



## ANALIZA SEKVENCI MIKROBIOMA KROZ *MOTHUR* TOK OBRADA

### ANALYSIS OF MICROBIOME SEQUENCES USING *MOTHUR*

Aleksandra Kantar, *Fakultet tehničkih nauka, Novi Sad*

#### Oblast – ELEKTROTEHNIKA I RAČUNARSTVO

**Kratak sadržaj** – U ovom radu analizirane su 16S rRNA sekvence mikrobioma kroz *Mothur* tok obrada radi naknadne klasifikacije uzoraka na osnovu utvrđenog taksonomskog sastava. Klasifikacija je vršena random forest algoritmom i postignuta je tačnost od 95,46%. Nakon prikaza i diskusije rezultata, rezultati su upoređeni sa prethodnim istraživanjima nad istim podacima.

**Ključne reči:** 16S rRNA, klasifikacija, mikrobiom, *Mothur*

**Abstract** – In this paper 16S rRNA microbiome sequences were analyzed using *Mothur* pipeline for their further classification based on the obtained taxonomic description. Classification is performed using random forest algorithm achieving accuracy of 95,46%. The results were discussed and compared with the previous findings from the literature.

**Keywords:** 16S rRNA, classification, microbiome, *Mothur*,

#### 1. UVOD

Neki od mikroba su veoma važni za zdravlje čoveka, dok su neki od njih izuzetno patogeni i predstavljaju uzrok raznih bolesti. Mikrobiom predstavlja ukupni genetski materijal mikroba prisutnih u ljudskom organizmu. Na svaki ljudski gen dolazi oko 100 gena mikroba, čime se objašnjava i značaj analize sprežavanja i uticaja na genetskom nivou [1]. Trenutno najzastupljenija tehnika za proučavanje mikrobiološkog diverziteta jeste sekvenciranje marker gena 16S rRNA kod prokariota ili 18S rRNA kod eukariota, s obzirom na to da su ovi geni visoko-očuvani u okviru vrste. Grupe mikrobioloških vrsta koje pokazuju određen nivo sličnosti predstavljaju OTU (*Operational Taxonomic Unit*) jedinice. OTU struktura pojedinačnih uzoraka grupiše se u tkz. OTU tabele, gde je za svaki uzorak naznačen kvantitet vrsta iz određene OTU jedinice. U slučaju kada postoji veliki broj uzoraka, OTU tabele su, po pravilu, retke.

U ovom radu se primenjuje *Mothur* [2] tok obrade podataka za analizu 16S rRNA sekvenci i utvrđivanje taksonomskog sadržaja uzoraka mikrobioma. U ovom postupku je kao referentna baza korišćena SILVA baza podataka, verzija 132 [3]. Na raspolagaju nije bio čitav genom, već samo 16S rRNA marker gen. Iako postoje ograničenja u korišćenju ovih sekvenci, kao što su nizak

stepen evolucije i manjak korelacije sa funkcijama organizma, nije se pojavio nijedan drugi marker koji se može naći u svim organizmima, koji ima nizak stepen rekombinacije gena i ima dovoljno genetskih informacija za razlikovanje vrlo srodnih organizama.

U ovom istraživanju korišćeni su podaci prikupljeni i analizirani u okviru studije „*Moving pictures of the human microbiome*“ [4] u kojoj su analizirani uzorci mikrobioma uzimani iz usta, creva i kože jednog muškarca i jedne žene u 396 vremenskih trenutaka, pri čemu je ukupno uzeto 1967 uzoraka. Prethodna istraživanja nad ovim skupom podataka, sem navedenog [4] koji analizira promene u taksonomskom sastavu obuhvatila su obradu podataka i formiranje OTU tabela u paketu QIIME [5], koji je funkcionalno sličan *Mothur*-u, ali sa izvesnim razlikama u predobradama i parametrima korišćenih algoritama, što može da proizvede i neke razlike u rezultatima [6]. Jedno istraživanje obuhvatilo je obradu podataka uz korišćenje SILVA, ali i *Greengenes* [7] referentne baze podataka, a zatim klasifikaciju *Random Forest* [8] klasifikatorom, dok je drugo istraživanje obuhvatilo klasterizaciju podataka nakon formiranja OTU tabele.

Cilj ovog istraživanja jeste izvršavanje sekvenciranja u *Mothur* toku obrada i upoređivanje rezultata klasifikacije podataka dobijenih na taj način i u QIIME paketu, kako bi se uočile eventualne razlike u performansama klasifikacije nad dobijenim OTU tabelama nakon ova dva postupka obrade, o čemu se vode debate u akademskoj zajednici [6].

#### 2. OPIS PODATAKA

U bazi podataka korišćenoj u ovom radu nalazi se oko 69 miliona sekvenci 16S rRNA gena, formiranih na osnovu 1967 uzoraka. Od žene je uzeto 135 uzoraka iz usta, 268 sa kože i 131 uzorak iz creva, a od muškarca 373 uzorka iz usta, 724 sa kože i 336 uzoraka iz creva. Podaci su preuzeti preko MG-RAST API servera nakon koraka za filtriranje i ukupna veličina skupa podataka iznosi oko 12 GB.

#### 3. METODOLOGIJA RADA

##### 3.1. *Mothur*

Za potrebe ovog istraživanja korišćen je operativni sistem *Bio-Linux* i *Mothur* softver, verzija 1.40.5. *Mothur* je trenutno najviše citiran alat za analizu 16S rRNA genetskih sekvenci, koji može da se primenjuje i na vrlo velikim setovima podataka. Ograničenje u vidu brzine izvršavanja komandi može biti raspoloživa količina RAM

#### NAPOMENA:

Ovaj rad proistekao je iz master rada čiji mentor je bila dr Tatjana Lončar Turukalo, vanr. prof.

memorije na računaru, a s obzirom na to da većina računara ima procesore sa više jezgara, brzina izvršavanja može se povećati paralelizacijom procesa.

Da bi se formirale OTU tabele, prethodno je vršena obrada sekvenci gena u *Mothur*-u. Originalni podaci dobijeni sa MG-RAST servera su *fna* tipa, što je jedan od tipova *fasta* formata koji sadrži sekvence nukleotida. Pre početka obrade, takođe je potrebno opredeliti se za referentnu bazu podataka za poravnanje sekvenci i klasifikaciju. U ovom radu izabrana je SILVA baza podataka [3].

Nakon preuzimanja podataka, potrebno je prebrojati sekvence, odrediti njihovu prosečnu dužinu, broj nedefinisanih nukleotida, itd. Posle toga treba očistiti skup uklanjanjem sekvenci koje ne zadovoljavaju određene kriterijume: dužina im je mnogo veća od proseka, sadrže nedefinisane nukleotide, imaju niz homopolimera većih od dužine koju korisnik zahteva i slično. Smanjivanjem broja sekvenci povećava se brzina dalje obrade podataka i smanjuje mogućnost greške pri obradi. Pošto su poravnanje i obrada zahtevni procesi u pogledu vremena i računarskih resursa, potrebno je utvrditi sve jedinstvene sekvence kako se njihova obrada ne bi višestruko ponavljala. Ovim se još više smanjuje broj sekvenci koje se u nastavku obrađuju. Posle navedenog sređivanja sekvenci, neophodno je uraditi njihovo poravnanje.

U bioinformatički, poravnanje je vrlo važno i svrha poravnanja je višestruka. Istraživači mogu otkriti funkciju novih sekvenci gena vršenjem poravnanja sa sekvencama koje već postoje u bazama podataka, mogu izvući zaključke o sličnosti sekvenci gena kod različitih bliskih vrsta tokom evolucije, ili naći strukturno ili funkcionalno slične regione gena u proteinima. Poravnanje sekvenci je procedura poređenja para sekvenci traženjem niza karaktera ili obrazaca koji se pojavljuju istim redosledom u sekvencama. Mogu se porediti i više od dve sekvence istovremeno, i ovaj proces može biti globalni ili lokalni.

Posle poravnanja, potrebno je proveriti da li se sve sekvence nalaze u određenom regionu i da li su sve one iste dužine. To se vrši pomoću filtriranja, a, pošto *Mothur* prilikom poravnanja ubacuje prazna mesta ili tačke radi označavanja umetnutih ili obrisanih nukleotida, ti karakteri se u ovom koraku odstranjuju, radi prevencije grešaka. Ovim uklanjanjem se znatno smanjuje dužina sekvenci. Dalje se klasteruju sekvence po principu sličnosti, recimo radi se grupisanje onih sekvenci koje se međusobno razlikuju za najviše dva nukleotida. Himerne sekvence sastoje se od dela jedne sekvence i dela druge, tako da izgledaju kao jedinstvene sekvence, ali nisu dobre za dalju analizu, tako da, ako je sekvenca identifikovana kao himerna u nekom uzorku, uklanja se iz svih uzoraka u kojima se nalazi, što je primenjeno i u ovom istraživanju. Ovim korakom se ponovo vrši redukcija broja sekvenci u skupu podataka, ali je potrebno još proveriti da li i dalje postoje nepoželjne sekvence nakon svih prethodno navedenih koraka. U zavisnosti od cilja i teme istraživanja, istraživači mogu želeći da dobiju samo određene vrste za dalju analizu, tako da se izvršava klasifikacija sekvenci korišćenjem referentne baze, i nakon toga mogu se ukloniti one vrste koje nisu od

značaja za istraživanje. Posle ovoga sekvence bi trebalo da se sekvence dodele OTU jedinicama na osnovu taksonomije, pri čemu je potrebno definisati i procenat sličnosti. U ovom istraživanju procenat sličnosti je 97%, što odgovara vrsti, dok, na primer, 90% sličnosti odgovara familiji. Kada se sekvence dodele OTU jedinicama, formira se OTU tabela koja za svaki uzorak ukazuje na broj sekvenci iz svake OTU.

### 3.2. Klasifikacija

Klasifikacija nekog uzorka zasniva se na pronalaženju sličnosti sa unapred određenim uzorcima koji su pripadnici različitih klasa, pri čemu se sličnost dva uzorka određuje analizom njihovih karakteristika. Pri klasifikaciji se svaki uzorak svrstava u neku od klasa sa određenom tačnošću, a algoritam uči na osnovu već poznatih klasifikacija i na taj način se gradi skup pravila na osnovu kojih će se kasnije vršiti klasifikacija novih uzoraka.

*Random Forest (RF)* klasifikator je ansambalski klasifikator zasnovan na ansamblu stabala odlučivanja. Osnovna ideja ansambalske klasifikacije je da se, umesto jednog klasifikatora, kombinuje više pojedinačnih klasifikatora slabijih performansi. Svaki od klasifikatora izvodi klasifikaciju nezavisno od ostalih, tako da se, na kraju, uzorku dodeljuje ona klasa koju je izabralo najviše klasifikatora. U slučaju *RF* algoritma, ansambl se formira od stabala odlučivanja, pri čemu se broj stabala povećava dok se tačnost klasifikacije ne ustali. Svako stablo odlučivanja generiše se na isti način po određenom algoritmu, ali se svako stablo trenira korišćenjem drugačijeg butstrep skupa uzoraka. Označimo sa  $N$  broj uzoraka, a ukupan broj varijabli, odnosno atributa označimo sa  $M$ . Butstrep trening skup ima istu veličinu kao originalni skup, a formira se tako što se iz originalnog skupa podataka na slučajan način odabere  $N$  uzoraka sa vraćanjem. Na ovaj način oko  $1/3$  uzoraka ne bude uključena u treniranje svakog od stabala [9]. Da bi se stabla dekorelirala uvodi se dodatno ograničenje – u svakom čvoru odlučivanja na slučaj se bira  $m$  od  $M$  varijabli koje utiču na odlučivanje u tom čvoru stabla, pri čemu je  $m \ll M$ . Prilikom generisanja stabala, broj  $m$  je konstantan.

Istraživanja su pokazala da stepen greške *RF* klasifikatora zavisi od korelacije između stabala u ansamblu tako što povećanje korelacije utiče na povećanje greške klasifikatora. Ovaj problem rešava se donekle slučajnim odabirom malog podskupa obeležja prilikom odlučivanja u svakom čvoru. Na grešku utiče i tačnost klasifikacije svakog pojedinačnog stabla. Stablo odluke sa vrlo malom greškom predstavlja dobar (jak) klasifikator, što doprinosi smanjenju ukupne greške klasifikacije na osnovu ansambla. Redukcijom parametra  $m$  i slučajnim izborom obeležja redukuje se korelacija, ali i tačnost klasifikatora, dok povećanje ovog parametra utiče na povećanje korelacije i tačnosti, pa stoga treba izabrati optimalnu vrednost  $m$  koja je kompromis između dekorelacije stabala u ansamblu i njihove pojedinačne tačnosti. Optimalna vrednost  $m$  može se naći uz pomoć *OOB (out-of-bag)* greške. Kada se, radi generisanja stabala, iz trening skupa uzimaju uzorci sa vraćanjem, otprilike jedna trećina uzoraka se ne koristi, odnosno nije uzeta za

generisanje stabala [9]. Ovi *OOB* podaci koriste se za izračunavanje procene greške klasifikacije svakog stabla odluke. Nakon formiranja stabla, kroz njega se puštaju svi *OOB* podaci kao test. Potom se za svaki uzorak bira klasa koja je dobila najviše glasova od stabala za koje je uzorak bio *OOB*. Odnos broja puta kada izabrana klasa *j* nije jednaka pravoj klasi za sve uzorke i ukupnog broja klasifikacija (tj. broja uzoraka) daje *OOB* procenu greške.

Prednosti *RF* klasifikatora su velika tačnost čak i kod velikih skupova podataka i velikog broja klasa, zadržava određenu tačnost i kada nedostaje deo podataka, može davati procene koje varijable su važne za klasifikaciju, ne dolazi do prilagođenja podacima (*overfitting*), itd. Jedna od njegovih mana jeste vremenska složenost u odnosu na jednostavnije klasifikatore.

Tačnost klasifikacije predstavljena je pomoću matrica konzistencije. Matrica konzistencije jeste matrica čije vrste označavaju originalne klase uzoraka, kojih ima šest, a kolone predstavljaju klase koje je algoritam prepoznao i u koje je smestio uzorke. Na osnovu ove matrice može se videti kako rezultat klasifikacije odgovara stvarnim klasama.

U ovom istraživanju korišćena je implementacija *Random Forest* klasifikatora iz programskog jezika *Python*. Za procenu tačnosti klasifikacije korišćena je funkcija *accuracy\_score* iz *scikit* biblioteke u *Python*-u.

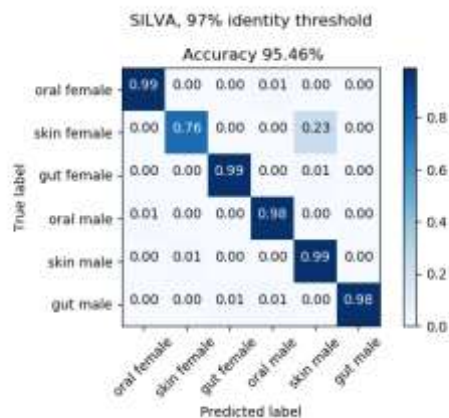
#### 4. REZULTATI

Radi dobijanja OTU tabele, izvršena je obrada podataka u *Mothur* toku. Taj proces je bio vremenski i računarski veoma zahtevan. S obzirom na to da *Mothur* na osnovu ulaznih podataka generiše fajlove koji mogu biti veoma veliki, osnovni preduslov za implementaciju je dovoljno RAM memorije, a poželjno je imati i više procesora radi paralelizacije procesa. Za potrebe ovog istraživanja računarski resursi obuhvatali su 32 GB RAM memorije, 16 procesora i oko 1 TB mesta na hard disku. Neki algoritmi su zahtevali više vremena i računarskih resursa, a neki manje, u zavisnosti od kompleksnosti. Računarski i memorijski najzahtevnija bila je procedura računa udaljenosti između sekvenci i formiranja matrice udaljenosti, u kojoj se sekvence dodeljuju OTU jedinicama. Drugo „usko grlo“ ove obrade bio je lošiji kvalitet samih podataka, pa su, u toku obrade, neki uzorci morali biti izostavljeni iz skupa za dalju obradu. Izostavljeno je ukupno 74 uzorka od postojećih 1967, svodeći broj uzoraka na 1893.

Dobijena OTU tabela sa zahtevanih 97% sličnosti radi svrstavanja sekvenci u OTU jedinice ima dimenzije 1893 x 1149. U vrstama su smešteni uzorci, dok su u kolonama OTU jedinice, a u samoj tabeli broj sekvenci dodeljen svakoj od OTU jedinica. OTU tabela je retka, odnosno u uzorcima nisu prisutne sve OTU jedinice, već obično neki manji podskup. Najmanji broj sekvenci imaju uzorci uzeti sa kože žene, a najveći uzorci uzeti iz creva muškarca.

*Random Forest* klasifikacijom dobijene su matrice konzistencije i određena je tačnost dodele uzoraka odgovarajućim klasama. Parametar koji je variran jeste broj stabala u klasifikatoru, odnosno veličina ansambla. Tačnost dodele uzoraka klasama dobijena prilikom

promene ovog parametra varira od 94,98% za 80 stabala do 95,46% za 100 stabala. Veći broj stabala u klasifikatoru (150, 200) daje rezultate u navedenom intervalu, tako da povećanje broja stabala iznad 100 nema uticaja na poboljšanje tačnosti klasifikatora, stoga je izabrana veličina ansambla od 100 stabala. Na slici 1. prikazana je normalizovana matrica konzistencije dobijena nakon klasifikacije *RF* klasifikatorom sa 100 stabala.



Slika 1. Normalizovana matrica konzistencije, 100 stabala

Ukupna tačnost dodele uzoraka odgovarajućim klasama iznosi 95,46%. Uzorci iz svake klase su uglavnom u potpunosti raspodeljeni u odgovarajuću klasu. Veća odstupanja mogu se primetiti u slučaju klase čiji su uzorci sa kože žene. Sa gotovo potpunom tačnošću, gde je svega po jedan uzorak netačno raspoređen, raspoređeni su uzorci uzeti iz creva i usta žene. Iako je iz klase sa uzorcima iz usta muškarca izbačeno čak 60 uzoraka, rezultati za ovu klasu su veoma dobri, tako da manjak uzoraka nije uticao na tačnost klasifikacije.

Variranjem broja stabala utvrđeno je da su svi uzorci manje ili više dobro klasifikovani, osim u slučaju klase uzoraka sa kože žene, gde je uvek bio najveći broj pogrešno klasifikovanih uzoraka u klasu uzoraka sa kože muškarca. Uzrok pogrešne klasifikacije uzoraka sa kože žene u klasu uzoraka sa kože muškarca (a značajno manje obrnuto) je verovatno usled višestruko većeg broja uzoraka u klasi kože muškarca, čime ove nejednake apriorne verovatnoće utiču na pomeranje granice odlučivanja. Dodatno, koža je najviše izložena mešanju mikroba sa mikrobima iz sredine, što može biti dodatni uzrok pogrešne klasifikacije. Najbolji rezultati u sva četiri slučaja dobijeni su za klase uzoraka iz usta i creva žene, gde je samo po jedan uzorak pogrešno klasifikovan kao uzorak klase usta muškarca, odnosno kože muškarca, respektivno.

Formirana OTU tabela sa 97% sličnosti korišćena je za konsenzus klasterovanje uzoraka u šest klastera. Ansambl klasterovanja formiran je korišćenjem particija spektralnog klasterovanja nad matricama sličnosti dobijenim sa 24 različite metrike. Konsenzus particija je na kraju dobijena hijerarhijskim klasterovanjem sa *ward* merom povezivanja nad novom matricom sličnosti dobijenom na osnovu ansambla [10]. Rezultati konsenzus klasterovanja ukazuju na veoma dobro grupisanje ovih

podataka – dobijena je vrednost 0.61 za *Adjusted Rand Index*, odnosno indeks za validaciju klasterovanja koji predstavlja meru sličnosti između dve particije. Sličnost sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju je u lošijem grupisanju uzoraka sa kože, s tim što su klasterovanjem i uzorci sa kože muškarca u velikom broju raspoređeni pogrešno. Potpuna tačnost dobijena je za uzorke iz klase usta žene i creva žene. Može se zaključiti da je primenjenim klasterovanjem dobijena lošija raspodela uzoraka i samim tim manja ukupna tačnost nego prilikom klasifikacije.

Drugo istraživanje [11] zasnovano je, takođe, na analizi tabele formirane u QIIME paketu i klasifikaciju pomoću *Random Forest* klasifikatora. U ovom slučaju, uzorci koji pripadaju klasi kože žene raspoređeni su u odgovarajuću klasu sa manjom tačnošću od ostalih. Za razliku od rezultata dobijenih obradom podataka u *Mothur*-u, za klasu usta žene klasifikacija svih uzoraka je dala tačan rezultat, odnosno nije bilo uzoraka iz ove klase koji su netačno klasifikovani. Tačnost dodeljivanja uzoraka iz određene klase u odgovarajuću klasu, kao i ukupna tačnost u ovim podacima malo je veća nego tačnost dobijena obradom podataka u *Mothur*-u i iznosi 96,29%. OTU tabela dobijena obradom u QIIME paketu bila je dimenzija 1967 x 50963. Može se zaključiti da je obrada podataka u QIIME paketu uz klasifikaciju uzoraka dala za nijansu bolje rezultate od obrade u *Mothur*-u.

Očigledno je da nelinearnost koja se unosi prilikom klasifikacije podataka doprinosi većoj tačnosti. Sa druge strane, algoritmi nenadgledanog učenja su od važnosti s obzirom na sve manji broj labeliranih podataka naspram dostupnih podataka generisanih naprednim tehnolojijama. Unapređenje tačnosti grupisanja uzoraka u nenadgledanom scenariju je stoga od interesa ne samo u oblasti računarske biologije, već i uopšte.

## 5. ZAKLJUČAK

Rezultati istraživanja ukazali su na uska grla u resursima raspoloživim za ovu analizu. Iako se *Mothur* paket oslanja na C++ i ostvaruje značajne uštede u vremenu, složenost realizovanih algoritama iziskuje i vremenske i računarske resurse. Rezultati klasifikacije uzoraka pokazali su da je *Random Forest* dobar izbor za ovu vrstu problema i da daje bolje rezultate od konsenzus klasterovanja korišćenog u drugom istraživanju. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da obrada ovih podataka u različitim paketima – *Mothur* i QIIME, kao i veličina OTU tabele, odnosno broj OTU jedinica, nije uticao na postignutu tačnost klasifikacije, ali da izvesna razlika postoji jer se greške klasifikacije nisu javljale na uzorcima istog staništa. Utvrđeno je da optimalan broj stabala *RF* klasifikatora iznosi 100, a najbolji rezultati prilikom klasifikacije dobijeni su za uzorke iz klase koža kod žena, za koju je pokazano i da ima najmanji ukupan

broj sekvenci koje joj pripadaju. S druge strane, uzorci iz klase usta i creva žene imaju najvišu tačnost prilikom klasifikacije. Buduća istraživanja mogla bi obuhvatiti formiranje OTU tabela sa različitim stepenom sličnosti među sekvencama, kao i korišćenje drugih klasifikatora i algoritama za klasterovanje.

## 6. LITERATURA

- [1] J. Qin, et al., "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing," *nature*, 464.7285: 59, 2010.
- [2] P. D. Schloss, et al. "Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities", *Applied and environmental microbiology* 75.23, p.7537-7541, 2009.
- [3] <https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/> (pristupljeno u septembru 2018.)
- [4] J. G. Caporaso, C. L. Lauber, E. K. Costello, D. Berg-Lyons, A. Gonzalez, J. Stombaugh, D. Knights, P. Gajer, J. Ravel, N. Fierer et al., "Moving pictures of the human microbiome," *Genome Biol*, vol. 12, no. 5, 2011.
- [5] <http://qiime.org/> (pristupljeno u septembru 2018.)
- [6] E. Plummer, et al., "A comparison of three bioinformatics pipelines for the analysis of preterm gut microbiota using 16S rRNA gene sequencing data," *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 8.12: 283, 2015.
- [7] <http://greengenes.secondgenome.com/> (pristupljeno u oktobru 2018.)
- [8] T. K. Ho, "Random decision forests," Document analysis and recognition, proceedings of the third international conference on. vol. 1. IEEE, 1995.
- [9] G. James, et al., "An introduction to statistical learning," New York: springer, 2013.
- [10] D. Pavlović, "Stabilna procena klastera konsenzus klasterovanjem uzoraka mikrobioma", Diplomski rad, Fakultet tehničkih nauka, Novi Sad, 2017.
- [11] S. Brdar, T. Lončar-Turukalo, V. Crnojević, B. Stres, "Clustering and classification of human microbiome data: evaluating impact of different settings in bioinformatics workflows," Book of Abstracts of the second Belgrade Bioinformatics Conference – BelBi 2018, in *Biologia Serbica*, vol. 40, No1, 2018, pp. 67 Belgrade, June, 18-22, 2018.

### Kratka biografija:



**Aleksandra Kantar** rođena je u Kikindi 1994. god. Master rad na Fakultetu tehničkih nauka iz oblasti Elektrotehnike i računarstva – Obrada signala odbranila je 2018.god. kontakt: [kantar.alex@gmail.com](mailto:kantar.alex@gmail.com)