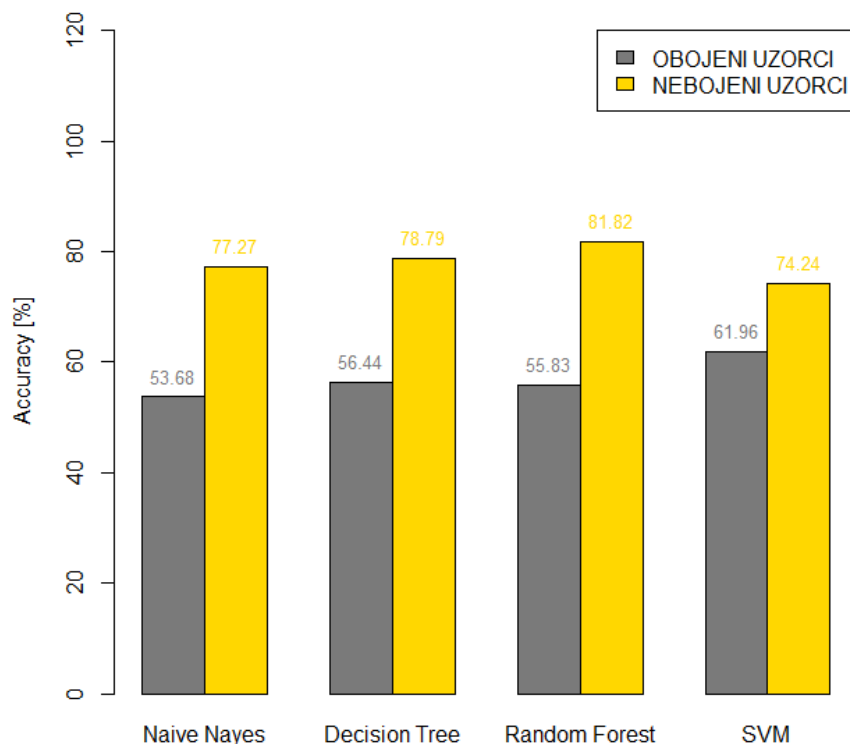
**Slika 7.24** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

Na slici 7.25 prikazani su procenti postignute specifičnosti kao druge mere efikasnosti, koja predstavlja procenat pozitivnih slučajeva koji su klasifikovani kao bolesni.



**Slika 7.25** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

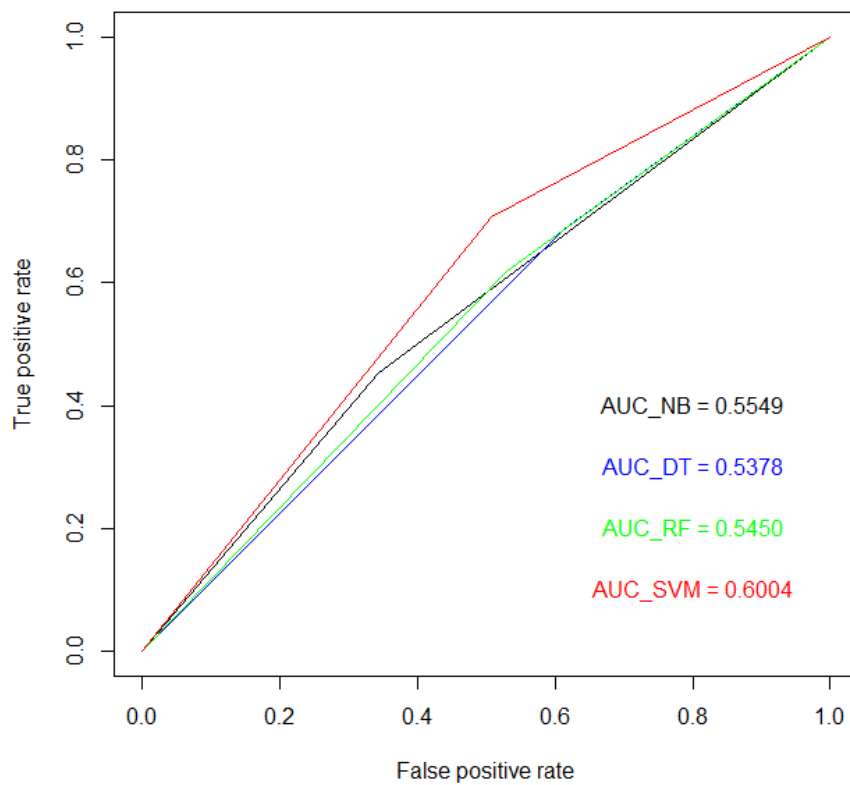
Preciznost sva četiri klasifikatora u odnosu na bojene i nebojene uzorke prikazana je na slici 7.26.



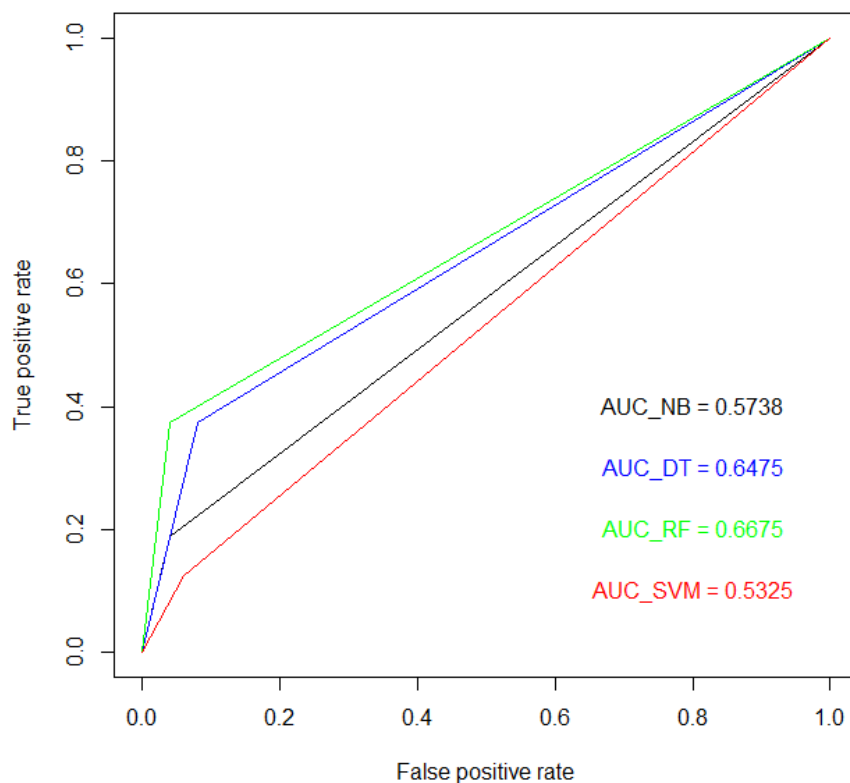
**Slika 7.26** Uporedno prikazane tačnosti četiri klasifikatora za binarnu klasifikaciju bojenih i nebojenih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije kod bojenih i 336 kod nebojenih, pri čemu je prag za klase: zdravo/bolesno postavljen na LSIL

Na slikama 7.27 i 7.28 prikazane su ROC krive za četiri testirana klasifikatora za slučaj bojenih i nebojenih uzoraka, respektivno.





**Slika 7.27** ROC kriva za štiri klasifikatorja pri binarni klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojnih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL

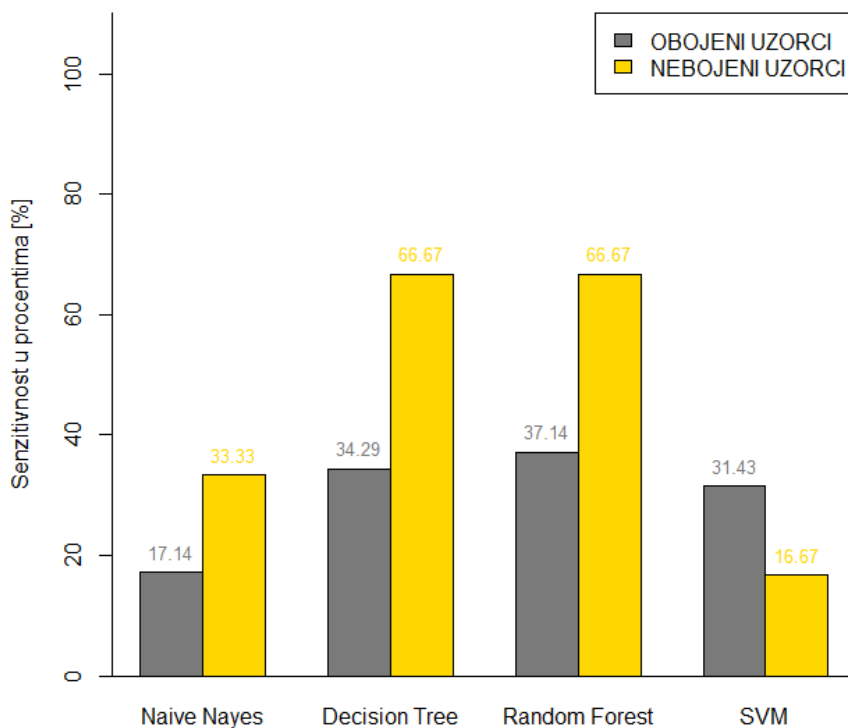


**Slika 7.28** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 6 atributa i 336 observacija, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL

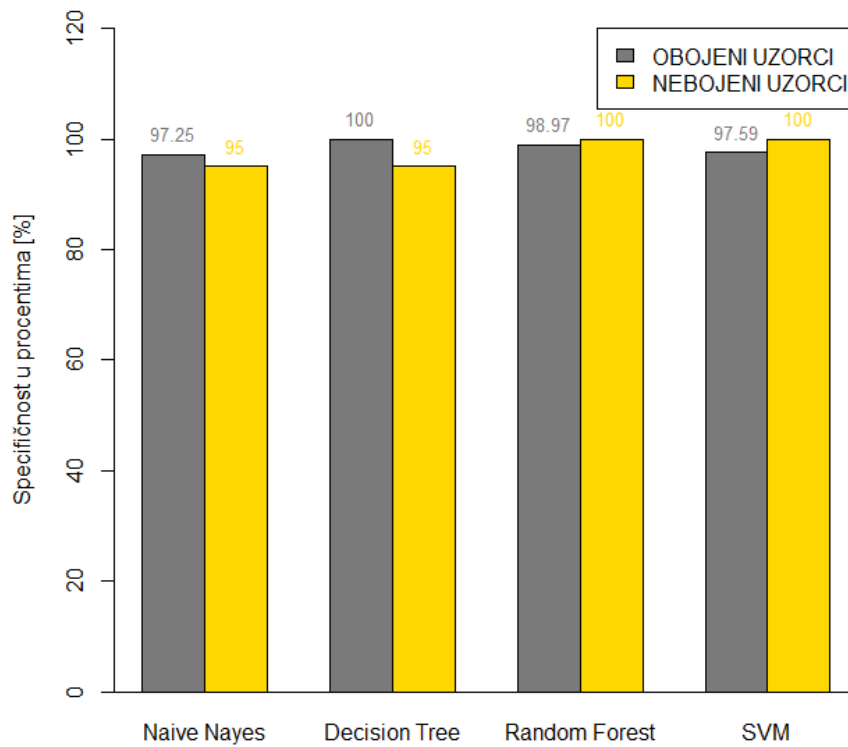
## II. Granica između grupa: IV PA

Uzorci su podeljeni u dve grupe: jednu grupu su činili uzorci koji pripadaju II i III Papanikolau grupi, dok su drugu činili uzorci iz IV i V Papanikolau grupe, pri čemu IV Papanikolau grupa označava kancer *in situ*, a V Papanikolau grupa invanzivni karcinom. Na taj način su razdvojeni uzorci u stadijumu karcinoma od ostalih uzoraka. Kao i u prethodnom slučaju, korišćeno je šest atributa (parametara OMIS spektra) i isti broj bojenih i nebojenih uzoraka je korišćen za treniranje i testiranje klasifikatora u R paketu. Skup podataka u klasi I u slučaju bojenih uzoraka činilo je 1456, a u klasi II 176 uzoraka. Skup podataka u klasi I u

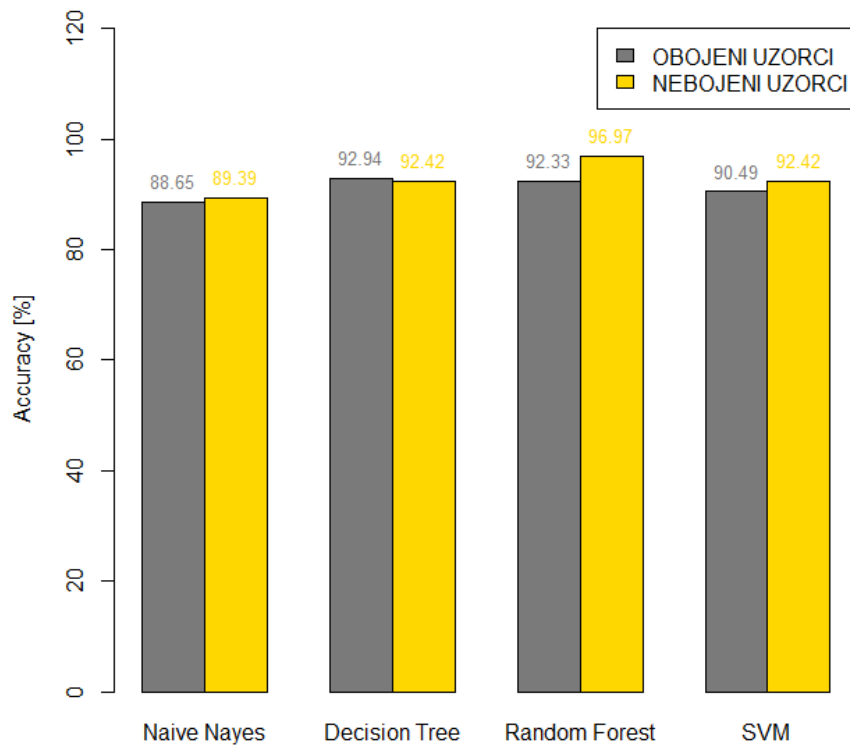
slučaju nebojenih uzoraka činilo je 304, a u klasi II 32 uzorka. Na slikama koje slede (Slike 7.29-7.31) prikazani su rezultati klasifikacije koji ukazuju na kvalitet testiranih klasifikatora.



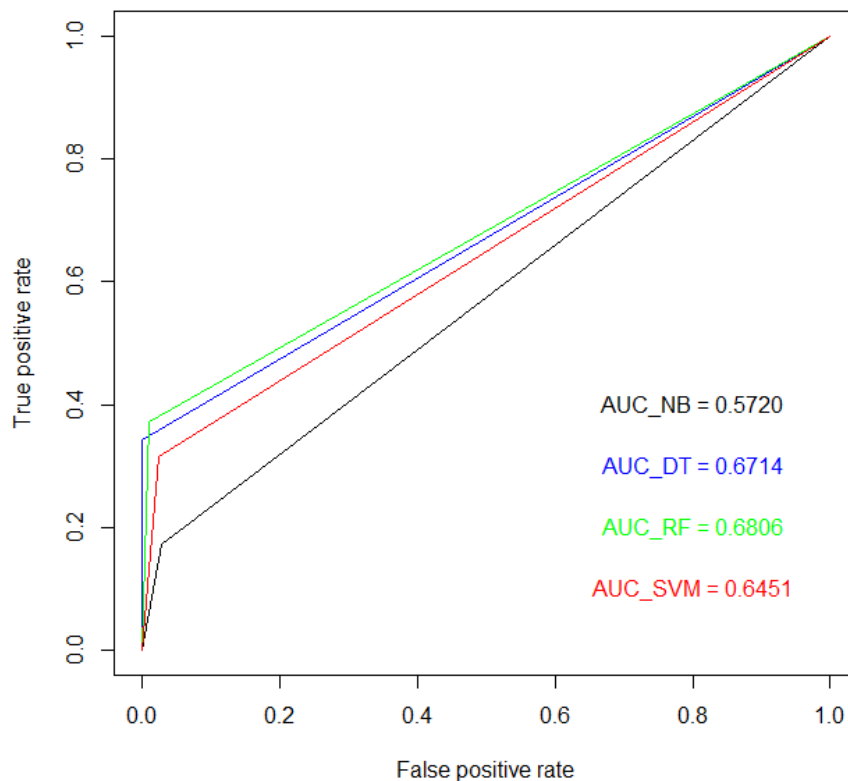
**Slika 7.29** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu



**Slika 7.30** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 6 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 6 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu

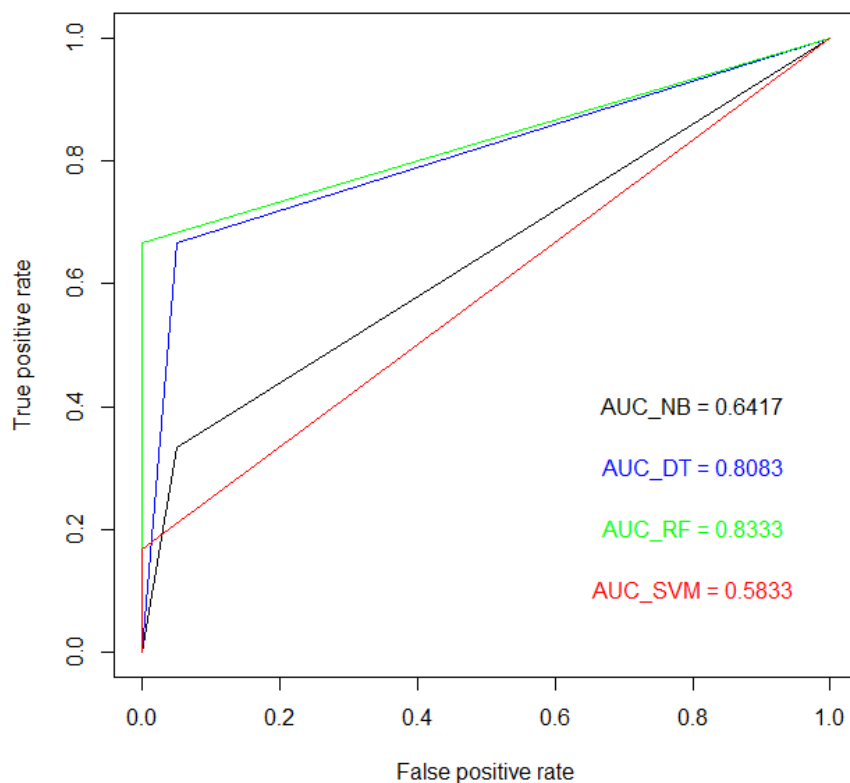


**Slika 7.31** Uporedno prikazane tačnosti četiri klasifikatora za binarnu klasifikaciju bojenih i nebojenih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije kod bojenih i 336 kod nebojenih, pri čemu je prag za klase: zdravo/bolesno postavljen na IV Papanikolau grupu



**Slika 7.32** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojnih uzoraka sa 6 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

Pri klasifikaciji bojnih uzoraka u dve klase sa pragom LSIL, dobijene vrednosti AUC takođe nisu dovoljno velike kao i u slučaju bojnih uzoraka u dve klase sa pragom IV PA i kreću se od 0.57-0.68, što ne predstavlja zadovoljavajući rezultat. S druge strane, AUC vrednosti kod klasifikacije nebojnih uzoraka su značajno veće što ukazuje na bolju efikasnost primenjenih klasifikatora u slučaju nebojnih uzoraka. Najbolji rezultat klasifikacije se dobija za Random Forest model, gde je AUC=0.83.



**Slika 7.35** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 6 atributa i 336 observacija, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

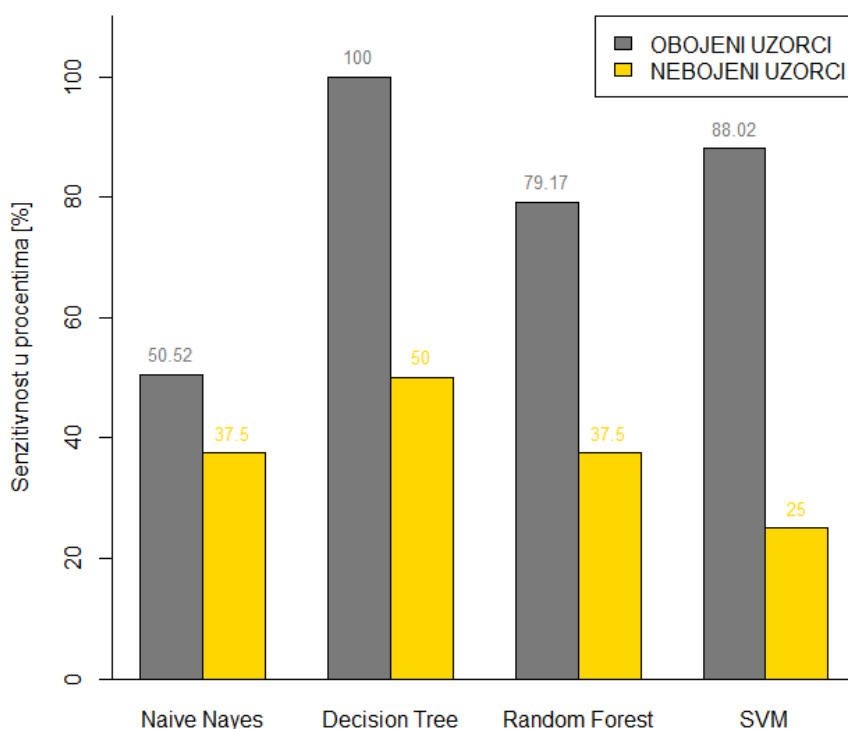
### 7.2.1.2 OMIS parametri: 160 intenziteta u opsegu talasnih dužina od 103.54 nm do 143.483 nm

Na osnovu analize OMIS spektara ustanovljeno je da je opseg talasnih dužina od 103.54 nm do 143.483 nm posebno važan za klasifikaciju uzoraka ćelija grlića materice, s obzirom da se u ovom opsegu javljaju karakteristični pikovi koji se intenzitetom i pozicijom razlikuju u zavisnosti od Papanikolau grupe kojoj uzorak pripada. Ispitivanjem različitih podopsega ovog primarnog opsega ustanovljeno je da se razmatranjem podopsega ne dobijaju bolji rezultate klasifikacije, pa je skup svih intenziteta koji odgovaraju primarnom opsegu

predstavljao skup atributa koji je razmatran u klasifikaciji čiji su rezultati prikazani u ovom delu rada. Kao i do sada, razmatrana je klasifikacija u dva slučaja: kada je granica između grupa postavljena na LSIL i kada je granica postavljena na IV Papanikolau grupu.

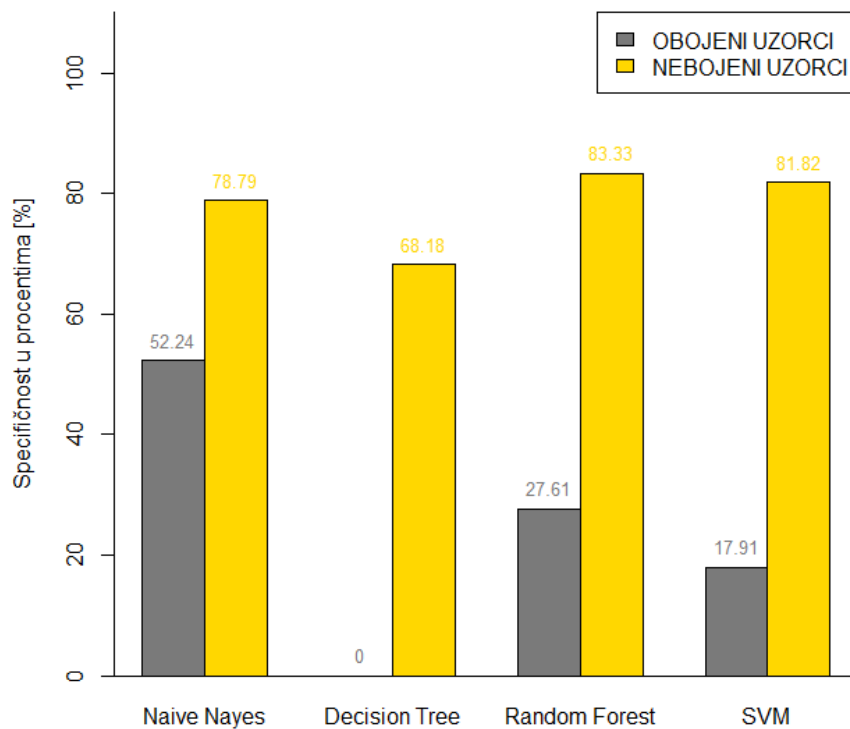
### I. Granica između grupa: LSIL

Klasifikacija bojenih i nebojenih uzoraka pokazala je značajne razlike u efikasnosti četiri testirana klasifikatora kada je skup atributa obuhvatao 160 parametara OMIS spektra (Slike 7.34-7.36).

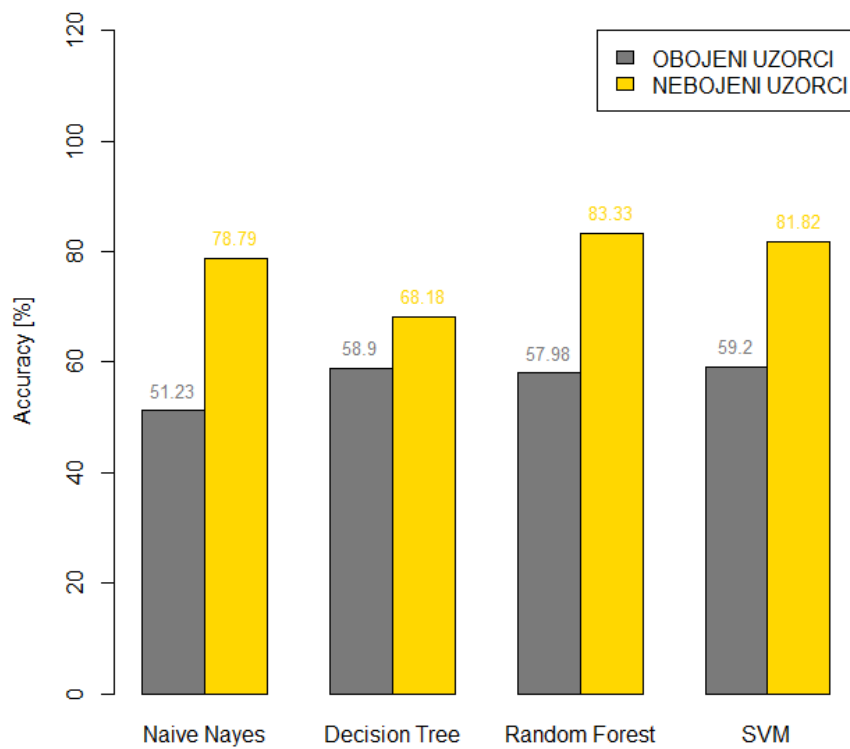


**Slika 7.34** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojenih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL

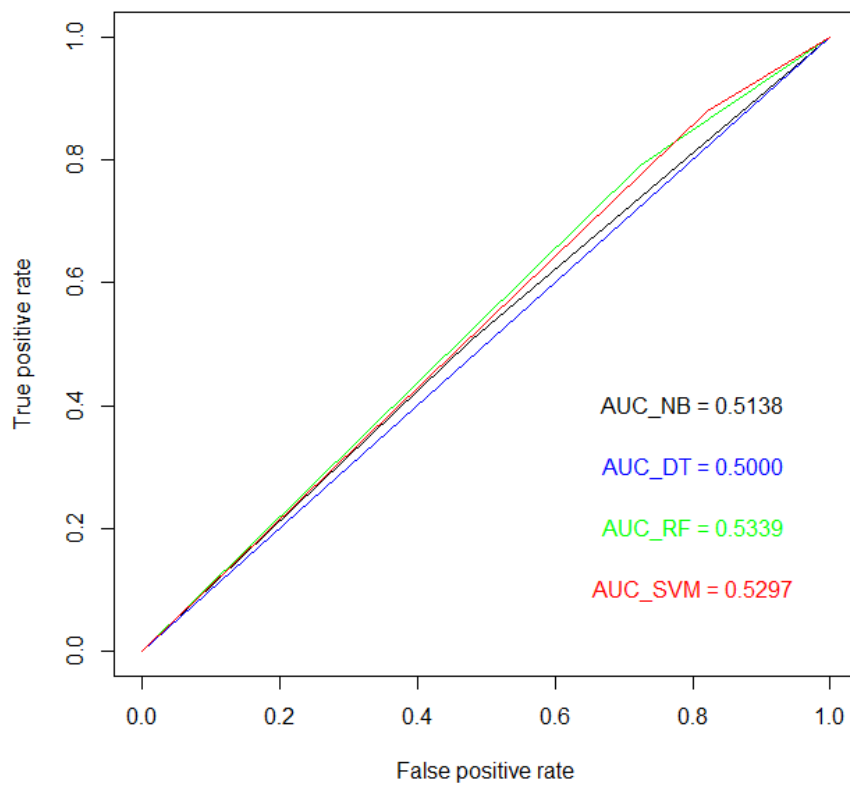




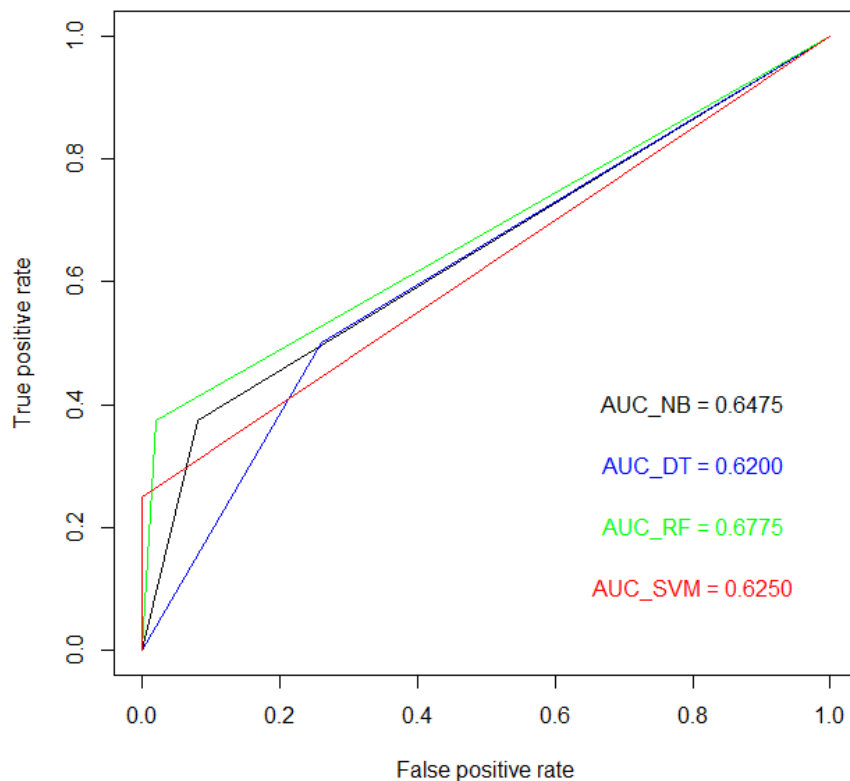
**Slika 7.35** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL



**Slika 7.36** Tačnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojениh uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na LSIL



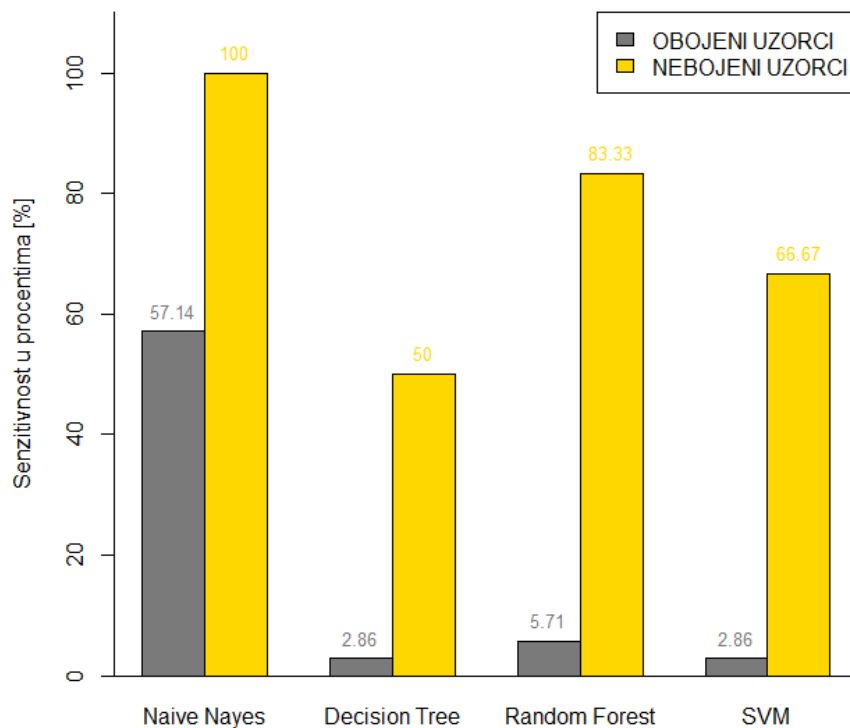
**Slika 7.37** ROC kriva za štiri klasifikatorja pri binarni klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojenih uzoraka sa 160 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL



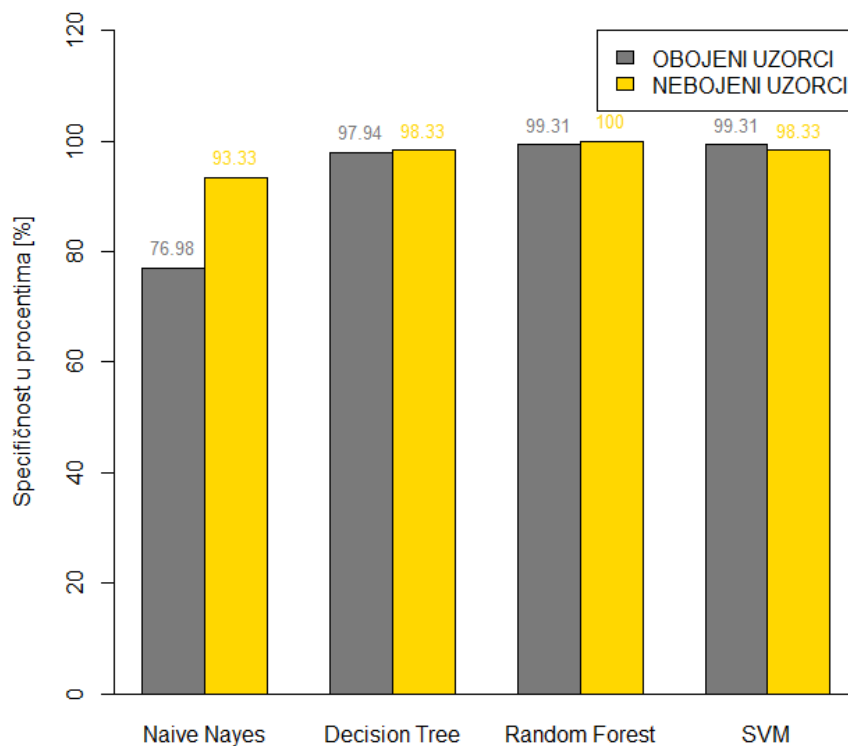
**Slika 7.38** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 160 atributa i 336 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na LSIL

## II. Granica između grupa: IV Papanikolau grupa

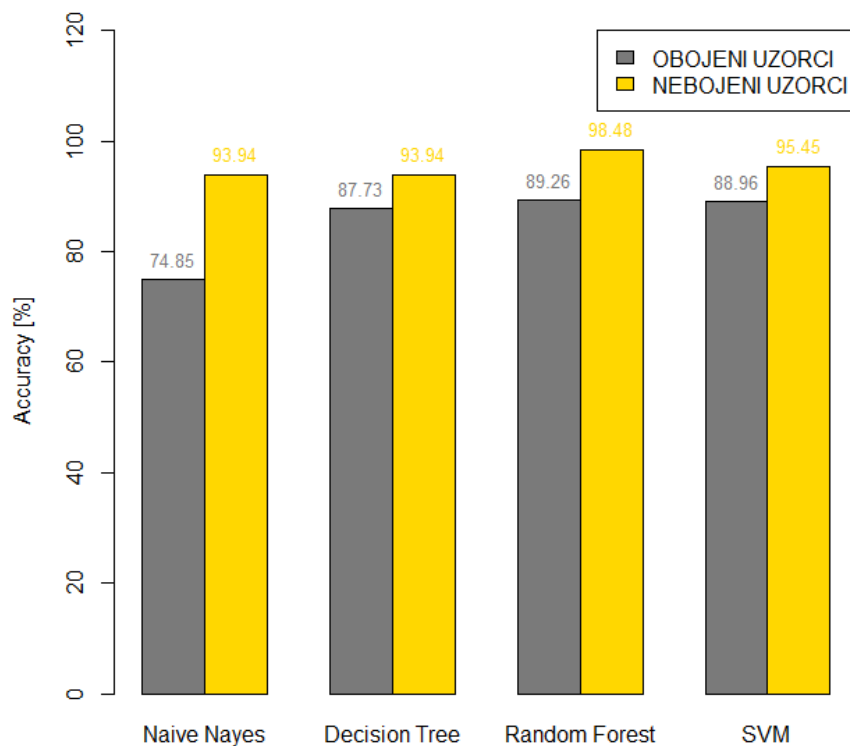
Na osnovu prikazane uporedne specifičnosti, senzitivnosti i tačnosti četiri klasifikatora za slučaj bojnih i nebojenih uzoraka (slike 7.39-7.41) utvrđeno je da u ovom slučaju najbolje rezultate daje model Naive Bayes klasifikacije za bojene uzorke, a za nebojene Random Forest i Naive Bayes.



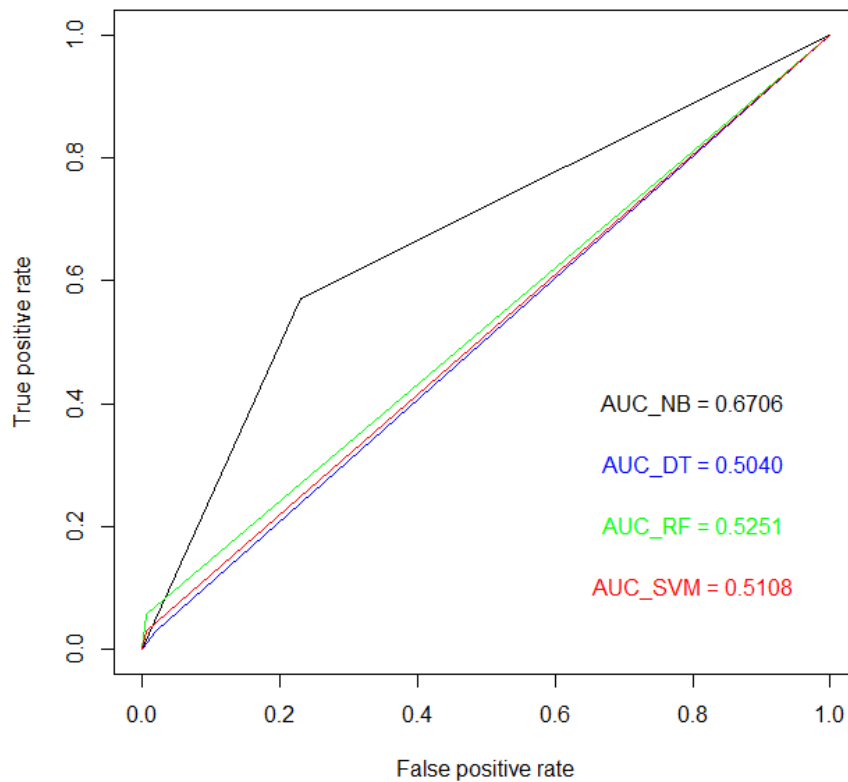
**Slika 7.39** Senzitivnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojenih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu



**Slika 7.40** Specifičnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojanih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu

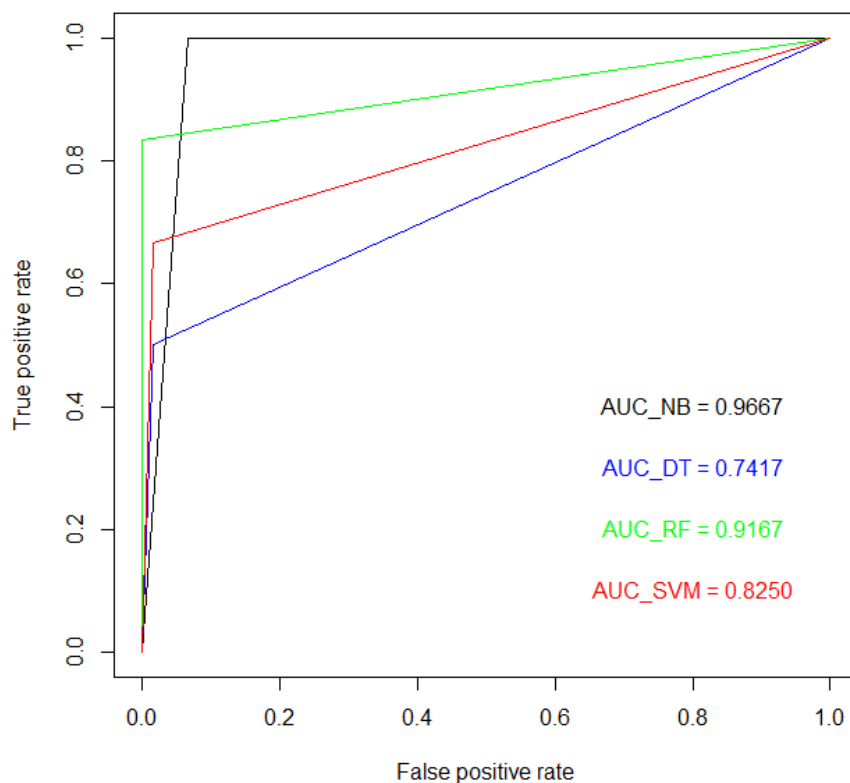


**Slika 7.42** Tačnost u procentima četiri klasifikatora za bojene (siva) i nebojene (žuta) uzorke. Binarna klasifikacija rađena je na skupu od 1632 observacije i 160 atributa bojenih uzoraka i 336 observacije i 160 atributa nebojenih uzoraka. Klase su: zdravo/bolesno, sa pragom postavljenim na IV Papanikolau grupu



**Slika 7.42** ROC kriva za štiri klasifikatora pri binarni klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) bojnih uzoraka sa 160 atributa i 1632 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu





**Slika 7.43** ROC kriva za četiri klasifikatora pri binarnoj klasifikaciji (klase:bolesno/zdravo) nebojenih uzoraka sa 160 atributa i 336 observacije, pri čemu je granica između bolesnog i zdravog postavljena na IV Papanikolau grupu

## 7.2.2 KLASIFIKACIJA U 4 KLASE

Klasifikacija u četiri klase, pri čemu su klase određene pripadnosti svakoj od četiri Papanikolau grupe, rađena je posebno za bojene i nebojene uzorke. Klasifikacija bojениh i nebojenih uzoraka rađena je na osnovu 6 OMIS parametara: intenzitet glavnog maksimuma i minimuma, talasne dužine na kojima se glavni maksimum i minimum nalaze i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova u četiri klase: II, III, IV i V Papanikolau grupe. Skup bojениh uzoraka obuhvatao je 1632 observacije i 6 atributa, dok je skup nebojenih uzoraka obuhvatao 336 observacije i 6 atributa.

Algoritam za testiranje različitih modela klasifikacije u četiri klase učitava OMIS spektre, vrši podelu na obučavajući skup i test skup, trenira modele i vrši predikciju test podataka, preko matrice konfuzije računa interklasnu senzitivnost, specifičnost, tačnost i ostale parametre koji ocenjuju performanse modela, a na kraju grafički prikazuje rezultate klasifikacije. Ovi rezultati su prikazani tabelarno u poglavljima 7.2.2.1 i 7.2.2.2.

### 7.2.2.1 Klasifikacija bojenih uzoraka na osnovu 6 OMIS parametara u četiri klase

Klasifikacija bojenih i nebojenih uzoraka u četiri klase: II, III, IV i V Papanikolau grupe izvršena je korišćenjem pet različitih modela: Naive Bayes, Random Forest, Decision Tree, Decision Tree sa bagging metodom i SVM. Skup bojenih uzoraka obuhvatao je ukupno 1632 uzorka: 672 uzorka iz II Papanikolau grupe, 784 uzorka iz III Papanikolau grupe, 82 uzorka iz IV Papanikolau grupe i 94 uzorka iz V Papanikolau grupe. Skup nebojenih uzoraka obuhvatao je ukupno 336 uzorka: 254 uzorka iz II Papanikolau grupe, 50 uzorka iz III Papanikolau grupe, 16 uzorka iz IV Papanikolau grupe i 16 uzorka iz V Papanikolau grupe. Performanse svakog od modela date su tabelama 7.5-7.14. Prikazane su vrednosti interklasne senzitivnosti, specifičnosti, tačnosti, PPV, NPV, kapa i CI (eng. Confidence Interval).

**Tabela 7.5** Performanse Naive Bayes klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

Naive Bayes	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	71.64%	41.67%	37.50%	5.56%
Specifičnost	47.37%	79.17%	96.75%	96.41%
PPV	48.98%	65%	37.50%	8.33%
NPV	70.31%	59.38%	96.75%	94.55%
Tačnost	51.85%			
Kappa	0.1931			
95% CI	(0.4626, 0.5741)			

**Tabela 7.6** Performanse Decision Tree klasifikatora pri klasifikaciji bojnih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

DT	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	73.13%	39.74%	12.50%	0%
Specifičnost	45.79%	65.48%	99.68%	100%
PPV	48.76%	51.67%	66.67%	NaN
NPV	70.73%	53.92%	95.64%	94.44%
Tačnost	50%			
Kappa	0.1145			
95% CI	(0.4442, 0.5558)			

**Tabela 7.7** Performanse Random Forest klasifikatora pri klasifikaciji bojnih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

RF	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	49.25%	58.97%	50%	44.44%
Specifičnost	65.26%	54.76%	98.70%	98.69%
PPV	50%	54.76%	66.67%	66.67%
NPV	64.58%	58.97%	97.43%	96.80%
Tačnost	53.7%			
Kappa	0.199			
95% CI	(0.4811, 0.5923)			

**Tabela 7.8** Performanse DTbagging klasifikatora pri klasifikaciji bojnih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

DTbagging	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	49.25%	57.05%	56.25%	33.33%
Specifičnost	64.21%	54.76%	98.38%	98.37%
PPV	49.25%	53.24%	64.28%	54.55%
NPV	64.21%	57.86%	97.74%	96.16%
Tačnost	52.47%			
Kappa	0.1801			
95% CI	(0.4688, 0.5802)			

**Tabela 7.9** Performanse SVM klasifikatora pri klasifikaciji bojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

SVM	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	46.27%	48.08%	31.25%	16.67%
Specifičnost	57.89%	48.81%	98.70%	97.06%
PPV	43.66%	46.58%	55.56	25
NPV	60.44%	50.31%	96.51%	95.19%
Tačnost	44.75%			
Kappa	0.0409			
95% CI	(0.3925, 0.5035)			

#### 7.2.2.2 Klasifikacija nebojenih uzoraka na osnovu 6 OMIS parametara u četiri klase

**Tabela 7.10** Performanse Naive Bayes klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

Naive Bayes	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	20%	90%	33.33%	33.33%
Specifičnost	75%	28.57%	98.41%	100%
PPV	71.43%	18.37%	50%	100%
NPV	23.08%	94.12%	96.88%	96.92%
Tačnost	31.82%			
Kappa	0.0592			
95% CI	(0.2089, 0.4444)			

**Tabela 7.11** Performanse Decision Tree klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

DT	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	84%	0%	33.33%	66.67%
Specifičnost	18.75%	87.50%	98.43%	100%
PPV	76.36%	0%	50%	100%
NPV	27.27%	83.05%	96.88%	98.44%
Tačnost	68.18%			
Kappa	0.0906			
95% CI	(0.5556, 0.7911)			

**Tabela 7.12** Performanse Random Forest klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

RF	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	100%	20%	33.33%	33.33%
Specifičnost	25%	100%	100%	100%
PPV	80.65%	100%	100%	100%
NPV	100%	87.50%	96.92%	96.92%
Tačnost	81.82%			
Kappa	0.3561			
95% CI	(0.7039, 0.9024)			

**Tabela 7.13** Performanse DTbagging klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

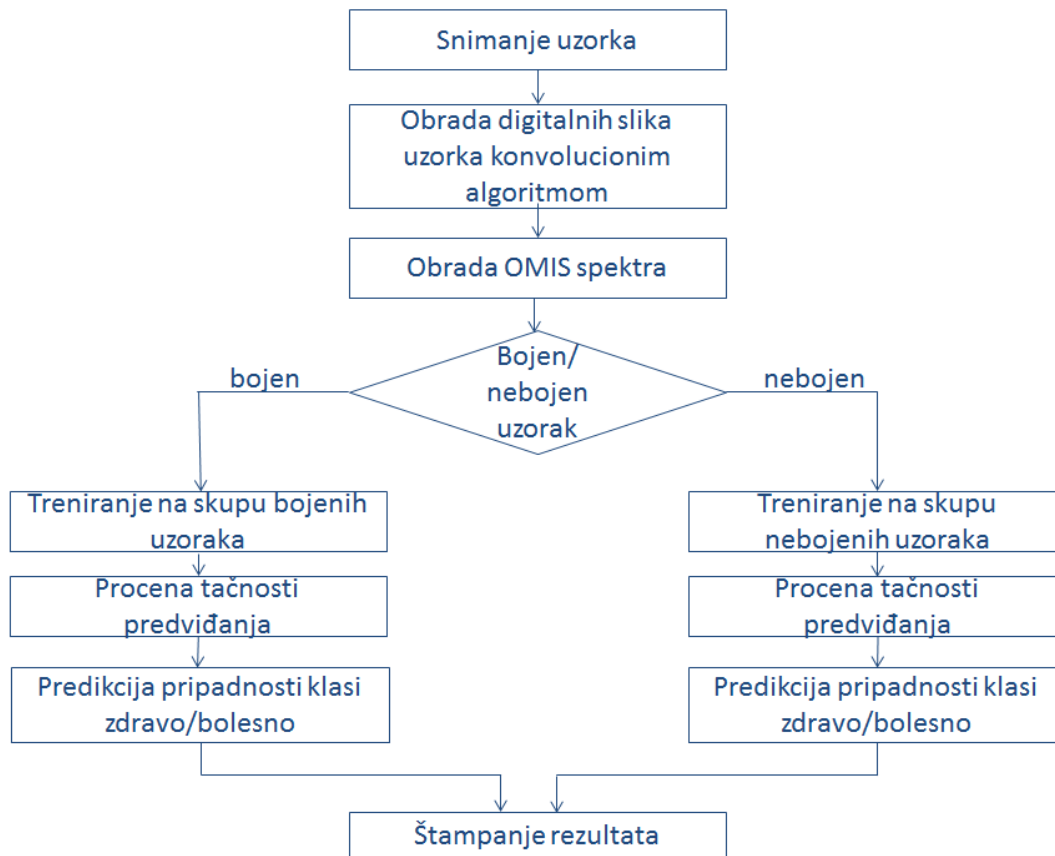
DTbagging	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	94%	100%	33.33%	33.33%
Specifičnost	25%	94.64%	98.41%	100%
PPV	79.66%	25%	50%	100%
NPV	57.14%	85.48%	96.88%	96.92%
Tačnost	75.76%			
Kappa	0.2218			
95% CI	(0.6364, 0.8546)			

**Tabela 7.14** Performanse SVM klasifikatora pri klasifikaciji nebojenih uzoraka (skup 1632 x 6) u četiri klase određene Papanikolau grupama II, III, IV i V

SVM	Klase			
	II PA	III PA	IV PA	V PA
Senzitivnost	100%	100%	0%	0%
Specifičnost	6.25%	100%	100%	100%
PPV	76.92%	100%	NaN	NaN
NPV	100%	86.15%	95.46%	95.46%
Tačnost	77.27%			
Kappa	0.0967			
95% CI	(0.653, 0.8669)			

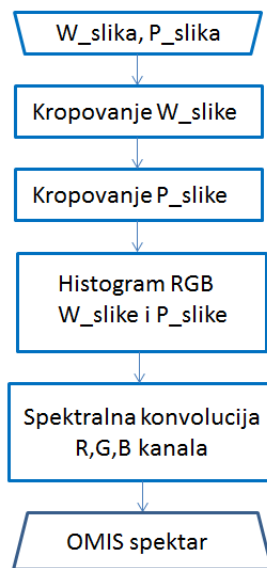
### 7.3 ALGORITAM ZA ODREĐIVANJE BIOFIZIČKOG STANJA EPITELNOG TKIVA NA BAZI SPEKTROSKOPIJE

Razvijanju algoritma za određivanje biofizičkog stanja epitelno tkiva na bazi spektroskopije prethodile su dve faze istraživanja. Prva faza je podrazumevala prikupljanje uzoraka ćelija grlića materice u klinici „Narodni Front“ tokom četiri godine na nedeljnom nivou i snimanje prikupljenih uzoraka Optomagnetnom imidžing spektroskopijom. Druga faza istraživanja koja je neposredno prethodila razvoju krajnje verzije algoritma, podrazumevala je analizu podataka dobijenih OMIS metodom i testiranje različitih metoda mašinskog učenja u programskom paketu R u cilju pronalaženja najoptimalnije metode klasifikacije. Nakon što su ove dve faze završene pristupilo se razvoju algoritma za određivanje biofizičkog stanja epitelno tkiva na bazi spektroskopije u programskom paketu MATLAB® 2013. Šema algoritma je prikazana na slici 7.44.



**Slika 7.44** Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi Optomagnetne Imidžing Spektroskopije

Prvi deo ovog algoritma uključuje učitavanje digitalnih slika uzoraka i obradu digitalnih slika uzoraka po principu patentirane metode spektralne konvolucije koja predstavlja sastavni deo metode Optomagnetne imidžing spektroskopije [80]. Izlaz iz ovog dela algoritma predstavlja OMIS spektar. Idejni deo koji se odnosi na spektralnu konvoluciju digitalne slike preuzet je iz patenta i implementiran u algoritam. Princip rada ovog dela algoritma prikazan je na slici 7.45. Algoritam je u prethodnim razvojnim verzijama omogućavao kropovanje regija različitih dimenzija i oblika, ali je u konačnu verziju integrisano kropovanje regije od interesa koja obuhvata sliku celog uzorka (“kružni krop”), s obzirom da je veoma bitno ispitati ceo uzorak, a ne samo neke njegove delove.



**Slika 7.45** Konvolucionni algoritam koji podrazumeva obradu digitalne slike uzorka obasjanog belom difuznom svetlošću pod pravim uglom ( $W\_slika$ ) i digitalne slike uzorka obasjanog belom difuznom svetlošću pod Brusterovim uglom ( $P\_slika$ ), pronalaženja histograma RGB komponenti boja svake od slika i njihovu konvoluciju, čiji je rezultat OMIS spektar

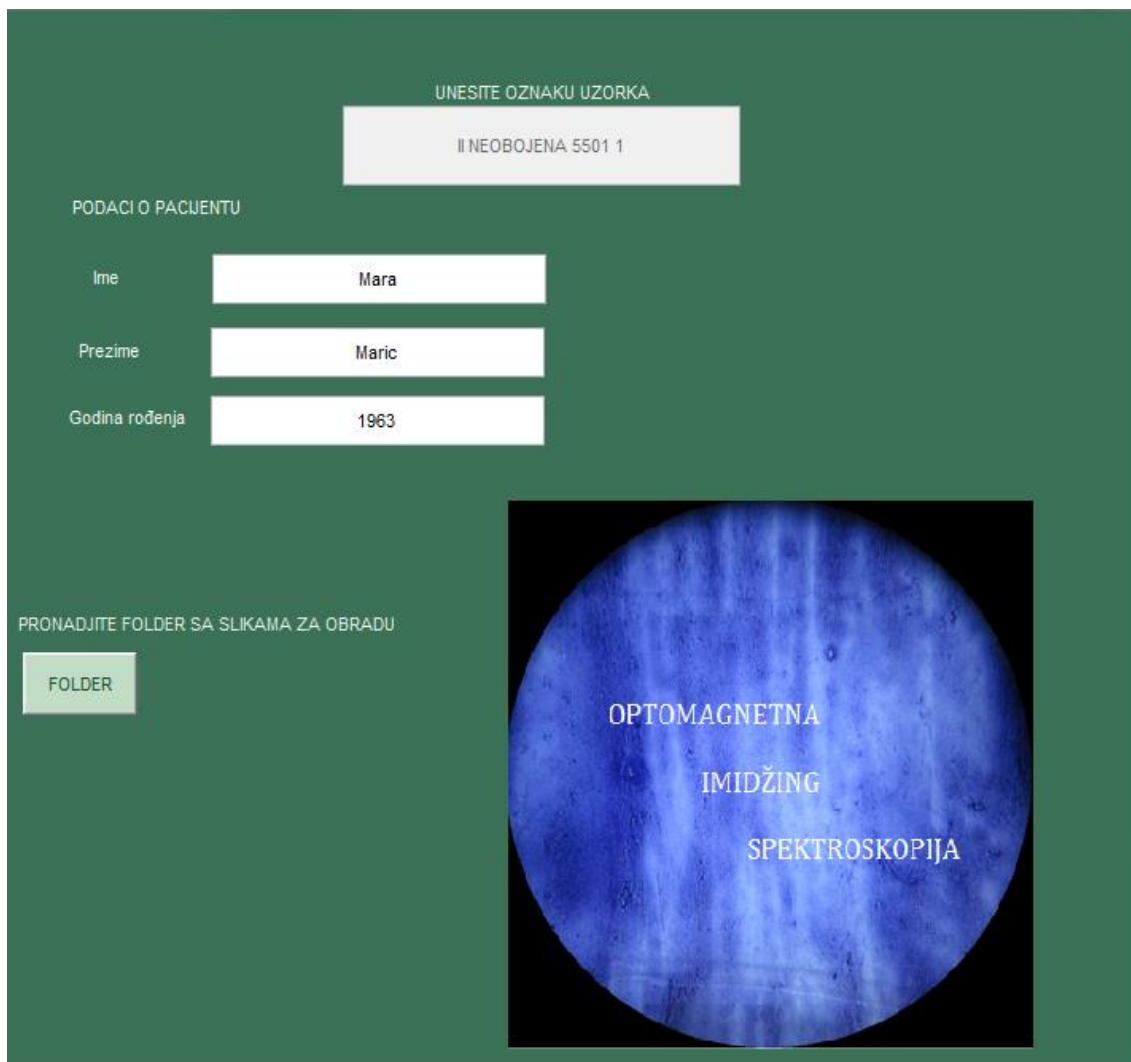
Drugi deo algoritma pronalazi parametre karakteristične za OMIS spektar uzoraka koji pripadaju različitim Papanikolau grupama. Parametri od značaja su pikovi koji se javljaju na određenim talasnim dužinama, pri čemu algoritam izdvaja glavne maksimume i minimume, zatim odgovarajuće talasne dužine na kojima se ti pikovi nalaze i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova, odnosno sumu površina ispod svih pozitivnih i sumu ispod svih negativnih pikova.

Kako je u fazi testiranja različitih klasifikacionih modela najbolju efikasnost pokazao model na bazi stabla odlučivanja, u konačnoj verziji algoritma korišćen je upravo ovaj model, pa treći deo algoritma klasifikuje uzorke metodom baziranom na stablima odlučivanja na osnovu parametara iz OMIS spektra. Algoritam obezbeđuje klasifikaciju kako bojenih tako i nebojenih uzoraka na osnovu 160 parametara OMIS spektra u kojima su sadržani intenziteti koji se javljaju na talasnim dužinama iz opsega 103.54 nm do 143.483 nm. Razvijen je i grafički

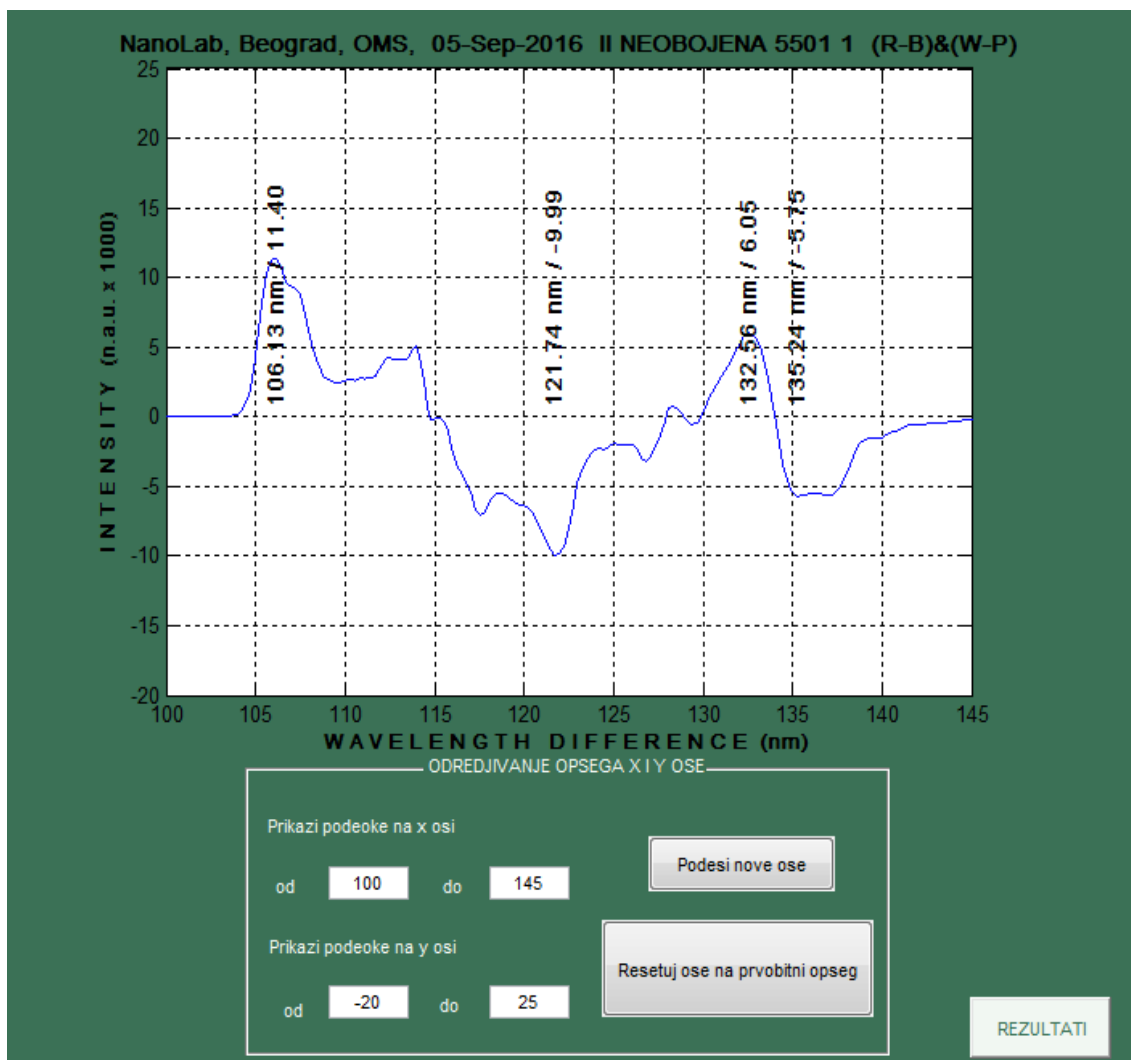


korisnički interfejs (GUI) u programskom paketu MATLAB koji omogućava korišćenje algoritma od strane lekara i tehničara u zdravstvenoj ustanovi bez neophodnog predznanja o MATLAB-u.

GUI omogućava upisivanje svih relevantnih podataka o pacijentu (slike 7.46-7.48), učitavanje digitalnih fotografija načinjenih OMIS uređajem, obradu digitalnih slika, obezbeđuje prikaz OMIS spektra svakog uzorka, karakterističnih intenziteta i talasnih dužina u spektru i njihove vrednosti, kao i prikaz rezultata. Na prvom panelu omogućen je upis podataka o pacijentu i oznake pacijenta, nakon čega se bira folder u kojem se nalaze digitalne slike uzorka dobijene Optomagnetnom spektroskopijom (slika 7.46). Na drugom panelu GUI-ja prikazuje se OMIS spektar datog uzorka i omogućava se korisniku da analizira spektar promenom opsega osa čime može da zumira određeni deo spektra od interesa (slika 7.47). Pritiskom na dugme REZULTATI otvara se treći panel na kojem se odabirom tipa uzorka (bojen/nebojen) pokreće proces aproksimacije klasifikacionog modela na obučavajućem skupu koji je sačinjen od svih do tada prikupljenih OMIS spektara, a zatim vrši predikcija modela za novi uzorak koji se razmatra. Rezultat klasifikacije i tačnost predviđanja se prikazuju u centralnom delu panela, dok su u donjem delu prikazane neke karakteristične vrednosti iz OMIS spektra (slika 7.48). Pritiskom na dugme NOVI SLUČAJ omogućeno je razmatranje novog uzorka.



*Slika 7.46 Prikaz prvog panela GUI rešenja za OMIS uređaj*



**Slika 7.47** Prikaz drugog panela GUI rešenja za OMIS uređaj na kojem korisnik može da analizira OMIS spektar podešavanjem prikazanog dela spektra



**Slika 7.48** Prikaz trećeg panela GUI rešenja za OMIS uređaj koji daje rezultat klasifikacije uzorka, tačnost predviđanja i vrednosti OMIS parametara od značaja

## 8. DISKUSIJA

U savremenim istraživanjima iz oblasti rane dijagnostike i detekcije prekursora karcinoma, evidentan problem predstavljaju performanse dijagnostičkih testova koji se koriste u skrining programima. Kako bi se poboljšala senzitivnost konvencionalnog Papanikolau testa, u poslednjih nekoliko decenija razvijeni su novi testovi kao što je citologija na tačnoj bazi i HPV DNK test. Međutim, iako su nova rešenja dovela do povećanja detekcije lezija niskog stepena, nisu dovela do poboljšane detekcije invazivnog karcinoma i značajno su povećale troškove izvođenja Papanikolau testa [90].

Nezadovoljavajuća tačnost jednog testa može se nadomestiti organizovanim redovnim pregledima, pa tako Papanikolau test još uvek predstavlja najefikasniji skrining test za detekciju karcinoma grlića materice, iako ima visok procenat lažno negativnih nalaza sa stopom od 10-30%, a po nekim autorima i do 50% [16]. Prikupljanje uzorka, proces bojenja uzorka, kao i proces pregledanja uzorka pod mikroskopom zavise od stručnosti onoga koji ih izvodi, te se neretko u radovima navodi faktor ljudske greške kao jedan od najčešćih razloga pogrešno postavljene dijagnoze. Rešenje ovog problema leži u automatizaciji dijagnostičkog procesa. Stoga se u aktuelnim studijama razvijaju automatizovana softverska rešenja za obradu digitalne slike uzorka koje na osnovu segmentacijom izdvojenog jedra i citoplazme klasifikuju uzorke u kategorije primenom različitih metoda klasifikacije kojima pripadaju i metode mašinskog učenja [91-96].

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je upravo da razvijanjem automatizovanog algoritma za određivanje stanja epitela grlića materice pomoću spektroskopije poboljša preciznost konvencionalnih metoda dijagnostike.

### ***DISKUSIJA EKSPERIMENTALNIH REZULTATA DOKTORSKE DISERTACIJE***

Optomagnetna imidžing spektroskopija testirana je prvobitno na bojenim uzorcima ćelija grlića materice, pripremljenim prema standardnom Papanikolau

protokolu. Analiza rezultatnih OMIS spektara dobijenih za bojene uzorke ćelija grlića materice ukazala je na mogućnost OMIS metode da klasifikuje uzorke po grupama koje odgovaraju klasifikaciji prema Papanikolau standardu.

Na osnovu analize OMIS spektara dobijenih za bojene Papanikolau razmaze, uočeno je da metoda Optomagnetne imidžing spektroskopije dobro razdvaja uzorke iz četiri Papanikolau grupe, pri čemu su spektri razmatranih uzoraka unutar svake grupe dosledni. Uočeno je kod bojениh uzoraka da je intenzitet maksimalnih i minimalnih pikova najveći za uzorke koji pripadaju II Papanikolau grupi, da je nešto manji kod uzoraka iz III Papanikolau grupe, još manji kod uzoraka iz IV Papanikolau grupe, dok je kod uzoraka koji pripadaju V Papanikolau grupi najmanji. Takođe, primetan je i pomeraj pikova kako se ide od II ka V Papanikolau grupi. Na osnovu rezultata dobijenih obradom bojениh i nebojениh uzoraka, zaključujemo da bi primena OMIS metode za klasifikaciju uzoraka grlića materice u cilju rane dijagnostike kancera grlića materice mogla da isključi postupak bojenja pločica koji dugo traje i utiče na postavljene dijagnoze. Primećeno je da su rezultati dobijeni primenom OMIS-a na bojene pločice zavisni od metode bojenja, odn. neadekvatnog bojenja. Prebojenost uzorka koja se neretko javlja kao posledica neadekvatne pripreme uzorka, dovodi do različitog OMIS odziva u odnosu na uzorke koji su pravilno obojeni. Neadekvatno bojenje uzoraka i u konvencionalnim dijagnostičkim metodama predstavlja problem, pa se takvi uzorci odbacuju, a proces uzimanja uzorka i bojenja se ponavlja.

Iz OMIS spektara (slike 7.1-7.14) vidi se da nebojени uzorci daju uniformniji odziv u odnosu na bojene uzorke ćelija grlića materice po grupama, što još više govori u prilog prednosti razmatranja nebojениh uzoraka Optomagnetnom imidžing spektroskopijom.

Nakon što su dobijeni spektri za bojene i nebojene uzorke Optomagnetnom spektroskopijom tako što je razmatran deo digitalne slike uzorka veličine 1000 pix x 1000 pix kropovan iz centra slike, pristupilo se analizi cele digitalne slike uzorka načinjene OMIS uređajem. Rezultati analize slike cele površine uzorka pratili su trend prethodno dobijenih rezultata, te se shodno razlozima opravdanosti

korišćenja ovog kropa u daljem istraživanju pristupilo razmatranju isključivo „kružnog kropa“. Sa dijagrama prikazanog na slici 7.20, jasno se vidi razlika koju OMIS i u ovom slučaju pravi između nebojenih uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi i uzoraka koji pripadaju V Papanikolau grupi. S obzirom da II Papanikolau grupa odgovara normalnom nalazu, a III Papanikolau grupa može označavati kako atipične ćelije neodređenog značaja tako i skvamozne intraepitelne lezije lakog ili srednjeg stepena, očekivano je da OMIS spektri uzoraka iz II i III Papanikolau grupe budu slični. Nasuprot tome, razlika koja se uočava između OMIS spektara nebojenih uzoraka iz II i III Papanikolau grupe sa jedne strane i nebojenih uzoraka iz V Papanikolau grupe koja označava invazivni karcinom, svakako je prisutna kao neophodna i upravo na njoj se bazira opravdanost korišćenja Optomagnetne imidžing spektroskopije u karakterizaciji uzoraka ćelija grlića materice. IV Papanikolau grupa koja označava skvamoznu intraepitelnu leziju teškog stepena bliža je V Papanikolau grupi u odnosu na II i III Papanikolau grupu, kao što pokazuju i OMIS dijagrami dobijeni za nebojene uzorke iz svih grupa prikazani na slici 7.21. Isto važi i za bojene uzorke, s tim što u slučaju bojjenih uzoraka mora da se uzme u obzir uticaj boje, ali i pored toga OMIS razdvaja slučaj invazivnog karcinoma kao posebne kategorije (slike 7.23 i 7.24).

Optomagnetna imidžing spektroskopija predstavlja novu metodu za ispitivanje epitela grlića materice. Eksperimentalni rezultati dobijeni korišćenjem OMIS metode koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na njen potencijal i mogućnost njenog korišćenja u dijagnostici karcinoma grlića materice.

## ***DISKUSIJA REZULTATA KLASIFIKACIJE***

Dosadašnja istraživanja u oblasti rane dijagnostike bavila su se usavršavanjem postojećih dijagnostičkih metoda, ali i razvojem novih pristupa ovoj problematici. Iz potrebe za automatizacijom dijagnostičkog postupka nastala su rešenja koja se baziraju na digitalnoj obradi mikroskopskih slika uzoraka grlića materice pripremljenih prema Papanikolau proceduri koja bi zamenila manuelno pregledanje. Ova rešenja se uglavnom baziraju na segmentaciji slike uzorka koja

podrazumeva primenu tehnika digitalne obrade slike kao što su: detekcija ivica, postavljanje praga i različite morfološke operacije. Segmentacija slike omogućava izdvajanje objekata od interesa, kao što su jedro i citoplazma, te se na osnovu obeležja ovih parametara (intenzitet, oblik i veličina jedra, odnos jedro/citoplazma) uzorci klasifikuju pomoću neuronskih mreža, metode potpornih vektora i drugih metoda mašinskog učenja [96].

Ova doktorska disertacija predlaže korišćenje Optomagnetne imidžing spektroskopije za ispitivanje uzoraka grlića materice i automatizovanog algoritma za detekciju stanja epitelnog tkiva grlića materice koji na osnovu spektra uzorka klasifikuje uzorak u odgovarajuću klasu zdravo/bolesno. Koriste se uzorci bojani po Papanikolau proceduri, ali i nebojeni uzorci ćelija grlića materice.

Testirana su ukupno 4 različita modela klasifikacije, korišćenjem: Naive Bayes klasifikatora, Stabla odlučivanja, Random Forest i SVM. Algoritam za testiranje svih navedenih klasifikatora razvijen je u R paketu. Efikasnost klasifikatora procenjena je na osnovu Senzitivnosti, Specifičnosti i ROC krive odnosno površine ispod ROC krive (AUC). U testiranju korišćeno je ukupno 1632 bojena uzorka i 336 nebojenih uzoraka. Navedena četiri tipa klasifikacionih modela korišćena su u binarnoj klasifikaciji i klasifikaciji u četiri klase. U odnosu na OMIS parametre koji su korišćeni kao atributi u klasifikaciji, razmatrana su dva tipa klasifikacije sa različitim atributima: u prvom korišćeno je 6 atributa za svaku observaciju: intenzitet glavnog maksimuma i minimuma (I+,I-), talasne dužine na kojima se glavni maksimum i minimum nalaze (WD+, WD-) i površine ispod pozitivnih i negativnih pikova (P+,P-) iz OMIS spektra, dok je u drugom odabrano 160 intenziteta iz OMIS spektra na talasnim dužinama u opsegu od 103.54 nm do 143.483 nm koji su korišćeni kao atributi u klasifikaciji. Dati opseg je odabran s obzirom da se u njemu javljaju promene u spektru koje su karakteristične za određene Papanikolau grupe, odnosno za određena stanja tkiva. U odnosu na granicu između zdravih i bolesnih uzoraka, urađena su dva tipa binarne klasifikacije. Prvi tip binarnog klasifikatora je uzorke klasifikovao u 2 grupe: zdravo/bolesno, pri čemu je granica između zdravog i bolesnog postavljena na



LSIL, odnosno nalazi uzoraka LSIL+ smatrali su se pozitivnim. Drugi tip binarne klasifikacije podrazumevao je klasifikaciju u grupe: (II PA i III PA) i (IV PA i V PA).

### ***Binarna klasifikacija***

#### ***Algoritam za binarnu klasifikaciju uzoraka sa 6 razmatranih atributa pri čemu je granica između klasa postavljena na LSIL***

Kada je granica između zdravih i abnormalnih uzoraka postavljena na LSIL, pored toga što sveukupno binarni klasifikatori imaju veću senzitivnost za bojene uzorke kada se koristi šest atributa, najveći procenat senzitivnosti pokazuje algoritam koji koristi metodu potpornih vektora (70.83%), dok je u slučaju nebojenih uzoraka senzitivnost nešto niža, a najveća u slučaju klasifikatora na bazi stabla odlučivanja (37.5%). SVM daje najniži procenat senzitivnosti za klasifikaciju nebojenih uzoraka, dok je to Naive Bayes u slučaju bojenih uzoraka (slika 7.24). Veći procenti specifičnosti (slika 7.25) su prisutni kod klasifikacije nebojenih uzoraka, sa akcentom na Random Forest (RF) i Naive Bayes (NB) i kreću se oko 90%, dok su kod bojenih uzoraka oni nešto niži (39-66%). Na osnovu vrednosti površine ispod ROC krive (AUC) koja se koristi kao mera efikasnosti (slike 7.27 i 7.28), zaključujemo da se za klasifikaciju bojenih uzoraka od ponuđenih metoda najbolje pokazala metoda potpornih vektora (AUC=0.6004), dok je u slučaju nebojenih uzoraka najbolje rešenje Random Forest (AUC=0.6675). Površine ispod ROC krivih proračunate za četiri klasifikatora u slučaju bojenih i nebojenih uzoraka nisu veće od 0.70 što ukazuje na ne tako visoku sposobnost ovih klasifikatora da tačno klasifikuju uzorke u slučaju odabranog skupa podataka koji obuhvata 1632 observacije bojenih, odnosno 336 observacija nebojenih uzoraka sa 6 zadatih atributa po observaciji, ako se uzme da je vrednost AUC=0.5 ravna slučajnom predviđanju.

#### ***Algoritam za binarnu klasifikaciju uzoraka sa 6 razmatranih atributa pri čemu je granica između klasa postavljena na IV Papanikolau grupu***

U slučaju kada je granica između klasa postavljena na IV Papanikolau grupu, na osnovu prikazanih rezultata na slikama 7.29 i 7.30, zaključujemo da je Random

Forest model pokazao najveću senzitivnost za bojene uzorke (37.14%) koja je značajno manja od senzitivnosti koja je dobijena za modele na bazi stabla odlučivanja koja je iznosila 66.67% u slučaju nebojenih uzoraka. Na osnovu ROC krivih prikazanih na slikama 7.32 i 7.33 i vrednosti AUC, možemo zaključiti da je za klasifikaciju skupa razmatranih podataka koji je obuhvatao 1632 observacije bojениh uzoraka i 336 observacija nebojenih uzoraka, sa šest OMIS parametara tj. atributa po svakoj observaciji u dve klase (II i III PA / IV i V PA) najbolje rešenje daje algoritam baziran na Random Forest metodi i u slučaju bojениh i u slučaju nebojenih uzoraka.

***Algoritam za binarnu klasifikaciju uzoraka sa 160 razmatranih atributa pri čemu je granica između klasa postavljena na LSIL***

Algoritam za klasifikacija bojениh i nebojenih uzoraka pokazao je značajne razlike u efikasnosti četiri testirana klasifikatora kada je skup atributa obuhvatao 160 parametara OMIS spektra, a granica između klasa postavljena na LSIL (Slike 7.34-7.36). U slučaju praga LSIL najbolje performanse pokazao je model Random Forest kod bojениh uzoraka, sa senzitivnošću od 79.17% i specifičnošću od 27.61%, iako je procenat specifičnosti prilično nizak. Kod nebojenih uzoraka Random Forest je takođe najefikasniji klasifikator od četiri testirana, iako senzitivnost od 37.5% nije zadovoljavajuća, specifičnost od 83.33% predstavlja sasvim dobar rezultat. Na osnovu ROC krive i vrednosti AUC (slike 7.37 i 7.38) potvrđuje se tvrdnja da je od četiri testirana klasifikatora najefikasniji algoritam kako u slučaju bojениh tako i u slučaju nebojenih uzoraka pri razmatanju 160 atributa baziran na stablima odlučivanja. Međutim, važno je naglasiti da sveukupna efikasnost bilo kojeg od klasifikatora u klasifikaciji bojениh uzoraka nije na zavidnom nivou i da najverovatnije izbor ovih 160 parametara nije najbolji u slučaju bojениh uzoraka, jer su vrednosti AUC bliske vrednosti od 0.5. Nešto bolji slučaj je kod nebojenih uzoraka gde se vrednosti AUC nalaze u opsegu od 0.6 do 0.7 i gde najveća vrednost AUC pripada modelu baziranom na Random Forest.

***Algoritam za binarnu klasifikaciju uzoraka sa 160 razmatranih atributa pri čemu je granica između klasa postavljena na IV Papanikolau grupu***

Algoritam za klasifikaciju baziran na Naive Bayes postigao je senzitivnost od 57.14% i specifičnost od 76.98% u klasifikaciji bojenih uzoraka i tako dao je najbolje rezultate kod bojenih kao i nebojenih uzoraka gde je postignuta senzitivnost od 100% i specifičnost od 93.94%. Odmah iza Naive Bayes klasifikatora u slučaju nebojenih uzoraka nalazi se po efikasnosti model Random Forest sa senzitivnošću od 83.33% i specifičnošću od 100%. Međutim, na osnovu ROC krive i vrednosti AUC kod bojenih uzoraka i praga HSIL, možemo zaključiti da jedino ima smisla koristiti Naive Bayes klasifikator, dok preostali klasifikatori ne pružaju dobro razdvajanje bojenih uzoraka (slike 7.42). Potpuno je drugačija situacija kod nebojenih uzoraka gde vrednosti AUC za sva četiri klasifikatora imaju vrednosti veće od 0.7, a među kojima prednjači Naive Bayes klasifikator sa AUC=0.9667, a odmah zatim i Random Forest sa AUC=0.9167 (slika 7.43).

Rezultati klasifikacionih algoritama ukazuju na veću efikasnost modela klasifikacije u slučaju nebojenih uzoraka u odnosu na bojene. Jedini slučaj gde se na skupu bojenih uzoraka postiže bolja senzitivnost klasifikatora (do 70.85% sa SVM) je slučaj kada se razmatra šest atributa/prediktora i granica između zdravog i bolesnog tkiva se postavlja na LSIL. Međutim, u tom slučaju specifičnost je značajno niža (maksimalno 49.25% sa SVM). U svim ostalim klasifikacijama nebojeni uzorci pokazali su bolje razdvajanje i to uglavnom korišćenjem modela na bazi stabla odlučivanja (Random Forest), dok je kod razmatranja 160 prediktora i Naive Bayes klasifikator postigao odlične rezultate. S druge strane, ROC krive, AUC vrednosti i najviši postignuti procenti senzitivnosti i specifičnosti ukazuju da je, posebno kod nebojenih uzoraka, najbolje rezultate klasifikacije dao slučaj kada su uzorci klasifikovani u dve klase, pri čemu su jednu klasu činili uzorci iz II i III Papanikolau grupe, a drugu uzorci iz IV i V Papanikolau grupe, čime je obezbeđeno detektovanje kancera in situ i invazivnog kancera. Random Forest je u tom slučaju za nebojene uzorke sa 6 prediktora dao senzitivnost od 66.67% i specifičnost od 100%, dok je AUC=0.833, a u slučaju nebojenih uzoraka i 160 prediktora senzitivnost od 83.33%, specifičnost 100% i AUC=0.9848.

### ***Klasifikacija u četiri klase: II, III, IV i V Papanikolau grupe***

Na osnovu rezultata prikazanih u tabelama 7.5-7.14, zaključuje se da je najbolji izbor za klasifikaciju u četiri grupe model baziran na stablima odlučivanja, konkretno Random Forest, koji u slučaju bojenih i nebojenih uzoraka postiže zadovoljavajuće procenete interklasne senzitivnosti (II PA: 49.25%, III PA: 58.97%, IV PA: 50%, V PA: 44.44%) i specifičnosti (II PA: 65.26%, III PA: 54.76%, IV PA: 98.70%, V PA: 98.69%) i  $\kappa=0.2$  za bojene uzorke i senzitivnosti (II PA:100%, III PA:20%, IV PA:33.33%, V PA:33.33%) i specifičnosti (II PA:25%, III PA:100%, IV PA:100%, V PA:100%) i  $\kappa=0.4$  za nebojene uzorke.

Testirani su navedeni klasifikatori i na skupovima podataka od 1632 x 160 bojenih uzoraka i 336 x 160 nebojenih uzoraka, gde je razmatrano 160 intenziteta na opsegu talasnih dužina od 103.54 nm do 143.483 nm, međutim odabrani klasifikatori nisu dali zadovoljavajuće rezultate na ovim skupovima podataka, pa s toga nisu razmatrani za aplikaciju u algoritmu za detekciju stanja epitelnog tkiva.

Metodom slučajnih šuma, PCA metodom i analizom varijanse podataka, ustanovljeno je da najveći doprinos tačnoj klasifikaciji uzoraka daje parametar OMIS spektra koji predstavlja sumu svih površina ispod negativnih pikova u spektru, ali zbog malog broja uzoraka u okviru IV i V Papanikolau grupe nije još uvek moguće pouzdano odrediti vrednost ove promenljive koja bi mogla razdvajati uzorke sa velikim procentom tačnosti.

### ***Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije***

Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije razvijen je na osnovu svih dobijenih rezultata istraživanja prikazanih u prethodnim poglavljima.

Prvobitno su ispitivani uzorci ćelija grlića materice bojeni po standardnoj Papanikolau metodi koji se kao takvi koriste u dijagnostici karcinoma grlića

materice u klinikama. Uzorci su prikupljeni, podvrgnuti ispitivanju Optomagnetnom imidžing spektroskopijom i na skupu od 258 uzoraka (70 uzoraka iz II Papanikolau grupe, 68 uzoraka iz III Papanikolau grupe, 56 uzoraka iz IV Papanikolau grupe i 64 uzoraka iz V Papanikolau grupe) izvršena je analiza OMIS spektara uzoraka. Na osnovu rezultata analize, pri čemu su glavni parametri na osnovu kojih su uzorci razvrstani po Papanikolau grupama bili maksimalni i minimalni pikovi i razlike talasnih dužina na kojima su se pikovi javljali, utvrđeno je da se Optomagnetnom spektroskopijom mogu detektovati različita stanja epitelnog tkiva grlića materice. Istom analizom utvrđeno je i da se određena greška u snimanja OMIS metodom unosi neadekvatnim bojenjem uzorka, te se pristupilo ispitivanju nebojenih uzoraka. Na skupu od 454 nebojena uzorka u daljem toku istraživanja pokazano je da OMIS podjednako dobro razdvaja nebojene uzorke i da je prednost ispitivanja nebojenih uzoraka grlića materice u tome što se skraćuje vreme, kao i trošak testiranja. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije omogućava razmatranje kako bojenih tako i nebojenih uzoraka, ali se u perspektivi očekuje da će se koristiti isključivo nebojeni uzorci.

Odluka o regiji digitalne slike uzorka koja se razmatra takođe je predstavljala ishod različitih faza istraživanja. Naime, u prvoj fazi istraživanja algoritam koji na osnovu informacije o boji u slici sprovodi spektralnu konvoluciju slika uzorka i proizvodi OMIS spektar, primenjivan je na delove slika uzoraka koji su kropovani iz centra originalne slike veličine 1000 pix x 1000 pix. Ideja je bila da se nađe OMIS spektar uzorka na mestu na pločici na kojem se nalazi najviše ćelija, a to je centralni deo mikroskopske pločice. Međutim, kako se na bilo kom mestu na pločici sa razmazom ćelija grlića materice može naći abnormalna ćelija koju treba detektovati, u narednoj fazi istraživanja pristupilo se razmatranju čitave površine uzorka i takozvani "kružni krop" odabran je kao konačno rešenje koje se koristi u algoritmu za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije. Ovo rešenje je idealno za ispitivanje uzoraka grlića materice koji su pripremljeni na osnovu LBC procedure, gde se ćelije grlića materice nanose na mikroskopsku pločicu upravo na centralni deo pločice kružnog oblika.

Konačno, testiranje različitih algoritama mašinskog učenja u klasifikaciji uzoraka ukazalo je na stabla odlučivanja kao najefikasniji model u razvrstavanju uzoraka na osnovu njihovih OMIS spektara. Klasifikacija u četiri klase koje su određene Papanikolau grupama, dala je nešto lošije rezultate u odnosu na binarnu klasifikaciju, dok je najbolje razdvajanje uzoraka postignuto u dve klase: klasa I koju čine uzorci iz II i III Papanikolau grupe i klasa II koju čine uzorci iz IV i V Papanikolau grupe. Stoga je odabrano da algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva koristi model baziran na stablima odlučivanja i da vrši klasifikaciju uzoraka u dve navedene grupe koje razdvajaju slučajeve karcinoma *in situ* i invazivnog karcinoma od ostalih stanja tkiva.

### **PRAVCI DALJEG ISTRAŽIVANJA**

Istraživanje u okviru doktorske disertacije obuhvatilo je razmatranje 2126 uzoraka prikupljenih od 851 pacijenata, ali to i dalje nije bio zadovoljavajući broj uzoraka za rešavanje problema klasifikacije, s obzirom na to da je najveći broj uzoraka pripadao II i III (ukupno 1910 uzoraka iz II i III grupe) Papanikolau grupi, dok su neuporedivo manje bili zastupljeni uzorci iz IV i V (ukupno 216 uzoraka iz IV i V grupe) grupe koji predstavljaju karcinom *in situ* (IV) i invazivni karcinom (V). Takođe, značajno manje nebojenih uzoraka (ukupno 454 nebojenih uzoraka), posebno iz IV (14 uzoraka) i V (16 uzoraka) Papanikolau grupe bilo je prikupljeno u odnosu na bojene uzorke. Dalje istraživanje bi trebalo da uključi veći broj uzoraka, posebno uzorke koji pripadaju IV i V Papanikolau grupi i da ispita nove metode za odabir atributa relevantnih za klasifikaciju (feature extraction). U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazan značaj površine ispod negativnih pikova kao atributa koji doprinosi efikasnijoj klasifikaciji, međutim potreban je značajno veći broj uzoraka kancera da bi se ova tvrdnja statistički potvrdila. Takođe, trebalo bi dodatno testirati modele korišćene u ovoj doktorskoj disertaciji i modele koje nisu obuhvaćene ovim radom (na primer logistička regresija, neuronske mreže, fazi logika i druge), te na statistički značajnom obučavajućem skupu i test skupu, koji će obuhvatiti dovoljan broj uzoraka iz svih Papanikolau grupa, potvrditi

najefikasniju metodu klasifikacije. Na većem skupu uzoraka, biće moguće odstraniti uzorke koji značajno odskakuju od ostalih (outliers), što u ovom slučaju nije bilo moguće usled veoma malog broja uzoraka iz IV i V Papanikolau grupe. Sa podjednakom zastupljenošću uzoraka iz sve četiri Papanikolau grupe, biće moguće sa većom tačnošću klasifikovati uzorke u veći broj grupa, te bi trebalo testirati i različite multiklasne modele klasifikacije, čime bi se omogućilo razdvajanje normalnih uzoraka od uzoraka sa različitim stepenom prisutne abnormalnosti i na kraju od uzoraka kancera.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji pristupilo se izradi novije, savremenije i isplativije verzije uređaja Optomagnetne imidžing spektroskopije za primenu u ranoj dijagnostici karcinoma grlića materice. Novo rešenje upravo će objediniti OMIS uređaj sa algoritmom baziranim na algoritmu razvijenom u ovoj disertaciji i na taj način omogućiti automatizovanu pomoćnu metodu za ranu detekciju karcinoma grlića materice. Novi OMIS uređaj je u fazi razvoja i planira se njegovo plasiranje na tržište zemalja gde bi takav jedan automatizovan skrining test baziran na OMIS metodi, koji ne zahteva posebnu infrastrukturu, kao pomoćna metoda mogao da pruži informaciju o tome da li pacijenta treba uputiti na pregled konvencionalnim metodama. Do sada izvršeno je testiranje prototipa novog uređaja u Indiji na oko 2000 uzoraka i planira se prikupljanje dodatnih uzoraka kako bi se sprovela klinička studija koja bi potvrdila efikasnost metode. Istraživanja bi trebalo da obuhvate i ispitivanja LBC uzoraka. S obzirom da se LBC tehnikom postiže bolja priprema uzorka, očekuju se i bolji rezultati klasifikacije.

## 9. ZAKLJUČAK

Osnovna hipoteza od koje se pošlo u radu je činjenica da su postojeće metode za dijagnostiku stanja cervikalnog epitelnog tkiva subjektivne, odnosno zavise od stručnosti lica koje ih izvodi, vremenski su zahtevne i skupe. Naročito je važno uočiti da i pored velikog značaja konvencionalnih metoda u smanjenju broja obolelih od ove bolesti i dalje postoji problem lažno negativnih nalaza u dijagnostici. Papanikolau test koji i dalje predstavlja najefikasniji skrining test za dijagnostiku karcinoma grlića materice ima visok procenat lažno negativnih nalaza sa stopom od 10-30%, a po nekim autorima i do 50% [16]. S druge strane, testiranje na HPV ima veću senzitivnost od Papanikolau testa, ali implementacija ove dijagnostičke metode u vidu primarnog skrining testa još dugo neće biti moguća u slabo razvijenim zemljama odakle potiče čak 80% slučajeva karcinoma grlića materice u svetu.

Korišćenjem fenomena interakcije svetlosti i materije, odnosno tkiva, dobijamo informaciju o karakteristikama tkiva na osnovu kojih možemo izvršiti karakterizaciju uzoraka po grupama koje obuhvataju zdravo i grupama koje obuhvataju bolesno tkivo odnosno kancer. Obećavajući rezultati postignuti su u studijama koje su ispitivale mogućnost primene različitih spektroskopskih metoda u dijagnostičke svrhe, međutim i dalje nijedna takva metoda nije uvedena u kliničku praksu [47-49]. Realizacija automatizovanog algoritma za dijagnostiku stanja cervikalnog epitelnog tkiva na bazi Optomagnetne imidžing spektroskopije stvorila bi uslove za prevazilaženje problema subjektivnosti postojećih metoda, dok bi inovacija u vidu eliminisanja procesa bojenja uzoraka koji je sastavni deo Papanikolau metode za dijagnostiku karcinoma grlića materice, dovela do znatne uštede u vremenu i materijalnim sredstvima koji su neophodni za izvođenje jednog takvog dijagnostičkog testa.

Saglasno uočenim problemima i postavljenim ciljevima istraživanja (Poglavlje 3), prikupljeno je i ispitano 2126 (1672 bojenih i 454 nebojenih) uzoraka ćelija grlića materice metodom Optomagnetne imidžing spektroskopije čime su ostvareni



obećavajući rezultati koji ukazuju na potencijal ove metode kao pomoćne metode u dijagnostici karcinoma grlića materice. Razmotreni su bojeni uzorci koji se koriste u konvencionalnim dijagnostičkim metodama, ali i nebojeni uzorci i utvrđene su prednosti ispitivanja jednih u odnosu na druge. Utvrđeno je da neadekvatno bojenje može uneti grešku u merenja, dok je kod nebojenih uzoraka ovakav faktor greške isključen.

Testirani su različiti modeli za klasifikaciju bojenih i nebojenih uzoraka ćelija grlića materice na osnovu njihovih OMIS spektara: Naive Bayes, Random Forest, Decision Trees i Support Vector Machine. Pokazano je da model na bazi stabla odlučivanja daje najbolje rezultate pri klasifikaciji nebojenih uzoraka u dve klase pri čemu je granica između dve klase postavljena na IV Papanikolau grupu, a 160 vrednosti intenziteta iz Optomagnetonog spektra je korišćeno za predikciju. Nebojeni uzorci su generalno bolje klasifikovani po grupama u odnosu na bojene uzorke. Rezultati klasifikacije nebojenih uzoraka (ukupno 454) na osnovu 160 parametara iz OMIS spektra korišćenjem modela klasifikacije na bazi stabla odlučivanja ukazuju na prednost korišćenja nebojenih uzoraka u odnosu na bojene uzorke. Dok su vrednosti AUC, koje se koriste u oceni efikasnosti određenog klasifikatora, za sve modele klasifikacije bojenih uzoraka nešto iznad 0,5 osim za Naive Bayes (AUC=0,67), potpuno je drugačija situacija kod nebojenih uzoraka gde vrednosti AUC za sva četiri klasifikatora imaju vrednosti veće od 0,7, a među kojima prednjači Naive Bayes klasifikator sa AUC=0,9667, a odmah zatim i Random Forest sa AUC=0,9167. Senzitivnost, specifičnost i tačnost klasifikacije nebojenih uzoraka ćelija grlića materice veći su od senzitivnosti, specifičnosti i tačnosti klasifikacije bojenih uzoraka u slučaju kada se razmatra 160 atributa i granica između dve klase je postavljena na IV Papanikolau grupu. Kod nebojenih uzoraka postignuta je senzitivnost od 100% za Naive Bayes, 50% za stabla odlučivanja, 83.33% za Random Forest i 66.67% za SVM, dok je kod bojenih uzoraka za iste modele senzitivnost bila 57.14%, 2.86%, 5.71% i 2.86%, respektivno. Za nebojene uzorke postignuta je specifičnost od 93.94% za Naive Bayes, 93.94% za stabla odlučivanja, 100% za Random Forest i 95.45% za SVM, dok je kod bojenih specifičnost za navedene modele iznosila 76.98%, 97.94%, 99.31% i 99.31%, respektivno.

U odnosu na dosadašnja istraživanja u kojima se primenjivala digitalna obrada određenog dela slike uzorka, uvedena je obrada cele površine snimka („kružno kropovanje“). Razlika u postignutoj tačnosti u klasifikovanju uzoraka između dve različite regije razmatranja je 1% i to kod nebojenih uzoraka korišćenjem algoritma na bazi stabla odlučivanja i kod bojenih uzoraka korišćenjem Naive Bayes algoritma, što potvrđuje opravdanost primene kružnog krova, dok se prednost korišćenja „kružnog kropovanja“ ogleda u analizi većeg broja prikupljenih ćelija, te manjoj mogućnosti da se abnormalna ćelija ne detektuje.

Ispitan je značaj različitih parametara iz OMIS spektra u razdvajanju zdravih uzoraka od abnormalnih uzoraka i kancera. Od šest ispitanih parametara: glavni maksimum, glavni minimum, talasna dužina na kojoj se javlja glavni maksimum, talasna dužina na kojoj se javlja glavni minimum, površina ispod pozitivnih pikova i površina ispod negativnih pikova, korišćenjem različitih metoda mašinskog učenja (PCA, Random Forest) pokazano je da površina ispod negativnih pikova u Optomagnetnom spektru uzorka najbolje vrši razdvajanje između klasa zdravih i abnormalnih uzoraka. Takođe, utvrđeno je da je opseg razlike talasnih dužina od 103.54 nm do 143.483 nm iz OMIS spektra posebno značajan za razdvajanje zdravih od abnormalnih uzoraka.

Od 4 testirana algoritma u kojima su korišćena četiri različita modela binarne klasifikacije (Naive Bayes, Random Forest, Decision Trees i Support Vector Machine) došlo se do saznanja da algoritam koji koristi model na bazi stabla odlučivanja sa najvećom tačnošću razvrstava uzorke kancera od ostalih stanja tkiva. Ovim algoritmom je pokazano da se OMIS metodom može dobiti SE 83.33%, SP 100% i AC 98.48% za nebojene uzorke pri razdvajanju uzoraka koji pripadaju IV i V Papanikolau grupi (karcinom) od uzoraka koji pripadaju II i III Papanikolau grupi (uzorci koji ne sadrže abnormalnosti i skvamozne intraepitelne lezije nižeg i visokog stepena). Algoritam koji koristi Naive Bayes model za klasifikaciju nebojenih uzoraka pri razmatranju 160 atributa u navedene dve klase postigao je SE=100%, SP=93.94% i AC=93.94%. Klasifikacija bojenih uzoraka sa 6 atributa u dve klase (II i III / IV i V) dala je najbolje rezultate korišćenjem algoritma na bazi stabla odlučivanja, tačnije Random Forest model gde je ROC kriva dala AUC=0.68,

ali i prilično nizak procenat senzitivnosti od 37.14% i specifičnost od 98.97%. Pri razmatranju 160 atributa za bojene uzorke, najefikasniji model bio je Naive Bayes model klasifikacije (SE 57.14%, SP 76.98%, AC 74.85%).

Razvijen je algoritam za detekciju biofizičkog stanja epitela grlića materice koji na osnovu parametara iz Optomagnetnog spektra vrši klasifikaciju datog uzorka u jednu od klasa: (II i III Papanikolau grupa) ili (IV i V Papanikolau grupa). Algoritam podrazumeva učitavanje digitalne slike uzorka, spektralnu konvoluciju, formiranje Optomagnetnog spektra uzorka i klasifikaciju datog uzorka u jednu od zadatih klasa na osnovu 160 intenziteta iz opsega razlike talasnih dužina od 103.54 nm do 143.483 nm. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitela i grafički korisnički interfejs koji je razvijen za potrebe korišćenja u kliničkoj praksi realizovani su u programskom paketu MATLAB® 2013.

Ostvareni naučni doprinosi doktorske disertacije:

1. Primenjena je nova metodologija ispitivanja ćelija epitelnog tkiva koja se zasniva na ispitivanju uzoraka Optomagnetnom imidžing spektroskopijom i digitalnoj obradi slike korišćenjem algoritma spektralne konvolucije.
2. Eksperimentalnom analizom utvrđen je uticaj bojenja uzoraka na detekciju različitih stanja epitela Optomagnetnom Imidžing Spektroskopijom.
3. Statističkim proračunima pokazano je da se u oblasti primene Optomagnetne imidžing spektroskopije u dijagnostici karcinoma grlića materice mogu koristiti i nebojeni uzorci, pored bojenih uzoraka i utvrđena je prednost korišćenja nebojenih uzoraka.
4. U odnosu na dosadašnja istraživanja u kojima se primenjivala digitalna obrada određenog dela slike uzorka, uveden je nov pristup obradi slike uzorka koji podrazumeva obradu cele površine snimka („kružno kropovanje“).
5. Primenom metoda nadgledanog učenja izvršena je klasifikacija uzoraka na osnovu njihovih optomagnetnih spektara i potvrđena je polazna pretpostavka da

se metoda Optomagnetna imidžing spektroskopija može primeniti za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva, u ovom slučaju epitelnog tkiva grlića materice.

6. Razvijen je algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitela grlića materice koji na osnovu parametara iz Optomagnetnog spektra razdvaja slučajeve karcinoma *in situ* i invazivnog karcinoma od ostalih stanja tkiva. Algoritam za određivanje biofizičkog stanja epitelnog tkiva na bazi spektroskopije predstavlja nov pristup u oblasti dijagnostike kancera i predlaže korišćenje Optomagnetne imidžing spektroskopije kao nove metodologije za ispitivanje tkiva u cilju detekcije malignih stanja epitela i metode mašinskog učenja za klasifikaciju uzoraka. Implementacija ovakvog sistema u zdravstveni sistem zemalja sa visokim procentom obolelih od karcinoma grlića materice ne zahteva posebnu infrastrukturu i mogla bi značajno da smanji troškove i vreme ispitivanja.

7. Razvijen je grafički korisnički interfejs koji omogućava da metodu Optomagnetne imidžing spektroskopije u dijagnostici karcinoma grlića materice koristi medicinsko osoblje bez potrebe za zahtevnom obukom, dodatno olakšavajući na taj način implementaciju metode u zdravstveni sistem.

8. Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenog za potrebe projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja iz kojeg je proizašla ova doktorska disertacija, pokrenut je razvoj savremenog, unapređenog i efikasnog uređaja za Optomagnetnu imidžing spektroskopiju koji će u sebi sadržati implementiran algoritam za detekciju stanja epitelnog tkiva baziran na rezultatima ove doktorske disertacije, sa mogućnošću prikazivanja rezultata klasifikacije bojenih i nebojenih uzorka ćelija grlića materice. Ovaj uređaj je trenutno u fazi testiranja, nakon čega sledi sprovođenje kliničke studije koja bi omogućila proizvodnju i plasiranje uređaja na tržište.

## LITERATURA

1. Sarwar, A., V. Sharma, and R. Gupta, *Hybrid ensemble learning technique for screening of cervical cancer using Papanicolaou smear image analysis*. Personalized Medicine Universe, 2015. **4**: p. 54-62.
2. Bengtsson, E. and P. Malm, *Screening for cervical cancer using automated analysis of PAP-smears*. Computational and mathematical methods in medicine, 2014. **2014**.
3. Jusman, Y., S.C. Ng, and N.A. Abu Osman, *Intelligent screening systems for cervical cancer*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**.
4. Park, S.Y., et al., *Automated image analysis of digital colposcopy for the detection of cervical neoplasia*. Journal of biomedical optics, 2008. **13**(1): p. 014029-014029-10.
5. Mat-Isa, N.A., M.Y. Mashor, and N.H. Othman, *An automated cervical pre-cancerous diagnostic system*. Artificial Intelligence in Medicine, 2008. **42**(1): p. 1-11.
6. *Skrining Srbija*. Available from: <http://www.skriningsrbija.rs/srl/skrining-raka-grlica-materice/dokumenta/>.
7. Bosch, F.X. and N. Muñoz, *The viral etiology of cervical cancer*. Virus research, 2002. **89**(2): p. 183-190.
8. González, A., et al., *Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies*. Int. J. Cancer, 2006. **118**: p. 1481-1495.
9. Crosbie, E.J., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. The Lancet, 2013. **382**(9895): p. 889-899.
10. Schiffman, M. and N. Wentzensen, *Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2013. **22**(4): p. 553-560.
11. Nanda, K., et al., *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review*. Annals of internal medicine, 2000. **132**(10): p. 810-819.
12. Louvanto, K., et al., *HPV testing with cytology triage for cervical cancer screening in routine practice*. American journal of obstetrics and gynecology, 2014. **210**(5): p. 474. e1-474. e7.
13. Cooper, C.P. and M. Saraiya, *Perceived effectiveness of HPV test as a primary screening modality among US providers*. Preventive medicine, 2015. **78**: p. 33-37.
14. Monsonego, J., et al., *Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large US screening population: data from the ATHENA trial*. Gynecologic oncology, 2015. **137**(1): p. 47-54.
15. de Sanjose, S., et al., *Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study*. The lancet oncology, 2010. **11**(11): p. 1048-1056.

16. Sancho-Garnier, H., et al., *Overview of cervical cancer screening practices in the extended Middle East and North Africa countries*. *Vaccine*, 2013. **31**: p. G51-G57.
17. Denny, L., *Cytological screening for cervical cancer prevention*. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 2012. **26**(2): p. 189-196.
18. Joste, N., *Overview of the cytology laboratory: specimen processing through diagnosis*. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 2008. **35**(4): p. 549-563.
19. Hoskins, W.J., *Principles and practice of gynecologic oncology*. 2005: Lippincott Williams & Wilkins.
20. Guerrieri, P. and P. Montemaggi, *Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)*, in *Encyclopedia of Radiation Oncology*. 2013, Springer. p. 98-98.
21. Solomon, D., et al., *The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology*. *Jama*, 2002. **287**(16): p. 2114-2119.
22. Arbyn, M., et al., *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. —summary document*. *Annals of Oncology*, 2010. **21**(3): p. 448-458.
23. Burd, E.M., *Updated guidelines for cervical cancer screening*. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2014. **36**(13): p. 95-103.
24. Alsharif, M., et al., *Unsatisfactory SurePath liquid-based Papanicolaou tests*. *Cancer Cytopathology*, 2009. **117**(1): p. 15-26.
25. Smith, J.H., *Cytology, liquid-based cytology and automation*. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2011. **25**(5): p. 585-596.
26. Rosa, M., et al., *The unsatisfactory ThinPrep® Pap Test™: Analysis of technical aspects, most common causes, and recommendations for improvement*. *Diagnostic cytopathology*, 2013. **41**(7): p. 588-594.
27. Wright, T.C., et al., *Interlaboratory variation in the performance of liquid-based cytology: Insights from the ATHENA trial*. *International journal of cancer*, 2014. **134**(8): p. 1835-1843.
28. Strander, B., et al., *Liquid-based cytology versus conventional Papanicolaou smear in an organized screening program*. *Cancer cytopathology*, 2007. **111**(5): p. 285-291.
29. Taylor, S., et al., *Direct comparison of liquid-based and conventional cytology in a South African screening trial*. *International journal of cancer*, 2006. **118**(4): p. 957-962.
30. Colgan, T.J., et al., *Results of the implementation of liquid-based cytology—SurePath in the Ontario screening program*. *Cancer Cytopathology*, 2004. **102**(6): p. 362-367.
31. Hoda, R.S., K. Loukeris, and F.W. Abdul-Karim, *Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: A comprehensive review of similarities and differences*. *Diagnostic cytopathology*, 2013. **41**(3): p. 257-278.
32. Quiroga-Garza, G., et al., *Common causes for unsatisfactory Pap tests in a high-risk population: insights into a yet unresolved problem in gynecologic cytology*. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 2014. **3**(5): p. 256-260.

33. Austin, R.M. and A. Onisko, *Increased cervical cancer risk associated with extended screening intervals after negative human papillomavirus test results: Bayesian risk estimates using the Pittsburgh Cervical Cancer Screening Model*. Journal of the American Society of Cytopathology, 2016. **5**(1): p. 9-14.
34. Fusco, E., et al., *History of colposcopy: a brief biography of Hinselmann*. Journal of prenatal medicine, 2008. **2**(2): p. 19.
35. Papić-Obradović, M. and B. Jeftić, *Postojeće metode i tehnike dijagnostikovanja kancera epitelnog tkiva grlića materice*, in *Rana dijagnostika kancera epitelnih tkiva*, M. Papić-Obradović, Editor. 2012, Don Vas: Belgrade. p. 87-100
36. Stanimirović, B., *Patologija cerviksa, vagine i vulve: kolposkopski atlas*. 1999, Beograd: Elit Medica.
37. Pierangelo, A., et al., *Polarimetric imaging of uterine cervix: a case study*. Optics express, 2013. **21**(12): p. 14120-14130.
38. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
39. Klatt, E., *Robbins and Cotran Atlas of Pathology*. 2006: Saunders.
40. Saslow, D., et al., *American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer*. CA: a cancer journal for clinicians, 2012. **62**(3): p. 147-172.
41. Dickson, E.L., et al., *Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65*. Gynecologic oncology, 2014. **133**(3): p. 405-408.
42. Arbyn, M., et al., *Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer*. Vaccine, 2012. **30**: p. F88-F99.
43. Meijer, C.J., et al., *Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older*. International journal of cancer, 2009. **124**(3): p. 516-520.
44. Arbyn, M., et al., *Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening?* Clinical Microbiology and Infection, 2015. **21**(9): p. 817-826.
45. Poljak, M., et al., *Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses*. Vaccine, 2012. **30**: p. F100-F106.
46. Sindhuphak, R., et al., *A new approach for the detection of cervical cancer in Thai women*. Gynecologic oncology, 2003. **90**(1): p. 10-14.
47. Krishna, C.M., et al., *Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix*. Vibrational Spectroscopy, 2006. **41**(1): p. 136-141.
48. Mo, J., et al., *High wavenumber Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia*. Analytical chemistry, 2009. **81**(21): p. 8908-8915.
49. Duraipandian, S., et al., *In vivo diagnosis of cervical precancer using Raman spectroscopy and genetic algorithm techniques*. Analyst, 2011. **136**(20): p. 4328-4336.
50. Bressler, J., *Part III. Cervical cancer screening: Can we do better?* Disease-a-Month, 2000. **46**(6): p. 406-420.

51. De Vuyst, H., et al., *Comparison of pap smear, visual inspection with acetic acid, human papillomavirus DNA-PCR testing and cervicography*. International journal of gynecology & obstetrics, 2005. **89**(2): p. 120-126.
52. Denny, L., *Cervical cancer prevention: New opportunities for primary and secondary prevention in the 21st century*. International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2012. **119**: p. S80-S84.
53. Saleh, H.S., *Can visual inspection with acetic acid be used as an alternative to Pap smear in screening cervical cancer?* Middle East Fertility Society Journal, 2014. **19**(3): p. 187-191.
54. Jeronimo, J., et al., *A multicountry evaluation of careHPV testing, visual inspection with acetic acid, and papanicolaou testing for the detection of cervical cancer*. International Journal of Gynecological Cancer, 2014. **24**(3): p. 576-585.
55. Arbyn, M., et al., *Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis*. Obstetrics & Gynecology, 2008. **111**(1): p. 167-177.
56. Klug, S.J., et al., *A randomized trial comparing conventional cytology to liquid-based cytology and computer assistance*. International Journal of Cancer, 2013. **132**(12): p. 2849-2857.
57. Ronco, G., et al., *Accuracy of liquid based versus conventional cytology: overall results of new technologies for cervical cancer screening: randomised controlled trial*. Bmj, 2007. **335**(7609): p. 28.
58. Macharia, H., et al., *A comparative analysis of conventional Pap smear cytology, liquid based cytology and colposcopy clinical impression with colposcopy biopsy histology as gold standard in women undergoing colposcopy in Kenyatta National Hospital*. International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology, 2014. **3**(1): p. 58-63.
59. Sigurdsson, K., *Is a liquid-based cytology more sensitive than a conventional Pap smear?* Cytopathology, 2013. **24**(4): p. 254-263.
60. Dinkelspiel, H. and W. Kinney, *State of the Science: Cervical cancer screening in transition*. Gynecologic oncology, 2014. **133**(3): p. 389-393.
61. Mayrand, M.-H., et al., *Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(16): p. 1579-1588.
62. Huh, W.K., et al., *Use of primary high-risk human papillomavirus testing for cervical cancer screening: interim clinical guidance*. Gynecologic oncology, 2015. **136**(2): p. 178-182.
63. Liang, H., et al., *The sensitivity of Pap cytology and HPV testing to detect incident cervical cancer: prior testing results in 178 patients with invasive cervical cancer at a large general hospital in China*. Journal of the American Society of Cytopathology, 2016. **5**(2): p. 64-70.
64. Pileggi, C., et al., *Is HPV DNA testing specificity comparable to that of cytological testing in primary cervical cancer screening? Results of a meta-analysis of randomized controlled trials*. International journal of cancer, 2014. **135**(1): p. 166-177.



65. Ronco, G., et al., *Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials*. The Lancet, 2014. **383**(9916): p. 524-532.
66. Wright, T.C., et al., *Primary cervical cancer screening with human papillomavirus: end of study results from the ATHENA study using HPV as the first-line screening test*. Gynecologic oncology, 2015. **136**(2): p. 189-197.
67. Zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-350.
68. MM wALBooMER, J., et al., *HUMAN PAPILLOMAVIRUS IS A NECESSARY CAUSE OF INVASIVE CERVICAL CANCER. VVORLDWIDE*. J. pathol, 1999. **189**: p. 12-19.
69. Dochez, C., et al., *HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update*. Vaccine, 2014. **32**(14): p. 1595-1601.
70. Van Krieking, G., et al., *Estimation of the potential overall impact of human papillomavirus vaccination on cervical cancer cases and deaths*. Vaccine, 2014. **32**(6): p. 733-739.
71. Papić-Obradović, M. and B. Jeftić, *Citologija i fiziologija epitelnog tkiva grlića materice*, in *Rana dijagnostika kancera epitelnih tkiva*, M. Papić-Obradović, Editor. 2012, Don Vas: Belgrade. p. 27-33
72. Orfanoudaki, I.M., D. Kappou, and S. Sifakis, *Recent advances in optical imaging for cervical cancer detection*. Archives of gynecology and obstetrics, 2011. **284**(5): p. 1197-1208.
73. Mourant, J.R., et al. *Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status*. in *BiOS 2000 The International Symposium on Biomedical Optics*. 2000. International Society for Optics and Photonics.
74. Drezek, R., et al., *Light scattering from cervical cells throughout neoplastic progression: influence of nuclear morphology, DNA content, and chromatin texture*. Journal of biomedical optics, 2003. **8**(1): p. 7-16.
75. Thekkek, N. and R. Richards-Kortum, *Optical imaging for cervical cancer detection: solutions for a continuing global problem*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(9): p. 725-731.
76. Grozdanović-Radovanović, J., *Citologija*. 2000, Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
77. Papić-Obradović, M., D. Kojić, and L. Matija, *Opto-Magnetic Method for Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Detection in Blood Plasma Samples*. Acta Physica Polonica A, 2010. **117**(5): p. 782-784.
78. Koruga, Đ., et al., *Water hydrogen bonds study by opto-magnetic fingerprint technique*. Acta Physica Polonica-Series A General Physics, 2010. **117**(5): p. 777.
79. Koruga, Đ., et al., *Epidermal Layers Characterisation by Opto-Magnetic Spectroscopy Based on Digital Image of Skin*. Acta Physica Polonica, A., 2012. **121**(3).
80. Koruga, D. and A. Tomic, *System and method for analysis of light-matter interaction based on spectral convolution*. 2009, Google Patents.
81. Novaković, J., *Rešavanje klasifikacionih problema mašinskog učenja*. 2013, Vrnjačka Banja: Fakultet tehničkih nauka u Čačku, SaTCIP.

82. James, G., et al., *An introduction to statistical learning*. Vol. 6. 2013: Springer.
83. Friedman, J., T. Hastie, and R. Tibshirani, *The elements of statistical learning*. Vol. 1. 2001: Springer series in statistics Springer, Berlin.
84. Sim, J. and C.C. Wright, *The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements*. *Physical therapy*, 2005. **85**(3): p. 257-268.
85. Hajian-Tilaki, K., *Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation*. *Caspian journal of internal medicine*, 2013. **4**(2): p. 627.
86. ROC curve. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ROC\\_curve.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ROC_curve.svg).
87. Papić-Obradović, M., B. Jeftić, and L. Matija, *Papanicolaou stained cervical smear analysis using opto-magnetic imaging spectroscopy*. *FME Transactions*, 2016. **44**(2): p. 212-216.
88. Matija, L., et al., *Nanophysical approach to diagnosis of epithelial tissues using Opto-magnetic imaging spectroscopy*. *Nanomedicine*. **21**: p. 21.
89. Jeftic, B., et al., *Optomagnetic Imaging Spectroscopy Application in Cervical Dysplasia and Cancer Detection: Comparison of Stained and Unstained Papanicolaou Smears*. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 2017: p. 1-8.
90. Raab, S.S., et al., *Improving Papanicolaou test quality and reducing medical errors by using Toyota production system methods*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2006. **194**(1): p. 57-64.
91. Gençtav, A., S. Aksoy, and S. Önder, *Unsupervised segmentation and classification of cervical cell images*. *Pattern recognition*, 2012. **45**(12): p. 4151-4168.
92. Chankong, T., N. Theera-Umpon, and S. Auephanwiriyaikul, *Automatic cervical cell segmentation and classification in Pap smears*. *Computer methods and programs in biomedicine*, 2014. **113**(2): p. 539-556.
93. Bergmeir, C., M.G. Silvente, and J.M. Benítez, *Segmentation of cervical cell nuclei in high-resolution microscopic images: a new algorithm and a web-based software framework*. *Computer methods and programs in biomedicine*, 2012. **107**(3): p. 497-512.
94. Zhang, L., et al., *Segmentation of cytoplasm and nuclei of abnormal cells in cervical cytology using global and local graph cuts*. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 2014. **38**(5): p. 369-380.
95. Lu, Z., G. Carneiro, and A.P. Bradley. *Automated nucleus and cytoplasm segmentation of overlapping cervical cells*. in *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention*. 2013. Springer.
96. Plissiti, M.E. and C. Nikou, *A review of automated techniques for cervical cell image analysis and classification*, in *Biomedical imaging and computational modeling in biomechanics*. 2013, Springer. p. 1-18.

## BIOGRAFSKI PODACI AUTORA

Branislava D. Jeftić rođena je 7.02.1981. godine u Beogradu, gde je završila Četvrtu beogradsku gimnaziju, prirodno-matematički smer, sa odličnim uspehom. 2008. godine diplomirala je na Elektrotehničkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na odseku za fizičku elektroniku radom na temu „*Merna nesigurnost detektora jonizujućeg zračenja*“ sa ocenom 10 (deset). Prosečna ocena tokom osnovnih akademskih studija je iznosila 8.16 (osam i 16/100). Odbranom master rada na temu „*Raspodela pritiska parcijalne skeletirane proteze sa različitim retinerima: in vitro studija*“ na Elektrotehničkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu za Biomedicinski i ekološki inženjering sa ocenom 10 (deset), stiče akademsko zvanje *Master inženjer elektrotehnike i računarstva*. Prosečna ocena tokom master studija iznosila je 10.00 (deset i 0/100). Rad pod nazivom „*Sistem za merenje pritiska ispod mobilnih zubnih nadoknada*“ koji je proistekao iz Master rada kandidatkinje, nagrađen je srebrnom medaljom sa likom Nikole Tesle u oblasti pronalazaštva od strane Saveza pronalazača i autora tehničkih unapređenja Beograda 2010. godine.

Školske 2010/2011. godine Branislava Jeftić upisuje doktorske studije na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Modulu za biomedicinsko inženjerstvo. Od januara 2011. godine Branislava Jeftić je zaposlena na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao Istraživač pripravnik, da bi odlukom Istraživačko-stručnog veća Mašinskog fakulteta sa sednice održane 21.03.2013. godine dobila istraživačko zvanje Istraživač saradnik. U periodu od 2011. godine do danas, kao saradnik u nastavi, učestvovala je u izvođenju više predmeta na Osnovnim i Master akademskim studijama na Mašinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu za Biomedicinsko inženjerstvo pri katedri za automatsko upravljanje: Osnove biomedicinskog inženjerstva, Biomedicinski softveri, Obrada signala, Informacione tehnologije u medicini i Rana dijagnostika kancera i melanoma.

U dosadašnjem stručnom i istraživačkom radu učestvovala je na dva naučno-istraživačka projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i

tehnološkog razvoja III 41006 pod nazivom „Razvoj novih metoda i tehnika za ranu dijagnostiku kancera grlića materice, debelog creva, usne duplje i melanoma na bazi digitalne slike i ekscitaciono emisionih spektara u vidljivom i infracrvenom domenu“ i na projektu III 45009 pod nazivom „Funkcionalizacija nanomaterijala za dobijanje nove vrste kontaktnih sočiva i ranu dijagnostiku dijabetesa“. Takođe, učestvovala je i na projektu formiranja digitalnih predavanja za MCAST univerzitet, pripremom i predstavljanjem nekoliko modula.

Branislava Jeftić govori tečno engleski jezik, a služi se francuskim i nemačkim jezikom. Autor je i koautor na više od 30 radova koji su prezentovani na naučnim skupovima ili objavljeni u časopisima različitih kategorija, kao i tri monografije i dva udžbenika.

**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Бранислава Јефтић

број индекса Д35/10

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

„Алгоритам за одређивање биофизичког стања епителног ткива на бази спектроскопије“

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 22.06.2017.

---

**Прилог 2.**

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Бранислава Јефтић

Број индекса Д35/10

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада „Алгоритам за одређивање биофизичког стања епителног ткива на бази спектроскопије“

Ментор Проф. др Лидија Матија

Потписани/а Бранислава Јефтић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 22.06.2017.

### Прилог 3.

#### Изјава о коришћењу

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

„Алгоритам за одређивање биофизичког стања епителног ткива на бази спектроскопије“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 22.06.2017.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.