



Hrvatska zaklada za znanost



Program: (09) Istraživački projekti

OBRAZAC ZA IZVJEŠĆE

**prije popunjavanja izvješća, pročitajte upute koja se nalaze na kraju dokumenta*

1. IZVJEŠĆE

Izvješće za razdoblje (označiti):

0-12	13-24	25-36
-------------	--------------	--------------

2. PROJEKT

Naziv projekta (na hrvatskom jeziku):

Analiza nelinearnih komponenata s primjenama u kemometriji i patologiji

Broj projekta (popunjava Zaklada): **9.01/232**

3. VODITELJ PROJEKTA I PROJEKTNI TIM

3.1 VODITELJ PROJEKTA

Ime i prezime:	Ivica Kopriva	Ustanova:	Institut Ruđer Bošković
Titula:	Doktor znanosti		
Telefon:	+385-1-4571-286	Adresa:	Bijenička cesta 54
Faks:	+385-1-4680-104	Grad:	Zagreb
E-pošta:	ikopriva@irb.hr	Poštanski broj:	10000
Osobna www str.:	http://www.lair.irb.hr/ikopriva/	www str. ustanove:	www.irb.hr

3.2 SURADNICI I KONZULTANTI

Ime i prezime, titula	Status na projektu (suradnik/konzultant)	Matična organizacija i radno mjesto	Rad na projektu (upisati trajanje i razdoblje npr. 4 mjeseca, siječanj-travanj 2012 ili 10 dana, 10.-20. ožujka 2012.)
Marijana Popović-Hadžija, dr. sc.	suradnica	Institut Ruđer Bošković, znanstvena suradnica	prosinac 2012 - studeni 2013.
Mirko Hadžija, dr. sc.	konzultant	Institut Ruđer Bošković, znanstveni savjetnik	prosinac 2012- studeni 2013.
Gorana Aralica, dr. sc.	konzultantica	KBC Dubrava, klinički patolog	prosinac 2012- studeni 2013.
Ivanka Jerić, dr. sc.	konzultantica	Institut Ruđer Bošković, viša znanstvena suradnica	ožujak 2013 - srpanj 2013.
Marko Filipović, dr. sc.	suradnik	Institut Ruđer Bošković, viši asistent	prosinac 2012 - studeni 2013.
Lidija Brkljačić, dipl. ing.	suradnica	Institut Ruđer Bošković, znanstvena novakinja	veljača 2013 - rujan 2013.
Ante Jukić, dipl. ing.	suradnik	Institut Ruđer Bošković, znanstveni novak	prosinac 2012 - ožujak 2013.

3.3 ZNANSTVENICI U RANOJ FAZI RAZVOJA ISTRAŽIVAČKE KARIJERE

Izobrazba znanstvenika u ranoj fazi istraživačke karijere

Navedite ime(na) i prezime(na) mladih istraživača (poslijedoktorand/doktorand) zaposlenih na projektu iz sredstava HRZZ-a te datum od kada je započelo financiranje plaće iz sredstava HRZZ-a. Za doktorande, navedite datum upisa doktorskog studija doktoranda te temu doktorske radnje.

U kojoj je mjeri projekt pridonio izobrazbi mladih znanstvenika te koje kompetencije i kvalifikacije razvijaju radom na ovom projektu?

1. Viši asistent dr. sc. Marko Filipović na projektu je zaposlen kao suradnik poslijedoktorand. Za vrijeme ugovaranja projekta bilo je predviđeno da mu se sa projekta Zaklade isplaćuje plaća u drugoj i trećoj godini projekta ako mu Ministarstvo Znanosti, Obrazovanja i Športa (MZOŠ) ne ponudi ugovor o radu nakon doktorata. Kako je nakon doktorata dobio novi 4-godišnji ugovor o radu sa MZOŠ-om na radnom mjestu višeg asistenta sredstva predviđena za isplatu plaće na projektu Zaklade nisu potrebna. O tome je dopisom od 9. kolovoza 2013. obaviješten upravni odbor Zaklade. Marko Filipović je na projektu angažiran na razvoju i ispitivanju algoritama za rijetkošću ograničene faktorizacije linearnih faktorskih modela. Na srodnoj temi je doktorirao 5. travnja 2013. godine na Matematičkom odsjeku PMF-a, Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom druge i treće godine projekta biti će angažiran na usporednoj kvantitativnoj analizi nenegativnošću i rijetkošću regulariziranim algoritmima za nelinearne faktorske modele u dekompoziciji RGB slike histopatoloških uzoraka i izdvajanju čistih komponenata iz spektara mase nelinearnih kemijskih reakcija. Očekuje se da će ove aktivnosti tijekom 2014. i/ili 2015. godine rezultirati s dva znanstvena rada u vodećim časopisima iz područja obrade medicinske slike i kemometrije.

2. Znanstvena novakinja Lidija Brkljačić je doktorski student u području analitičke kemije pod vodstvom dr.sc. Ivanke Jerić. Područje njezinog znanstvenog rada odnosi se na kvalitativne i kvantitativne analize organskih spojeva, na razvoj i primjene metoda spektrometrije mase, te sintezu spojeva i pripremu uzoraka. Predviđeno je da pod nadzorom dr. sc. Ivanke Jerić na projektu Zaklade sudjeluje u pripremi uzoraka i snimanju spektara mase nelinearnih kemijskih reakcija tijekom druge i treće godine projekta. No, pozitivan rezultat u izdvajanju čistih komponenata iz nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida ostvaren je već tijekom prve godine projekta (vidi sekcije 5.1 i 5.3). Također je tijekom prve godine projekta ostvaren doprinos u izdvajanju većeg broja čistih komponenata iz malog broja spektara mase linearnih smjesa. Ovaj rezultat objavljen je u jednom od vodećih znanstvenih časopisa iz područja kemometrije:

I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, "Nonlinear Mixture-wise Expansion Approach to Underdetermined Blind Separation of Nonnegative Dependent Sources," *Journal of Chemometrics*, vol. 27, pp.189-197, 2013.

3. Znanstveni novak Ante Jukić bio je angažiran na projektu Zaklade od prosinca 2012. do ožujka 2013. godine na području usporedne analize algoritama za nelinearno slijepo razdvajanje signala. Na osobni zahtjev raskinuo je radni odnos na Institutu Ruđer Bošković i otišao na doktorski studij na Sveučilište u Oldenburgu, Njemačka. Jedna klasa algoritama za nelinearno slijepo razdvajanje signala ispitana je na problemu demarkacije tkiva (tumora) iz

višespektralne magnetsko-rezonancijske slike mozga i segmentaciji organa (posebice jetre i bubrega) iz višekontrastne CT slike abdomena. U planu je da se tijekom 2014. i/ili 2015. godine objave znanstveni radovi.

4. SURADNJA

4.1 Suradnja na projektu

Uključuje li projekt suradnju s drugim hrvatskim ili stranim znanstvenim ustanovama, pojedincima ili projektima? Uključuje li suradnju s gospodarstvom i/ili poduzetništvom?

Molimo, navedete dionike suradnje (ime i prezime znanstvenika, ustanova, država) te opišite sve oblike suradnje koje projekt obuhvaća, kao i trajanje suradnje.

Dr. sc. Gorana Aralica, klinički patolog u KBC Dubrava i docent na Medicinskom Fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Suradnja s dr. sc. Aralicom odnosi se na konzultacije u izboru i pripremi histopatoloških uzoraka tkiva jetre ljudi i laboratorijskih miševa, te na interpretaciju i evaluaciju rezultata dekompozicije slike histopatoloških uzoraka. Predviđeno je da dr. sc. Aralica bude angažirana cijelo vrijeme trajanja projekta.

Profesor Xinjian Chen, School of Electronics and Information Engineering, Soochow University, Suzhou City, Narodna Republika Kina. Suradnja s profesorom Chenom u području dekompozicije višekanalne medicinske slike uspostavljena je prije tri godine. Naime, područje primjene algoritama nelinearnog slijepog razdvajanja signala je znatno šire od onog predviđenog projektom. Jedna od važnih primjena je demarkacija organa iz višefazne CT slike, a poseban izazov predstavlja točna demarkacija mekih tkiva (zbog slabog kontrasta). Profesor Chen je omogućio ispitivanje primjene jednog algoritma na demarkaciju jetre iz kliničke višefazne CT slike abdomena, temeljen čega su postignuti kompetitivni rezultati. Trajanje suradnje nije formalizirano i zavisi od kvalitete rezultata.

4.2 Prijava na međunarodne programe

Jeste li se, u dosadašnjem periodu provođenja projekta, prijavljivali na međunarodne programe i natječaje a vezano uz temu ovog projekta? Ako da, na koje i s kojim rezultatom?

Planirate li prijavu na međunarodne programe i natječaje za trajanja projekta, ako da, kada i na koje natječaje?

Krajem svibnja 2013. godine prijavljen je bilateralni projekt s Narodnom Republikom Kinom na temu demarkacije tumora pluća dekompozicijom višemodalne PET/CT slike. Algoritmi nelinearnog slijepog razdvajanja signala koji se razvijaju u sklopu ovog projekta s ciljem primjene u patologiji i kemometriji, mogu biti primijenjeni na nenadziranu dekompoziciju raznih vrsta višekanalne slike u medicini. Do trenutka pisanja ovog izvještaja nisu poznati rezultati natječaja.

Dobre rezultate postignute ovim projektom planiramo iskoristiti u svrhu prijave na međunarodne programe kao što su HORIZON 2020, ERC Proof of Concept i *možda* ERC Advanced Grant. Te prijave se planiraju tijekom 2015. godine kada će biti jasnije kakva je kvaliteta rezultata postignutih na projektu.

5. PROVOĐENJE PROJEKTA

5.1 Usklađenost s radnim planom

U skladu s radnim planom, tablično prikažite sve provedene aktivnosti, vrijeme kada su provedene, tko ih je provodio te njihove rezultate. Po potrebi dodajte redove u tablicu.

Aktivnost	Vrijeme provođenja aktivnosti (upisati trajanje i razdoblje npr. 4 mjeseca, siječanj – travanj 2012)	Sudionici u provođenju aktivnosti (ime i prezime)	Rezultat aktivnosti <i>milestone(s)</i> <i>deliverable(s)</i>
1a) Rijetkošću ograničeni algoritmi faktorizacije nenegativnih matrica.	Prosinac 2012-studeni 2013.	Ivica Kopriva, Marko Filipović	Rezultati detaljne usporedne analize dani su u dodatku 1 ovog izvještaja. Kôd u programskom jeziku MATLAB raspoloživ je na web stranici projekta: http://www.lair.irb.hr/ikopriva/podaci.html . Također, vidi sekciju 5.2.
1b) Algoritmi nelinearnog slijepog razdvajanja signala.	Prosinac 2012-studeni 2013.	Ivica Kopriva (prosinac 2012 - studeni 2013), Ante Jukić (prosinac 2012 - ožujak 2013).	Rezultati usporedne analize sa preporukama dani su u dodatku 2 ovog izvještaja. Pokazano je da pristup preko Hilbertovih prostora sa reprodukcijским jezgrama (HPRJ) nelinearnom pododređenom problemu slijepog razdvajanja signala sa nenegativnim i koreliranim izvornim signalima nema alternativu. Primjene algoritama u HPRJ na probleme u patologiji i kemometriji predmet su zaštite intelektualnog vlasništva (vidi sekcije 5.2 i 5.3).
2a) Prikupljanje uzoraka humane jetre ljudi i izrada histoloških preparata.	Prosinac 2012-studeni 2013.	Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija, Gorana Aralica, Ivica Kopriva	Parafinske kocke uzoraka jetre ljudi s relevantnim kliničkim parametrima su prikupljene, a potom su od njih izrađeni histološki preparati. Sve parafinske kocke, odnosno preparati se nalaze u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za

			<p>molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković.</p> <p>Iako je ta aktivnost bila predviđena tek 2014.-2015. godine, primjena algoritama i njihova parametrizacija već je ispitana na nekim histološkim uzorcima koji pripadaju različitim dijagnostičkim skupinama. Dobiveni rezultati su vrlo dobri. Detaljniji opis dan je u dodatku 3 ovog izvještaja. Detaljan opis doprinosa koji su predmet zaštite intelektualnog vlasništva dan je u sekciji 5.2.</p>
<p>2b) Uspostavljanje mišjeg modela masne jetre, te izrada histoloških preparata</p>	<p>Prosinac 2012-studeni 2013.</p>	<p>Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija, Gorana Aralica, Ivica Kopriva</p>	<p>Uspješno je uspostavljen animalni model masne jetre koji prati metabolički sindrom. U tu svrhu korišteni su miševi soja CBA i NOD i visoko-kalorična hrana. Parafinske kocke organa od interesa kao i izrađeni histološki preparati se nalaze u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković. Detaljniji opis dan je u dodatku 3 ovog izvještaja. Detaljan opis doprinosa koji su predmet zaštite intelektualnog vlasništva dan je u sekcijama 5.2 i 5.3.</p>
<p>3) Preliminarno ispitivanje izdvajanja čistih komponenata iz nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida metodama nelinearnog slijepog razdvajanja signala u Hilbertovim</p>	<p>Prosinac 2012-studeni 2013.</p>	<p>Lidija Brkljačić, Ivanka Jerić, Ivica Kopriva</p>	<p>Ova aktivnost je bila planirana za drugu i treću godinu projekta. Provjera na jednoj nelinearnoj reakciji provedena je, koristeći "unutarnje rezerve", da bi se minimizirali rizici i u slučaju pozitivnog rezultata, što je i ostvareno, što je ranije moguće pristupilo podnošenju domaće i međunarodne patentne prijave. Detaljniji opis ove aktivnosti dan je u dodatku 4. Detaljniji opis doprinosa koji su predmet zaštite intelektualnog vlasništva</p>

funkcijskim prostorima.

dan je u sekcijama 5.2 i 5.3.

5.2 Provođenje aktivnosti i ostvareni rezultati

Molimo Vas (za odgovarajući period izvještavanja):

- ukratko opišite provedene aktivnosti i specifične rezultate postignute nakon provođenja svake aktivnosti. Kako procjenjujete ostvarene rezultate? Koji su nepredviđeni pozitivni i negativni rezultati postignuti projektom?

- navedite je li se projekt provodio u skladu s prihvaćenim hodogramom aktivnosti?

- ako nije, navedite koje planirane aktivnosti nisu ostvarene. Nabrojite sve promjene u aktivnostima i rezultatima u odnosu na hodogram te objasnite razloge odstupanja.

- koji su faktori ugrozili planirani napredak projekta ili doveli do neprovođenja određenih aktivnosti? Kako ste riješili probleme u provođenju projekta? Je li bilo nekih drugih značajnih promjena u strategiji?

Aktivnost 1a): rijetkosti ograničeni algoritmi faktorizacije nenegativnih matrica.

Planirana aktivnost je izvršena. Detaljna usporedna analiza algoritama iz ove skupine prezentirana je u dodatku 1. Izabrani su algoritmi za rješenje linearnog pododređenog problema slijepog razdvajanja signala ograničenog nenegativnosti i rijetkosti izvornih signala. Ovi algoritmi se primjenjuju u sklopu rješenja nelinearnog problema slijepog razdvajanja signala nakon njegove transformacije u linearan problem u Hilbertovim funkcijskim prostorima s reprodukcijom jezgrama. Kôd u programskom jeziku MATLAB raspoloživ je na web stranici projekta: <http://www.lair.irb.hr/ikopriva/podaci.html>. Postignuti rezultati su u skladu sa očekivanjem. Za jako pododređene probleme slijepog razdvajanja signala, broj izvornih signala je znatno veći od broja smjesa (mjerenja), najbolji rezultati postižu se algoritmima regulariziranim aproksimacijom ℓ_0 kvazi-norme. Ipak kada sa porastom broja izvornih signala raste stupanj njihove koreliranosti (ovaj scenarij je realan u analizi spektara mase bioloških uzoraka) točnost izdvajanja izvornih signala značajno (drastično) pada. Radi se zapravo o vrlo teškom problemu za koji nisu razvijeni algoritmi. Tijekom prve godine projekta (kombinirajući ideje, iskustva i rezultate rada na aktivnostima 1a, 1b i 3) razvijen je originalan metodološki postupak za rješavanje linearnog pododređenog problema slijepog razdvajanja nenegativnih koreliranih signala. Postignuti rezultat koristi implicitna nelinearna preslikavanja nelinearnog problema u Hilbertov funkcijski prostor s reprodukcijom jezgrama i do jedne mjere je potpuno neočekivan: nelinearna transformacija linearnog problema slijepog razdvajanja signala povećava točnost metoda linearne faktorizacije unatoč faktorima (pogreškama) višeg reda koji se uvode transformacijom. No, ako izvorni signali imaju rijetke raspodjele po amplitudi i nezavisnoj koordinati (to je točno za čiste komponente / analite u spektrometriji mase) onda se greška uzrokovana faktorima višeg reda značajno smanjuje, te "nova" mjerenja generirana nelinearnom transformacijom doprinose poboljšanju točnosti faktorizacije. Dodatni značaj ovog rezultata je što "nadogradnja" razvijene analitičke tehnike omogućava razvoj i analizu točnosti metoda za rješavanje nelinearnog pododređenog problema slijepog razdvajanja signala, što je jedan od glavnih ciljeva projekta. Ostvareni rezultat objavljen je u znanstvenom radu:

I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, "Nonlinear Mixture-wise Expansion Approach to Underdetermined Blind

Separation of Nonnegative Dependent Sources," *Journal of Chemometrics*, vol. 27, str.189-197, 2013.

Čimbenik odjeka časopisa *Journal of Chemometrics* je 1.932 i prema *Journal Citation Report* klasifikaciji rangiran je na 14 mjestu od 117 časopisa u području vjerojatnosti i statistike (vodećih 12%). Rad je dostupan u dodatku projekta te na web stranici projekta: <http://www.lair.irb.hr/ikopriva/publikacije.html>.

Aktivnost 1b): algoritmi nelinearnog pododređenog slijepog razdvajanja signala sa naglaskom na eksplicitna i implicitna preslikavanja u Hilbertove funkcijske prostore.

Planirana aktivnost je izvršena. Odlaskom znanstvenog novaka Ante Jukića ovu aktivnost izvršio je voditelj projekta dr.sc. Ivica Kopriva. Detaljna usporedna analiza algoritama iz ove skupine prezentirana je u dodatku 2. Najvažniji zaključak je da algoritmi temeljeni na Hilbertovim prostorima sa reprodukcijom jezgama nemaju alternativu u rješavanju nelinearnog pododređenog problema slijepog razdvajanja signala sa nenegativnim i koreliranim izvornim signalima. Tijekom rada na projektu razvijeni su algoritmi za nelinearan pododređeni bezmemorijski problem slijepog razdvajanja signala u Hilbertovim funkcijskim prostorima inducirani eksplicitnim i implicitnim preslikavanjima. Algoritam temeljen na eksplicitnim preslikavanjima provjeren je na problemu demarkacije tumora mozga iz slike magnetske rezonance. Upotreba eksplicitnih preslikavanja u području nelinearne regresije i klasifikacije je gotovo u potpunosti ignorirana. To se opravdava velikom računskom složenosti modela u induciranom Hilbertovom prostoru koji može biti čak i beskonačno dimenzionalan. No, kada se tzv. aproksimativna eksplicitna preslikavanja niskog reda primjene na nisko-dimenzionalne uzorke (npr. slikovni elementi u RGB slici ili višespektralnoj slici magnetske rezonancije su elementi trodimenzionalnog prostora) uzorci u Hilbertovom prostoru su konačnih i relativno niskih dimenzija. To omogućava znatno točniju dekompoziciju (segmentaciju) takve slike što posebno dolazi do izražaja u scenarijima lošeg kontrasta među objektima prisutnim u slici.

Algoritmi temeljeni na implicitnim preslikavanjima ispitani su na dekompoziciji RGB slike neobojenih histoloških preparata tkiva jetre ljudi i miševa, te na izdvajanju čistih komponenata iz nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida. Iako su detaljna ispitivanja predviđena za drugu i treću godinu projekta, preliminarna ispitivanja na malom broju uzoraka provedena su ranije da se minimizira rizik od neuspjeha te da se u slučaju pozitivnih rezultata, što je postignuto u oba slučaja, što je moguće ranije pristupi zaštiti intelektualnog vlasništva (domaćim i međunarodnim patentnim prijavama). Računski učinkovita verzija algoritma rješava problem dekompozicije neobojene slike histološkog preparata za 6 do 8 minuta u programskom okruženju MATLAB (to je ekvivalentno vremenu od 20-ak sekundi nakon programski učinkovite implementacije na namjensko sklopovlje kao što su grafičke kartice). To ovu metodu čini konkurentnom za primjene u kliničkoj patologiji. Ovo postignuće omogućeno je neočekivanim teorijskim rezultatom koji pokazuje da se originalan nelinearan problem slijepog razdvajanja signala pod odgovarajućim ograničenjima koja su fizikalno/anatomski smisljena transformira u linearan problem u induciranom Hilbertovom prostoru sa istim originalnim izvornim signalima. Detalji vezani uz teoriju i navedene primjene ovih algoritama biti će javno dostupni nakon podnošenja patentnih prijava i objave rezultata u znanstvenim časopisima. Dopisom Upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2013. zatraženo je odobrenje prenamjene sredstava za podnošenje domaće i međunarodne patentne prijave u prvoj i drugoj godini projekta, a što je odobreno odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. MATLAB kôd algoritama za problem nelinearnog slijepog razdvajanja signala nalazi se kod voditelja projekta dr.sc. Ivica Koprive, Zavod za laserska i atomska istraživanja, Instituta Ruđer Bošković.

Jedna od prvih (računski neučinkovita) verzija implicitnih algoritama uspješno je primijenjena na demarkaciju organa kroz nenadziranu dekompoziciju 3D višefazne CT slike abdomena i višespektralne magnetsko rezonancijske slike mozga. U planu je da se, nakon podnošenja patentne prijave, tijekom 2014. godine ovi rezultati pošalju na recenziju u znanstvene časopise i konferencije.

Zaključno, faktorska analiza u induciranim Hilbertovim prostorima sa reproduksijskim jezgrama je područje važno za brojne primjene u analizi informacija i može rezultirati teorijski i praktično važnim otkrićima. To proizlazi iz mogućnosti da se nelinearni problemi u originalnom (empirijskom) prostoru uzoraka transformiraju u linearne probleme u induciranom Hilbertovom prostoru.

Aktivnost 2a): Priprema uzoraka humane jetre i izrada histoloških preparata. Do sada je prikupljeno 26 uzoraka humane jetre (parafinske kocke) opisanih s relevantnim kliničkim podacima, a izrada i dodatna obrada histoloških preparata iz parafinskih kocaka je ili završena ili je u tijeku u trenutku pisanja ovog izvještaja. U dodatku 3.1, detaljnije su opisani prikupljeni uzorci, procedura izrade histoloških preparata te njihova naknadna obrada. Parafinske kocke uzoraka humane jetre kao i mape histoloških preparata (dodatak 3.1, slike 1a i 1b) se nalaze u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković (Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija). Iako je radnim planom ispitivanje primjenjivosti algoritama za nenadziranu analizu slike histološkog preparata humane jetre predviđeno za drugu i treću godinu projekta, to je djelomično napravljeno ranije poradi preliminarnе provjere i smanjenja rizika od neuspjeha, te, u slučaju dobrog rezultata, podnošenja patentne prijave. U tu svrhu su obrađeni histološki uzorci jetre koji pripadaju različitim dijagnostičkim skupinama: pretilosti, metaboličkog sindroma i masne jetre. To znači da su pod svjetlosnim mikroskopom snimljena dva histološka preparata (dva reza) istog uzorka: jedan rez tkiva je obojan s H&E a drugi rez je bio neobojan i prije snimanja mikroskopom deparafiniziran (dodatak 3.1, slike 3a i 3b). Dobiven je pozitivan rezultat, tj. potvrđena je sposobnost algoritama da u neobojenoj slici uzorka razlikuju kako vakuole masti tako i druge strukture unutar tkiva jetre (krvne žile, infiltrate imunoloških stanica, jetreni parenhim, retikulin, itd.). Sa algoritmima kratko opisanim u aktivnostima 1a) i 1b) vrijeme obradbe u programskom okruženju MATLAB iznosi 6 do 8 minuta. Implementacija na specijaliziranom sklopovlju, kao što su grafičke kartice, ovo vrijeme može skratiti na 20-ak sekundi. To ove algoritme čini konkurentnima za primjene u kliničkoj patologiji jer eliminiraju potrebu bojanja tkiva kontrastnim reagensima i time skraćuju vrijeme potrebno za analizu („očitavanje“) uzorka. Iz tog razloga je dopisom Upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2013. zatraženo je odobrenje prenamjene sredstava za podnošenje domaće i međunarodne patentne prijave u drugoj godini projekta, što je i odobreno na sjednici Upravnog odbora od 22. listopada 2013. Rezultati (slike) nakon primjene algoritama na neobojane histološke preparate se nalaze u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković (Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija), odnosno Zavodu za laserska i atomska istraživanja i razvoj (dr.sc. Ivica Kopriva). Obradu slike algoritmima za nelinearno slijepo razdvajanje signala proveo je voditelj projekta dr.sc. Ivica Kopriva. Slike će biti javno dostupne nakon podnošenja patentnih prijava i objave rezultata u znanstvenim časopisima.

Aktivnost 2b): Uspostavljanje mišjeg modela masne jetre te izrada histoloških preparata. Animalni model masne jetre koji prati metabolički sindrom je uspješno uspostavljen prvo na miševima soja CBA (dodatak 3.2, slika 4) a potom i na miševima soja NOD (dodatak 3.3, slika 8), korištenjem visoko-kalorične hrane, kroz period od 20 tjedana. Pri tome treba naglasiti da je zastupljenost NOD miševa do trenutka podnošenja ovog izvješća bila manja, budući smo kupili tri para miševa od kojih je trebalo uspostaviti i održavati jezgru visoko-srođenih životinja, te razmnožiti jedinke koje se mogu iskoristiti u znanstvene svrhe. Stoga će određeni broj miševa soja NOD, biti tretiran u narednom razdoblju, a pogotovo su od velike važnosti jedinke koje spontano razvijaju šećernu bolest tipa 1. Naime, NOD miševi su specifični jer spontano razvijaju autoimuni dijabetes (Tip 1) i taj animalni model je znanstveno priznati model dijabetesa tipa 1 koji odgovara onom u ljudi.

Od miševa čiji tretman je završen su prikupljeni organi od interesa (dodatak 3.2, slika 5), te uklopljeni u parafinske kocke ili su odmah rezani na kriostatu. Histološki preparati tkiva su izrađeni (a neki čekaju izradu) i nalaze se u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković (Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija). Detaljan opis tretmana miševa (popraćen s odgovarajućim slikama), pohrane i obrade tkiva te izrade histoloških preparata opisan je u dodatku 3.2 i 3.3.

Iako je radnim planom ispitivanje primjenjivosti algoritama za nenadziranu analizu slike jetre miševa predviđeno za drugu i treću godinu projekta, to je djelomično napravljeno ranije zbog preliminarne provjere i smanjenja rizika od neuspjeha te, u slučaju dobrog rezultata, podnošenja patentne prijave. To znači, da smo svjetlosnim mikroskopom prvo snimili uzorak mišje jetre obojan s H&E, potom smo pod istim uvjetima snimili krio-rez jetre obojan sa specifičnom bojom za masti (Sudan 3) te napokon, snimili neobojani krio-rez iste jetre na koji su primijenjeni algoritmi za nenadziranu analizu slike (dodatak 3.2, slike 7a, 7b i 7c).

I u ovom slučaju je dobiven pozitivan rezultat, tj. potvrđena je sposobnost algoritama da u neobojenoj slici uzorka razlikuju kako masne vakuole tako i druge strukture unutar istog tkiva (krvne žile, jetreni parenhim, infiltrate imunoloških stanica). Sa algoritmima kratko opisanim u aktivnosti 1b) vrijeme obradbe u programskom okruženju MATLAB iznosi 6 do 8 minuta. Implementacija na specijaliziranom sklopovlju kao što su grafičke kartice ovo vrijeme može skratiti i na 20-ak sekundi. To ove algoritme čini konkurentnima za razne primjene u kliničkoj patologiji jer eliminiraju potrebu bojanja tkiva kontrastnim reagensima. Dopisom upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2013. zatraženo je odobrenje prenamjene sredstava za podnošenje domaće i međunarodne patentne prijave u drugoj godini projekta, a što je odobreno odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. Slike kao rezultat primjene algoritama na neobojane krio-rezove jetre miševa se nalaze u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplataciju, Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković (Marijana Popović-Hadžija, Mirko Hadžija), odnosno Zavodu za laserska i atomska istraživanja i razvoj (dr.sc. Ivica Kopriva). Obradu slike algoritmima za nelinearno slijepo razdvajanje signala proveo je voditelj projekta dr.sc. Ivica Kopriva. Slike će biti javno dostupne nakon podnošenja patentnih prijava i objave rezultata u znanstvenim časopisima.

Prvi pozitivni rezultati postignuti u aktivnostima 2a) i 2b) otvaraju nove mogućnosti (ideje) vezane uz kliničke primjene algoritama nelinearnog slijepog razdvajanja signala. U razgovorima sa konzultanticom na projektu dr. sc. Goranom Aralicom, dolazi se do spoznaja o mogućim primjenama vizualizacije bez uporabe kontrastnih reagensa u slučaju raznih vrsta tumora. To može dovesti do ubrzanja histoloških analiza (dijagnostike) tumora te pomoći operateru pri lokalizaciji i odstranjivanju tumorskog tkiva. S tim u vezi, sakupljeno je 11 uzoraka biopsije tkiva jetre s primarnim tumorima ili s metastazama. Analiza slike 2 neobojana uzorka s metastazama raka gušterače i raka debelog crijeva pokazala je sposobnost

algoritma da razlikuje metastazu od zdravog tkiva jetre. Također je analizom slike 2 neobojana uzorka s hepatocelularnim (primarnim) tumorom jetre pokazana sposobnost algoritma da razlikuje tumorsko od zdravog tkiva jetre.

Aktivnost 3): Preliminarno ispitivanje izdvajanja čistih komponenata iz nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida metodama nelinearnog slijepog razdvajanja signala u Hilbertovim funkcijskim prostorima. Ova aktivnost planirana je za drugu i treću godinu projekta zajedno sa nekoliko nelinearnih kemijskih reakcija. Provjera na nelinearnoj reakciji formiranja peptida provedena je, koristeći "unutarnje rezerve", da bi se minimizirali rizici i u slučaju pozitivnog rezultata, što je ostvareno, što je ranije moguće pristupilo podnošenju domaće i međunarodne patentne prijave. Prema najboljem saznanju voditelja projekta ovo je prva eksperimentalna demonstracija izdvajanja većeg broja (25) komponenata iz manjeg broja (do 9) spektara mase smjesa nekom od metoda nelinearnog slijepog razdvajanja signala. Sinteza nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida i snimanje spektara mase kemijskih smjesa provedena je u Laboratoriju za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković (Lidija Brkljačić i Ivanka Jerić). Dopisom Upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2103. zatražena je prenamjena sredstava za domaću i međunarodnu patentnu prijavu krajem prve godine projekta, što je odobreno odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. Spektri mase mješavina nelinearne kemijske reakcije, te spektri mase čistih komponenata nalaze se u navedenom Laboratoriju, odnosno kod voditelja projekta dr.sc. Ivice Koprive koji je proveo obradu spektara mase. Spektri mase će biti javno dostupni nakon podnošenja patentnih prijava i objave rezultata u znanstvenim časopisima. Detaljniji opis ove aktivnosti dan je u dodatku 4.

Zbog sve značajnije uloge spektrometrije mase u suvremenoj metabolomici i proteomici ostvareni rezultat može biti važan za primjenu u dijagnostici oboljenja, razvoju terapeutika te analizi toksičnosti. Na opisanoj problematici istraživanje je vrlo aktivno (npr. na europskoj konferenciji za obradbu signala u rujnu 2013. u Maroku plenarno predavanje profesora Christiana Juttena odnosilo se na temu primjene slijepog razdvajanja izvora u kemijskom inženjerstvu: <http://www.eusipco2013.org/Jutten.htm>). Nakon dodatnih ispitivanja na nelinearnim kemijskim reakcijama predviđenim tijekom druge i treće godine projekta planira se ispitivanje primjena razvijenih algoritama na biološkim uzorcima, a sa svrhom moguće detekcije biomarkera. Oko te ideje će se tijekom 2015. godine pokušati okupiti projektni tim za neki međunarodni projekat u okviru programa HORIZON 2020.

5.3 Inovativnost projekta

Je li je projekt do sada rezultirao novim otkrićem? Postoji li mogućnost da će projekt rezultirati novim otkrićem? Bi li projekt mogao rezultirati intelektualnim vlasništvom (patentom, žigom, industrijskim dizajnom i dr.)? Hoće li postojati mogućnost komercijalizacije rezultata projekta?

Projekt je rezultirao sa dva otkrića koja mogu rezultirati intelektualnim vlasništvom u obliku domaćih i međunarodnih patenata. Otkrića su slijedeća:

1. Algoritmi nelinearnog slijepog razdvajanja signala temeljeni na implicitnim preslikavanjima u Hilbertove funkcijske prostore ispitani su na problemu dekompozicije (segmentacije) RGB slike histoloških preparata jetre ljudi i laboratorijskih miševa koji nisu

bili tretirani kontrastnim reagensom. Potvrđena je sposobnost algoritama da u neobojenoj slici preparata razlikuju različite tkivne strukture (masne nakupine, krvne žile, jetreni parenhim, infiltrate stanica imunološkog sustava, ...) prisutne u organu jetre. Također je na 4 preparata jetre ljudi s primarnim i sekundarnim tumorom potvrđena sposobnost algoritama da razlikuju tumorsko od zdravog tkiva jetre. Sa kombinacijom algoritama kratko opisanim u aktivnostima 1a) i 1b) vrijeme obradbe u programskom okruženju MATLAB iznosi 6 do 8 minuta.

Implementacija na specijaliziranom sklopovlju kao što su grafičke kartice ovo vrijeme može skratiti na 20-ak sekundi. To ove algoritme čini konkurentnima za razne primjene u kliničkoj patologiji jer eliminiraju potrebu bojanja tkiva kontrastnim reagensima. Ovi rezultati otvaraju nove mogućnosti (ideje) vezane uz kliničke primjene algoritama nelinearnog slijepog razdvajanja signala. U razgovorima sa konzultanticom na projektu dr. sc. Goranom Aralicom, dolazi se do spoznaja o mogućim primjenama vizualizacije bez uporabe kontrastnih reagensa i na uzorke humane jetre s primarnim tumorom ili metastazama. To može dovesti do ubrzanja histoloških analiza (dijagnostike) prisutnosti tumora te pomoći operateru pri lokalizaciji i odstranjivanju tumorskog tkiva. Iz tih razloga dopisom Upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2103. zatraženo je odobrenje prenamjene sredstava za podnošenje domaće i međunarodne patentne prijave u drugoj godini projekta, a što je odobreno odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. Voditelj projekta dr. sc. Ivica Kopriva ima iskustvo u dobivanju US patenta na ovoj vrsti problematike:

I. Kopriva, *Method for real time tumour visualisation and demarcation by means of photodynamic diagnosis*, US Patent 8,224,427, 17. 7. 2012.

2. Algoritmi nelinearnog slijepog razdvajanja signala temeljeni na implicitnim preslikavanjima u Hilbertove funkcijske prostore ispitani su na problemu izdvajanja čistih komponenata (analita) iz spektara mase nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida. Nelinearan pododređeni problem slijepog razdvajanja signala sastojao se od 25 čistih komponenata (izvornih signala) i do 9 nelinearnih smjesa. Pri tome su čiste komponente bile međusobno korelirane. Prema najboljim saznanjima voditelja projekta ovako postavljen problem nije rješiv sa "state-of-the-art" algoritmima nelinearnog slijepog razdvajanja signala diskutiranim u dodatku 2. Odgovarajućom kombinacijom algoritama opisanih pod aktivnostima 1a) i 1b) izdvojene su čiste komponente i uspoređene sa originalnim komponentama. Postignut je slijedeći rezultat: (i) koristeći kriterij maksimalne korelacije originalne komponente su pridružene samo jednoj izdvojenoj komponenti; (ii) korelacija između izdvojenih komponenata i originalnih komponenata (koje čine biblioteku čistih komponenata) predstavlja mjeru povjerenja pri identifikaciji čistih komponenata. Od 25 čistih komponenata njih 21 je identificirano sa korelacijom većom od 0.5, njih 18 sa korelacijom većom od 0.6, te njih 10 s korelacijom većom od 0.7. Zbog sve značajnije uloge spektrometrije mase u suvremenoj metabolomici i proteomici ostvareni rezultat je važan za primjene u dijagnostici oboljenja, razvoju terapeutika te analizi toksičnosti. U kombinaciji sa bibliotekom spektara mase čistih komponenata (metabolita) opisani model izdvajanja čistih komponenata može biti koristan u izdvajanju biomarkera. To ga čini primjenjivim za programske pakete koji se koriste za tu namjenu. Iz tih razloga dopisom Upravnom odboru Zaklade od 9. kolovoza 2103. zatraženo je odobrenje prenamjene sredstava za podnošenje domaće i međunarodne patentne prijave krajem prve ili početkom druge godine projekta, a što je odobreno na sjednici Upravnog odbora od 22. listopada 2013. Voditelj projekta dr.sc. Ivica Kopriva i konzultantica na projektu dr.sc. Ivanka Jerić imaju iskustvo u dobivanju US patenta na problemu izdvajanja čistih komponenata iz spektara mase i spektara NMR linearnih smjesa:

I. Kopriva, I. Jerić, *Method of and system for blind extraction of more pure components than mixtures*

in 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry combining sparse component analysis and single component points, US Patent 8,165,373, 24. 4. 2012.

5.4 Financijska sredstva

Jesu li se financijska sredstva kojima je Zaklada podržala program trošila u skladu s predloženim i odobrenim proračunom? Ako nisu, navedite i objasnite razloge odstupanja.

Financijska sredstva su trošena sukladno odobrenom financijskom planu projekta. Po pojedinim stavkama, vidi financijsko izvješće, potrošen je iznos manji od predviđenog.

Razlozi za to su slijedeći:

1. Odlaskom znanstvenog novaka Ante Jukića oslobođena su sredstva odobrena za dodatak za rad na projektu : 10.150,00 KN preostalih u prvoj godini projekta, te po 13.150,00 KN predviđenih za drugu i treću godinu projekta (stavka 3.2 u prvoj verziji financijskog plana projekta). Dopisom od 9. kolovoza 2013. godine Upravnom odboru Zaklade zatražena je prenamjena sredstava od 10.150,00 KN za domaću i US patentnu prijavu rezultata opisanog u točki 2. u sekciji 5.3 (za to su sredstva bila predviđena u trećoj godini projekta u stavci 1.4). To je odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. godine odobreno pod stavkom 1.4. Obavijest o odluci dostavljena je 12. studenog 2013. godine. Kako je bilo nemoguće završiti proces patentne zaštite do kraja obračunskog razdoblja 30. studenog 2013. godine *molimo da se odobri prijenos sredstava u drugu godinu projekta* i da se stavka 1.4 financijskog plana u drugoj godini uveća sa 50.000,00 KN na 60.150,00 KN. Proces patentiranja je u tijeku i ta sredstva će biti utrošena najkasnije do kraja veljače 2014. godine.

2. Znanstveni novak Marko Filipović je 5. travnja 2013. godine doktorirao na Matematičkom odsjeku PMF-a, Sveučilišta u Zagrebu, te je sa Ministarstvom znanosti, obrazovanja i športa (MZOS) sklopio novi ugovor o radu u trajanju od 4 godine, a u statusu višeg asistenta. U vrijeme ugovaranja projekta nije bilo izvjesno da li će MZOS znanstvenim novacima koji doktoriraju produljiti ugovor o zaposlenju, pa je Zaklada u drugoj i trećoj godini projekta osigurala financiranje plaće u iznosu od 140.000,00 KN godišnje (stavka 2.1 u prvoj verziji financijskog plana projekta). Sukladno prethodnom predviđeni iznos neće biti potreban tijekom druge i treće godine projekta i o tome je dopisom od 9. kolovoza 2013. godine obaviješten Upravni odbor Zaklade. Odlukom Upravnog odbora od 22. listopada 2013. godine to je uvaženo u financijskom planu projekta.

3. U stavci 3.1 financijskog plana projekta preostao je iznos od 2.150,00 KN. Razlozi za to su slijedeći: (i) zbog nejasnog načina obračuna doprinosa, a da ne bi došlo do nenamjenskog trošenja dijela sredstava, voditelj projekta je odlučio da se iz stavke 3.1 isplaćuje maksimum od 1000 KN mjesečnog dodatka na plaću; (ii) kako je pretežiti dio srpnja 2013. godine bio potrošen na godišnji odmor voditelj projekta je odlučio da se za taj mjesec ne isplati dodatak na plaću.

4. U stavci 1.1 preostao je znatan (veći) dio financijskih sredstava u iznosu od 47.964,93 KN. Razlog je vezan uz proceduru kupnje tri para NOD miševa od *The Jackson Laboratory*, SAD. Iako je narudžba NOD miševa pokrenuta početkom prosinca 2012. godine to je realizirano tek početkom travnja 2013. godine jer se čekalo na raspoloživost miševa, transport i karantenu po dolasku u Zagreb. Time je, u odnosu na plan projekta, reprodukcijски ciklus pomaknut za četiri mjeseca. Slijedom toga, preostala financijska sredstva iz stavke 1.1. biti će iskorištena do ljeta 2014. godine za: (i) razmnožavanje i održavanje miševa soja NOD; (ii) selekciju odgovarajućih životinja za eksperiment; (iii) tretman životinja tijekom dužeg eksperimentalnog perioda i obradu animalnog modela (kako je detaljno opisano u dodatku 3); (iv) kupnju visokokalorične hrane, materijala i kemikalija za procesuiranje histoloških preparata. Sukladno navedenom, *molimo da se odobri prijenos sredstava u drugu godinu projekta* i da se stavka 1.1 financijskog plana u drugoj godini uveća sa 15.000,00 KN na 62.964,93 KN.

5. U stavci 7.1 financijskog plana projekta predviđeni iznos od 20.000 KN za sudjelovanje na znanstvenoj konferenciji iz područja obradbe signala nije potrošen iz slijedećih razloga: (i) s obzirom na početak projekta u prosincu 2012. godine nije bilo moguće ostvariti rezultate i prijaviti se za sudjelovanje na konferenciji do jeseni 2013. godine; (ii) procijenjeno je da bi objavljivanje preliminarnih rezultata na znanstvenoj konferenciji moglo ugroziti zaštitu intelektualnog vlasništva (patentiranje). Iz posljednjeg razloga prijava znanstvenog rada na neku od vodećih konferencija iz područja obradbe signala (slike) planira se nakon podnošenja patentnih prijava opisanih u sekciji 5.3 ovog izvještaja. Sukladno navedenom realno je očekivati sudjelovanje na znanstvenoj konferenciji krajem 2014. godine. Sukladno tome *molimo da se odobri prijenos ovih sredstava u drugu godinu projekta* i da se stavka 7.1 financijskog plana u drugoj godini uveća sa 0.00 KN na 20.000,00 KN.

5.5 Ostalo

Molimo vas dodajte informacije koje smatrate važnima i koje mogu pomoći Zakladi u vrednovanju projekta, a nisu predviđene ovim obrascem.

6. PREZENTACIJA REZULTATA PROJEKTA

6.1 Publikacije

Navedite popis svih publikacija, znanstvenih i popularnih, proizašlih iz projekta tijekom perioda izvještavanja (elektroničke i tiskane publikacije, s punom referencom).

***izvješću je potrebno priložiti sve nastale publikacije proizašle iz projekta koji je financirala Zaklada**

I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, "Nonlinear Mixture-wise Expansion Approach to Underdetermined Blind Separation of Nonnegative Dependent Sources," *Journal of Chemometrics*, vol. 27, str.189-197, 2013.

6.2 Diseminacija rezultata

Navedite na koji je način tijekom odgovarajućeg perioda izvještavanja provedena diseminacija rezultata u znanstvenoj zajednici i izvan nje (npr. kongresi, novinski članci, TV i radio izvješća...).

***izvješću priložiti sve nastale materijale vezane uz projekt koji je financirala Zaklada**

I. Kopriva, Javna prezentacija projekta Hrvatske Zaklade za znanost 9.01.232 "Analiza nelinearnih komponenata s primjenama u kemometriji i patologiji," 17. prosinac 2012, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska.

I. Kopriva, "Sparse component analysis - applications in multichannel medical imaging and bioinformatics," *2013 IEEE Signal Processing Society Summer School on Biomedical Image Processing and Analysis*, 9. lipnja 2013, Dubrovnik, Hrvatska (<https://sites.google.com/site/ssbipa2013/speakers>).

7. ZNAČAJ HRVATSKE ZAKLADE ZA ZNANOST (*samo za završno izvješće)

Specifični značaj Hrvatske zaklade za znanost

Na koji je način Zakladino financiranje unaprijedilo ciljeve projekta? Bi li isti ciljevi bili postignuti i bez financijske podrške Zaklade? Na koji je način za vrijeme trajanja projekta promican značaj Hrvatske zaklade za znanost?

8. ZAKLJUČAK PROJEKTA (*samo za završno izvješće)

Zaključak projekta

Jednostavan i razumljiv zaključak projekta.

9. PRILOZI

Izvješću je priloženo (nabrojati):

1. Dodatak 1: Rijetkošću ograničeni algoritmi faktorizacije nenegativnih matrica.
2. Dodatak 2: Algoritmi nelinearnog slijepog razdvajanja signala.
3. Dodatak 3: Prikupljanje i priprema uzoraka tkiva jetre ljudi i NOD miševa.
4. Dodatak 4: Sinteza i snimanje spektara mase nelinearne kemijske reakcije formiranja peptida.
5. Znanstveni rad (sa dodatkom): I. Kopriva, I. Jerić, L. Brkljačić, "Nonlinear Mixture-wise Expansion Approach to Underdetermined Blind Separation of Nonnegative Dependent Sources," *Journal of Chemometrics*, vol. 27, str.189-197, 2013.
6. Javna prezentacija projekta na Institutu Ruđer Bošković, 17. prosinca 2012. godine.
7. Predavanje "Sparse component analysis - applications in multichannel medical imaging and bioinformatics," na: *2013 IEEE Signal Processing Society Summer School on Biomedical Image Processing and Analysis*, 9. lipnja 2013, Dubrovnik, Hrvatska.

10. POTPISI

Datum i mjesto: 9. prosinca 2013., Zagreb

Čelnik ustanove

Voditelj
projekta

Dr. sc. Tome Antičić

Dr. sc. Ivica Kopriva





