

**NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nastavno – naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 18.03.2024. godine, broj 19/XXII-3/3-CB, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

**„Primena savremenih računarskih metoda za analizu međucelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa “**

kandidata dr Svetlane Valjarević, zaposlene u Službi otorinolaringologije sa maksilofacijalnom hirurgijom Kliničko-bolničkog centra “Zemun” u Beogradu.

Mentori doktorske disertacije su prof. dr Milan B. Jovanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i prof. dr Igor Pantić, vanredni profesor, Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Vladimir Đorđević, predsednik, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Danijela Vučević, redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Marina Đelić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu,
4. Prof. dr Miloš Vujisić, vanredni profesor, Elektrotehnički fakultet Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević, vanredni profesor, Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veću Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

## A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Svetlane Valjarević napisana je na srpskom jeziku, u skladu sa Statutom Univerziteta u Beogradu i Pravilnikom o doktorskim studijama na Univerzitetu u Beogradu. Sadrži ukupno 88 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalaze 4 tabele i 19 slika. Doktorska disertacija sadrži još: sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, publikovane radove, biografiju doktoranta, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

U **Uvodu** su opisani epidemiologija, etiologija, klinička slika, dijagnostika i modaliteti lečenja planocelularnog karcinoma larinksa. Posebna pažnja je posvećena izazovima u postavljanju histopatološke dijagnoze, pogotovo u smislu razlikovanja displastičnih lezija od početnog stadijuma karcinoma kao i procene prisustva malignih ćelija u graničnim preparatima uzetim sa tkiva koje makroskopski izgleda zdravo. Precizno je objašnjena metoda matrice ko-pojavlivanja nijansi sive (engl. "Gray-level Co-occurrence Matrix", GLCM) koja se sve češće koristi za dopunsku evaluaciju medicinske slike i pokazuje sve veći značaj u oblasti histopatološke dijagnostike, posebno kod analiziranja tumorskog tkiva. GLCM predstavlja računarski metod koji se danas može koristiti u cilju analiziranja i kvantifikacije najdiskretnijih promena u strukturi ćelija i tkiva. U uvodu su opisane mogućnosti ove metode da kvantifikuje teksturu dvodimenzionalnog signala kao što je radiološka slika ili digitalni mikrograf i da na indirektan način evaluira početne promene u međućelijskoj interakciji i komunikaciji koje se odražavaju na citoarhitekturu tkiva, i koje nisu uočljive konvencionalnim mikroskopskim metodama. Opisano je koji se teksturalni indikatori (poput inverznog momenta razlike i angularnog drugog momenta) mogu koristiti za merenje strukturne homogenosti i uniformnosti kako normalnog, tako i patološki izmenjenog tkiva. Objasnjeno je koncept mašinskog učenja i tipovi istog i time je uvodnim izlaganjem postavljena dobra osnova zadatim ciljevima ove doktorske disertacije.

**Ciljevi rada** su precizno definisani, a sastoje se od utvrđivanja senzitivnosti računarskih algoritama teksturalne analize u detekciji strukturnih promena karakterističnih za ćelije i tkivo planocelularnog karcinoma larinksa i predlaganja inovativnih modela mašinskog učenja, zasnovanih na teksturalnim parametrima, koji bi mogli da se koriste za unapređenje dijagnostike planocelularnog karcinoma larinksa i smernica u procesu odlučivanja o daljem onkološkom tretmanu kod pacijenata sa planocelularnim karcinomom larinksa.

U poglavlju **Materijal i metode** navedeno je da se radi o retrospektivnoj studiji koja je analizirala uzorke tkiva sluznice larinksa uzetih mikrohirurškim instrumentima za biopsiju u toku laringomikroskopskog pregleda u opštoj endotrahealnoj anesteziji kod ukupno 100 pacijenata (kod 50 pacijenata histopatološkom analizom dijagnostikovano je planocelularni karcinom larinksa, dok je kod 50 pacijenata dijagnostikovano hronični laringitis). Jasno su navedeni kriterijumi za

uključenje u studiju, kao i kriterijumi za isključenje iz iste. Detaljno je opisan način fiksiranja i bojenja histopatoloških preparata. Opisan je način pravljenja reprezentativnih mikrografa od svakog preparata, korišćenjem industrijskog Pro-MicroScan DEM 200 senzora, odnosno digitalnog instrumenta postavljenog na OPTIC900TH trinokularni biološki mikroskop. Mikrografi su napravljeni u JPG formatu sa vrednošću bitne dubine od 24, a horizontalna i vertikalna rezolucija iznosile su po 96 dpi. Na ovaj način, u okviru ove disertacije, analizirano je ukupno 2000 mikrografa. U preparatima planocelularnog karcinoma larinksa analizirani su mikrografi ćelija koje su izgledale morfološki intaktno, bez mikroskopskih znakova maligne transformacije. Posebno su analizirani regioni interesa tkiva, a posebno regioni interesa jedara epitelnih ćelija. Na ovaj način su kvantifikovani indikatori teksture samog tkiva, kao i pojedinačnih ćelija, odnosno njihovih jedara. Definisana je diskretna vejevlet transformacija. Na osnovu rezultata GLCM analize, na platformi Mazda, kvantifikovano je 5 parametara teksturalne analize: inverzni momenat razlike, angularni drugi moment, teksturalna korelacija, kontrast GLCM-a i teksturalna varijansa. Kao što je gore napomenuto, ove vrednosti su određene za regione interesa tkivne stukture, kao i za jedra pojedinačnih epitelnih ćelija. U ovom istraživanju kao dodatak teksturalnoj GLMC analizi primenjena je i diskretna vejevlet transformacija.

Precizno je navedena statistička analiza svih dobijenih rezultata.

Istraživanje je odobreno dozvolom Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 17/I-17, 12. januar 2023. godine) i sprovedeno je u skladu sa principima Helsinške deklaracije.

U poglavlju **Rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

**Diskusija** je napisana pregledno i jasno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

**Zaključci** sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **Literatura** sadrži spisak od 353 reference.

## **B) Provera originalnosti doktorske disertacije**

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije „Primena savremenih računarskih metoda za analizu međućelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa“ autora Svetlane Valjarević, konstatovano je da podudaranje teksta iznosi ukupno 9% iz 123 izvora (od kojih je iz 3 izvora preklapanje 1%, dok je iz 120 izvora preklapanje manje od 1%). Ovaj stepen podudarnosti posledica je citiranja rezultata publikovanih studija drugih autora, kao i prethodno publikovanih rezultata doktorantovih istraživanja, koji su proistekli iz disertacije, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih

disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18).

### **C) Kratak opis postignutih rezultata**

U ovoj studiji analizirano je 2000 mikrografa. Teksturalna analiza citoarhitekture tkiva, odnosno regiona interesa digitalnih mikrografa tkiva pokazala je da postoje značajne razlike između dve grupe (kancerske i kontrolne, pri čemu je ova druga obuhvatala uzorke sa stanjem laringitisa) u pogledu svih parametara, kako onih određenih GLCM metodom, tako i onih kvantifikovanih vejevlet matematičkom metodom. Vrednosti angularnog drugog momenta mikrografa tkiva planocelularnog karcinoma larinksa bila je značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu. Drugim rečima, tkivo karcinoma je imalo značajno veću vrednost GLCM parametra koji je indirektni pokazatelj teksturalne uniformnosti. Sa druge strane, lokalna teksturalna homogenost, kvantifikovana kroz vrednosti inverznog momenta razlike, je bila manja u kancerskom tkivu u odnosu na kontrolu. Teksturalni kontrast citoarhitekture tkiva planocelularnog karcinoma larinksa imao je značajno više vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu. Srednja vrednost GLCM sume varijanse je bila značajno manja kod tkiva karcinoma larinksa u odnosu na kontrolnu grupu. Od svih GLCM indikatora, najveću senzitivnost u razlikovanju benignog od malignog tkiva imali su angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike. Kada je u pitanju vejevlet matematička analiza, uočeno je da kancersko tkivo, odnosno regionu interesa na digitalnim mikrografima, imaju značajno veće vrednosti svih energija vejevlet koeficijenata u odnosu na kontrolu. Od svih vejevlet indikatora, najveću senzitivnost u razlikovanju benignog od malignog tkiva je imala EnHH energija. Pokazano je i da je nuklearna strukturalna organizacija epitelnih ćelija planocelularnog karcinoma larinksa karakterisana smanjenim nivoima uniformnosti i lokalne teksturalne homogenosti u poređenju sa morfološki sličnim ćelijama sluznice u hroničnom laringitisu. Drugim rečima, kako stepen varijacije intenziteta sive boje u regionima od interesa, tako i linearna zavisnost sivih nivoa susednih jedinica rezolucije, bili su povećani u nuklearnim regionima interesa ćelija planocelularnog karcinoma larinksa.

U okviru istraživanja sprovedenog za potrebe disertacije razvijeni su modeli mašinskog učenja, korišćenjem algoritama slučajnih šuma, binomialne logističke regresije, kao i višeslojnog perceptrona. GLCM i DWT kvantifikatori korišćeni su kao ulazni podaci. Sva tri modela su pokazala zadovoljavajuće performanse u pogledu klasifikacije regiona interesa tkivne strukture. Model zasnovan na algoritmu slučajnih šuma imao je najveću klasifikacionu preciznost i površinu ispod krive radnih karakteristika prijemnika. Kad su u pitanju modeli razvijeni u cilju klasifikacije regiona interesa jedara epitelnih ćelija, svi modeli su pokazali relativno dobre performanse, pri čemu su se slučajne šume odlikovale najvećom klasifikacionom preciznošću. Slučajne šume imale su najveću tačnost klasifikacije, model zasnovan na binomialnoj logističkoj regresiji imao je nešto nižu klasifikacionu preciznost, dok je model zasnovan na veštačkim neuralnim mrežama višeslojnog perceptrona imao najnižu klasifikacionu preciznost.

### **D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature**

U ovom istraživanju dokazana je statistički značajna razlika u parametrima tkivne heterogenosti između tkiva karcinoma i tkiva maligno neizmenjene sluznice. Takođe, dokazano je i da epitelne ćelije u karcinomu grkljana, u poređenju sa morfološki sličnim ćelijama benignog tkiva, imaju statistički značajno drugačije nuklearne GLCM karakteristike mikrografa. Dokazano je i da postoje značajne razlike u pokazateljima vežvlet transformacije mikrografa ove dve grupe ćelija koje se pri konvencionalnoj mikroskopiji čine morfološki identičnim. Ovi nalazi impliciraju da nuklearni teksturalni obrasci u jedrima epitelnih ćelija u kancerogenom tkivu pokazuju suptilne razlike koje se mogu detektovati korišćenjem savremenih računarskih metoda.

Meng-Jia i saradnici su 2018. godine analizirali dvodimenzionalni signal dobijen mikroskopiranjem 2 grupe histopatoloških uzoraka sluznice usne duplje, koji su čuvani u formalinu, a potom bojeni hematoksilin-eozinom, slično kao i u ovoj disertaciji. Jednu grupu uzoraka činili su uzorci zdravog tkiva sluznice, a drugu tkivo planocelularnog karcinoma usne duplje. Studija je pokazala da maligno izmenjeno tkivo ima viši kontrast, entropiju i nižu energiju, korelaciju i homogenost, sa statistički značajnom razlikom u većini opisivanih vrednosti (Meng-Jia et al. 2018), što je u saglasnosti sa rezultatima doktorske disertacije. Nalazi disertacije takođe su u saglasnosti sa rezultatima studije koja je ispitivala 2 vrste tkiva štitne žlezde- tkivo gde je histopatološki verifikovan Hashimoto tireoiditis i tkivo verifikovano kao papilarni karcinom tireoidne žlezde. Kvantifikacija razlika između ispitivanih uzoraka korišćenjem parametara teksture matrice pojavljivanja nivoa sive boje (GLCM) pokazala je statistički značajnu razliku između ispitivanih uzoraka u kontrastu, korelaciji, angularnom drugom momentu i homogenosti između malignih ćelija GLCM-a. (Dincic et al. 2020). Studija Liana i saradnika ispitivala je histopatološke preparate planocelularnog karcinoma usne duplje i poredila GLCM parametre ovog tkiva sa parametrima neizmenjenog epitelnog, vezivnog i mišićnog tkiva usne duplje. Rezultati studije dokazali su da maligno izmenjeno tkivo ima značajno više vrednosti parametara kontrasta i entropije, a niže vrednosti korelacije, homogenosti i energije, te da GLCM analiza precizno diferencira zdravo od malignog tkiva (Lian et al. 2018). U sličnoj studiji, GLCM algoritam je sa stoprocentnom preciznošću diferencirao zdravu sluznicu usne duplje od prekanceroznih lezija, odnosno leukoplakije i eritroplakije (Shah et al. 2022). Rezultati doktorske disertacije u saglasnosti su i sa rezultatima dobijenim u istraživanju u kojem se metod teksturalne analize koristio prilikom razlikovanja citoarhitekture tkiva karcinoma sluznice orofarinksa u odnosu na zdravu sluznicu (Bicci et al. 2022).

U svom istraživanju, Hao i saradnici dizajnirali su model prepoznavanja i klasifikacije histopatoloških slika raka dojke na osnovu karakteristika analize teksture GLCM metodom. Uzorci za analizu prikupljeni su putem hirurške otvorene biopsije, a potom od strane patologa obojeni hematoksilinom i eozinom, kao i u našem istraživanju. Na dvodimenzionalne zapise histopatološkog preparata primenjena je GLCM analiza. Studija je pokazala da su jedra maligno izmenjenog tkiva dojke veća od jedara neizmenjenog tkiva, kao i da su gusto raspoređena. Primena neuronske mreže koja je razvijena za opisivanje strukture slika dala je veći broj informacija o međućelijskoj interakciji i izmenjenosti ćelija u odnosu na samu GLCM analizu (Hao et al. 2022).

U radu Kana i saradnika, istraživane su GLCM teksturalne karakteristike ćelija tkiva dojke, a SVM-baziran klasifikator (engl. "Support Vectors Machines", metoda potpornih vektora) koristio se za klasifikaciju ćelija u maligne i benigne. Predloženi pristup je validiran kroz eksperimente nad stvarnim skupovima podataka citoloških slika u smislu segmentacije kancerogenih ćelija i klasifikacije ćelija u maligne i benigne. Eksperimentima je utvrđeno da predloženi pristup postiže visoku tačnost u klasifikaciji malignih i benignih ćelija (Khan et al. 2022). Slična studija iz 2023. godine (He et al. 2023) analizirala je 3000 slika dobijenih sa histopatoloških preparata sluznice grlića materice (1000 slika nepromenjenog tkiva, 1000 slika benigno izmenjenog tkiva i 1000 slika maligno izmenjenog tkiva). Teksturalne karakteristike dobijene su GLCM metodom. 80 procenata celokupnog skupa podataka nasumično je odabrano kao skup za treniranje modela dok je prostalih 20 procenata predstavljalo skup za testiranje, kao i u doktorskoj disertaciji kandidata. Tačnost klasifikacije SVM metodom iznosila je 96,8%, pri čemu su karakteristike jedra bile od ključnog značaja u SVM klasifikaciji slika histopatologije u smislu maligniteta.

U radu Rahmana i saradnika na osnovu parametara GLCM analize klasifikovane su mikroskopske slike planocelularnog karcinoma usne duplje u 2 kategorije- benigno i maligno tkivo. Nakon analize teksturalnih karakteristika slika, za klasifikaciju je korišćen SVM (engl. "Support Vector Machine") model i postignuta je tačnost od 99.78 % u smislu klasifikacije tkiva (Rahman et al. 2020). Studija Zaoa i saradnika iz 2023. godine analizirala je tkivo jajnika kombinacijom multimodalnih optičkih sistema sa računarskim algoritmima kako bi se detektovala različita patološka stanja (benigne promene, karcinom jajnika, nekroza tkiva). Upoređivanje sa tradicionalnim metodama patološke dijagnostike je otkrilo da primena GLCM algoritama može biti brz i verodostojan alat za dijagnozu kancera (Zao et al. 2023).

Studija Fatija i saradnika istraživala je hibridnu primenu konvolutivnih neuronskih mreža i algoritma podržanih vektora u cilju rane dijagnostike planocelularnog karcinoma usne duplje. Analizirane su karakteristike boje, teksture i oblika ćelija. Navedeni parametri histopatološke slike ekstrahovani su korišćenjem histograma zamućenih boja (FCH), diskretnom wavelet transformacijom (DWT), lokalnim binarnim obrascem (LBP) i matricom pojavljivanja nivoa sive (GLCM). Svi predloženi sistemi postigli su odlične rezultate u histološkoj dijagnostici slike (Fati et al. 2022).

U studiji koja je analizirala kliničke podatke i radiološke karakteristike 18F-FDG-PET snimaka kod pacijenata sa karcinomom larinksa, zaključeno je da alati mašinskog učenja mogu pomoći u predviđanju prognoze ovog oboljenja. Kliničkih parametri i 40 radiomskih karakteristika baziranih na 18F-FDG-PET-u korišćeni su za predviđanje napredovanja bolesti i preživljavanja. GLCM entropija bila je jedan od najvažnijih faktora za predviđanje progresije bolesti. Model slučajnih šuma pokazao je najbolje performanse u predviđanju dužine preživljavanja (Nakajo et al. 2023). Ovaj model mašinskog učenja pokazao je najbolje rezultate i u doktorskoj disertaciji kandidata . U literaturi nema istraživanja koja bi bila direktno uporediva sa ovom doktorskom disertacijom (primena GLCM i vejevlet analiza na mikrografe tkiva planocelularnog karcinoma larinksa). Autori su analizom rezultata studija koje su koristile istu tehniku teksturalne analize kako za morfološke karakteristike tkiva, tako i za strukturu jedra, prezentovali rezultate koji su indirektno

uporedivi sa rezultatima ovih studije, te su na taj način obrazložili opravdanost i dobijene rezultate istraživanja (Dincic et al., 2020; Bicci et al. 2022; Shah et al. 2022; Nakajo 2023).

### **E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije**

**Valjarevic S**, Jovanovic MB, Miladinovic N, Cumic J, Dugalic S, Corridon PR, Pantic I. Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis of Nuclear Textural Patterns in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Focus on Artificial Intelligence Methods. *Microsc Microanal.* 2023;29(3):1220-1227 (**kategorija M21; IF: 4,099**) doi:10.1093/micmic/ozad042

**Valjarevic S**, Jovanovic MB, Pantic I. Primena savremenih računarskih metoda u dijagnostici i lečenju karcinoma larinksa. *Medicinski podmladak* 2023, 74(5):14-20. doi: 10.5937/mp74-43594

### **F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)**

Doktorska disertacija „Primena savremenih računarskih metoda za analizu međucelijske interakcije u cilju unapređenja dijagnostike i hirurškog lečenja planocelularnog karcinoma larinksa“ dr Svetlane Valjarević, predstavlja originalni naučni doprinos i daje nova saznanja o mogućnosti primene GLCM metode, kao i mašinskog učenja u histopatološkoj dijagnostici planocelularnog karcinoma larinksa. Studija je jedinstvena jer primena ove metode u analizi histopatoloških preparata sluznice larinksa do sada nije publikovana. Najveći naučni doprinos disertacije se ogleda u mogućnosti korišćenja računarskih indikatora teksturalne analize u cilju stvaranja modela mašinskog učenja koji bi u budućnosti teorijski mogli da se koriste u cilju tačnije i efikasnije histopatološke dijagnostike. Teksturalna i vejevlet matematička analiza ćelija i tkiva, kao i modeli mašinskog učenja bazirani na njima, imaju potencijal da u budućnosti, nakon dodatne evaluacije i razvoja, budu uključeni u standardne protokole u otorinolaringologiji za dijagnozu i hirurško lečenje planocelularnog karcinoma larinksa.

Ova doktorska disertacija napisana je prema svim principima naučnog istraživanja. Obuhvatila je analizu velikog broja mikrografa (dve hiljade). Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, i imajući u vidu dosadašnji izuzetan naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Svetlane Valjarević i odobri javnu odbranu iste radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

Beograd, 27.03.2024. godine

Članovi komisije:

Prof. dr Vladimir Đorđević

---

Prof. dr Danijela Vučević

---

Prof. dr Marina Đelić

---

Prof. dr Miloš Vujisić

---

Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević

---

Mentori:

Prof. dr Milan B. Jovanović

---

Prof. dr Igor V. Pantić