

# Оптическая визуализация и контроль выведения тераностических флуоресцентных нанокompозитов из организма с помощью искусственных нейронных сетей

К.А. Лаптинский<sup>1,2</sup>, С.А. Буриков<sup>1,2</sup>, С.А. Доленко<sup>2</sup>, И.В. Исаев<sup>2</sup>, Н. Прабахар<sup>3</sup>, Дж.М. Розенхольм<sup>3</sup>, О.Э. Сарманова<sup>1</sup>, Т.А. Доленко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова, Ленинские горы, 1 строение 2, Москва, Россия, 119991

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцина, Московский Государственный университет им. М.В.Ломоносова, Ленинские горы, 1 строение 2, Москва, Россия, 119991

<sup>3</sup>Факультет естественных наук, Университет Або Академи, Турку, Финляндия

**Аннотация.** В данной работе представлены результаты применения искусственных нейронных сетей для решения задачи контроля выведения из организма нанокompозитов-носителей лекарств и их компонентов по спектрам флуоресценции. Была смоделирована ситуация выведения с уриной нанокompозитов, состоящих из флуоресцирующих углеродных точек, покрытых сополимерами и лигандами фолиевой кислоты, и их компонентов и решена задача классификации всех наночастиц. При решении указанной задачи использовались различные архитектуры нейронных сетей, а также проводилась компрессия входных признаков: по кросс-корреляции, по кросс-энтропии, по стандартному отклонению, с помощью анализа весов нейронной сети. Получено, что наилучшие результаты классификации нанокompозитов и их компонентов в моче обеспечивает перцептрон с 8 нейронами в единственном скрытом слое, обученный на наборе существенных входных признаков, выделенных с помощью кросс-корреляции. Процент правильного распознавания, усредненный по всевозможным пяти классам наночастиц, составляет 75,8%.

## 1. Введение

Согласно статистике международного агентства по исследованию рака GLOBOCAN сейчас ежегодно диагностируют рак у 13-14 млн человек в мире. При этом каждый год от онкологических заболеваний умирает свыше 8 млн человек [1]. Причинами такой высокой смертности являются поздняя диагностика рака, а также не очень высокая эффективность распространенных раковых лекарств, обусловленная плохим проникновением их в опухолевые клетки и негативным влиянием на здоровые биологические ткани. [2]. При агрессивной терапии опухолей аспект адресной доставки высокотоксичных онкологических лекарственных препаратов приобретает особое значение. Эти факты обуславливают необходимость создания принципиально новых лекарственных средств - тераностических наноагентов, способных одновременно применяться и для диагностики, и для лечения заболеваний [3]. Такие агенты могут одновременно выполнять в организме следующие функции: 1) по изменению своих флуоресцентных свойств определять больные ткани; 2) после загрузки их поверхности

лекарственными препаратами осуществлять адресную доставку этих лекарств, препятствуя попаданию их в здоровые ткани; 3) контролировать локализацию лекарств в организме на клеточном уровне по спектрам флуоресценции агентов. Благодаря способности к стабильной флуоресценции, возможности целенаправленной функционализации поверхности и иммобилизации лекарственных средств на ней, нетоксичности и высокой биосовместимости углеродные наночастицы лучше многих других наночастиц подходят для таких применений в наномедицине [3,4].

Сама концепция применения тераностических наноагентов подразумевает возможность контроля движения наночастиц в биологической системе, контроля распределения лекарств, контроля выведения из организма наноагентов и их компонентов. Поэтому одной из основных задач наномедицины является развитие чувствительных методов визуализации тераностических наноагентов в биологических тканях.

В настоящее время одной из наиболее распространенных в медицине является оптическая визуализация [5], которая основывается на использовании оптических свойств наночастиц, в первую очередь, их люминесцентных свойств. Поэтому особое внимание уделяется разработке носителей лекарств, обладающих интенсивными и стабильными люминесцентными свойствами. В этом случае носители и прикрепленные к ним лекарства будут одновременно выполнять функции люминесцентных биомаркеров и носителей лекарственных препаратов. Очевидно, что такие тераностические наноагенты должны быть биосовместимыми и нетоксичными. Современные тераностические агенты представляют собой многослойные наноконструкты [6-9], состоящие из углеродной наночастицы-носителя, обладающей интенсивной люминесценцией и покрытой синтетическим [6,7] или биологическим полимером [8], мезопористым оксидом кремния [9] и т.д., к которым прикреплено лекарство.

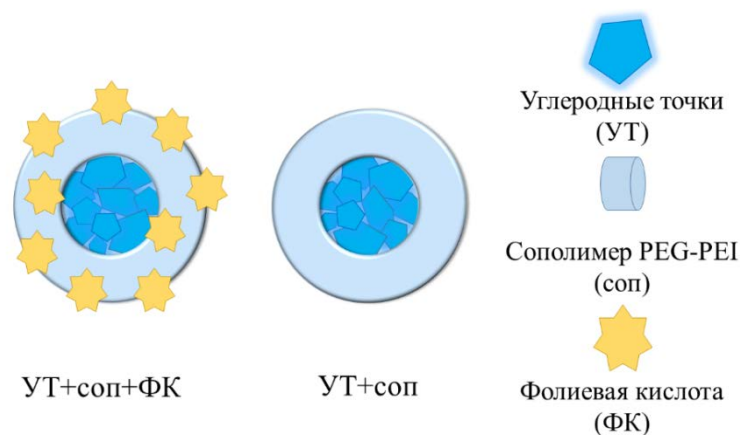
При разработке таких тераностических наноагентов необходимо уделять внимание контролю выведения их и их компонентов из организма. В данной работе предлагается новый метод мониторинга в человеческой моче выведенных наноконструктов и их компонентов по спектрам флуоресценции посредством метода классификации с помощью искусственных нейронных сетей. Серьезной проблемой при этом является выделение флуоресценции наночастиц на фоне флуоресценции биологической ткани. Спектр аутофлуоресценции занимает диапазон от 250 нм до 700 нм и является результатом наложения полос флуоресценции большого количества таких тканевых флуорофоров как триптофан, фенилаланин, тирозин, коллаген и др. [10]. К сожалению, полосы люминесценции углеродных наночастиц перекрываются с полосой аутофлуоресценции, что существенно затрудняет наблюдение за протекающими процессами и движением люминесцирующих наночастиц *in vivo*. Поэтому в данном случае задача оптической визуализации углеродных наноконструктов в биоткани заключается в разработке эффективных методов выделения их флуоресценции на фоне аутофлуоресценции урины. Ранее нами были успешно решены задачи регрессии – распознавания и определения содержания наноалмазов и углеродных точек в яичном белке [11] и в человеческой моче [12] с применением искусственных нейронных сетей (ИНС). В работах [11,12] было показано, что ИНС позволяют распознавать флуоресценцию детонационных наноалмазов и углеродных точек на фоне аутофлуоресценции яичного белка и урины и определять концентрацию наноалмазов в этих биообъектах с достаточно высокой точностью – не хуже 0.002 мг/мл [12], а углеродных точек в яичном белке – с точностью 0.004 мг/мл [11].

В данной работе предложен метод оптической визуализации в биоткани новых тераностических наноагентов, которые одновременно могут использоваться в качестве флуоресцентных маркеров и носителей лекарственных препаратов. В качестве таких тераностических наноагентов использовались наноконструкты, состоящие из углеродных точек (УТ), покрытых сополимером (соп) и фолиевой кислотой (ФК). В рамках предложенного подхода решалась задача мониторинга выведения вместе с мочой наноконструктов и продуктов их распада в организме. Для этого использовались методы лазерной спектроскопии и обработка данных с помощью искусственных нейронных сетей.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Материалы

В работе использовались наноконпозиты УТ+соп+ФК – углеродные точки, покрытые сополимером полиэтиленгликолем (PEG) и полиэтиленимином (PEI) с прикрепленной к нему фолиевой кислотой (рисунок 1) [7]. Как известно, фолиевая кислота необходима организму для развития и роста новых клеток, в том числе, онкологических [13]. Поэтому в опухоли происходит экспрессия рецепторов фолатов, в результате чего опухоли активно «забирают» из организма свободную фолиевую кислоту, которую используют для своего роста [13]. В связи с этим в качестве терапии используют такие лиганды фолиевой кислоты, которые блокируют экспрессию рецепторов фолатов и прекращают отток фолиевой кислоты из организма на рост опухоли. Именно такие лиганды были прикреплены к поверхности наноконпозитов [7]. Синтез и свойства образцов УТ+соп+ФК подробно описаны в публикации [7].

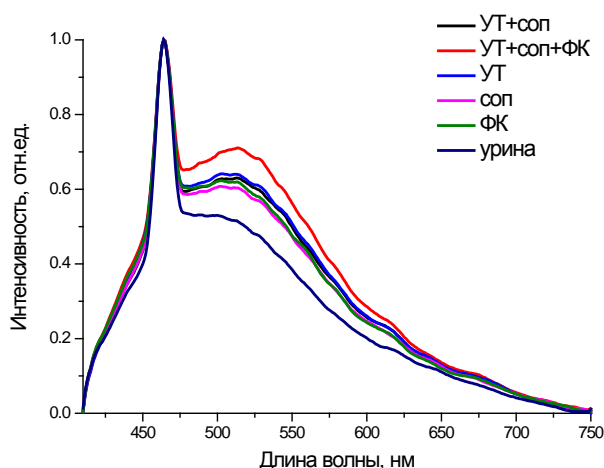


**Рисунок 1.** Схематическое представление структуры синтезированного наноконпозита на основе углеродных наночастиц.

При введении наноконпозитов УТ+соп+ФК для тераностики опухолей в организме возможны следующие ситуации: 1) наноконпозит не отдал лекарство и выводится в неизменном виде; 2) наноконпозит отдал со своей поверхности фолиевую кислоту, и выводится компонент УТ+соп; 3) от наноконпозита отделились лекарство и сополимер, выводится УТ; 4) выводятся отдельно отделившийся сополимер и излишек фолиевой кислоты. Таким образом, в урине возможно наличие следующих 5 классов веществ: УТ+соп+ФК, УТ+соп, УТ, соп и ФК. В работе моделировались образцы со всеми возможными сочетаниями указанных классов наноконпозитов и их компонентов в уринах от двух различных доноров в возрасте от 18 до 25 лет. Были приготовлены суспензии 32 сочетаний компонентов в урине в диапазоне концентраций каждого компонента от 2.1 мг/л до 2.7 мг/л.

### 2.2. Флуориметрия

Экспериментально были получены спектры флуоресценции всех приготовленных суспензий наноконпозитов и их компонентов в урине. Для возбуждения флуоресценции использовался диодный лазер с длиной волны 405 нм и мощностью 50 мВт. Система регистрации состояла из монохроматора Acton (решетка 1800 штрихов/мм, фокальное расстояние 500 мм) и ФЭУ (Hamamatsu, H-8259-01). Спектры флуоресценции регистрировались в диапазоне 410-750 нм. Каждый спектр состоял из 341 канала/частоты. Обработка спектров заключалась в вычитании пьедестала, обусловленного упругим рассеянием света, и нормировке спектров на площадь валентных колебаний ОН комбинационного рассеяния света. На рисунке 2 приведены экспериментально полученные спектры флуоресценции урины и всех рассматриваемых классов компонентов. Всего было получено 248 спектров флуоресценции – 2 серии по 124 спектра для одних и тех же сочетаний компонентов с одними и теми же концентрациями в уринах от двух доноров.

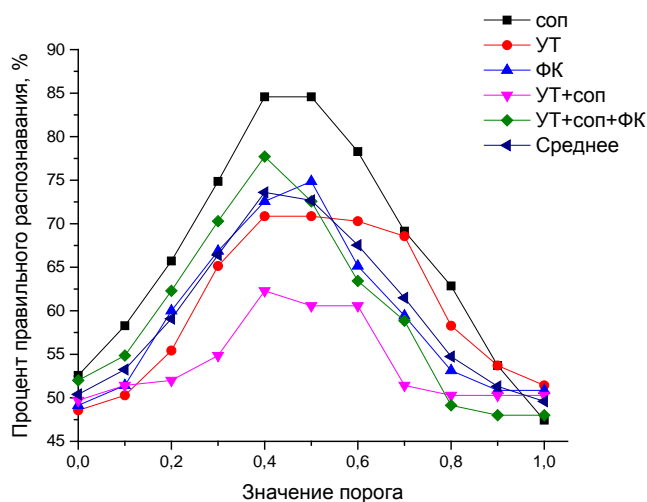


**Рисунок 2.** Спектры флуоресценции урины и суспензий нанокмпозитов и их компонентов в урине. Концентрация 2.7 мг/л. Для наглядности на данном рисунке спектры нормированы на максимум.

### 3. Результаты

Задача мониторинга выведения нанокмпозитов и продуктов их распада в организме сводилась к определению качественного состава суспензии нанокмпозитов в урине по спектру флуоресценции. При этом каждый компонент суспензии мог присутствовать в урине независимо от остальных. Таким образом, в настоящей работе решалась задача многозначной классификации (multi-label classification).

Для ее решения в настоящей работе использовалась такая архитектура ИНС, как многослойный персептрон (МСП). При этом все рассматриваемые ИНС имели по 5 выходов, соответствующих каждому из пяти компонентов: УТ+соп+ФК, УТ+соп, УТ, соп и ФК. Каждый выход решал задачу бинарной классификации для соответствующего компонента. При этом в качестве желаемого ответа сети на каждом выходе ожидалось значение “1”, если соответствующий компонент присутствовал, и “0”, если соответствующий компонент в суспензии отсутствовал. Порог, по которому производилось принятие решения о присутствии компонента, рассчитывался по тренировочному набору. В качестве значения порога выбиралось такое, при котором процент правильного распознавания по всем классам был максимальным (рисунок 3).



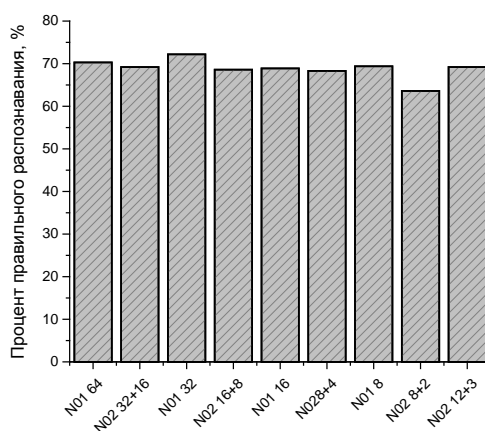
**Рисунок 3.** Зависимости процента правильных ответов сети от значения порога: для всех классов отдельно и усредненная по всем классам.

Как известно, для работы с ИНС необходимо три набора данных: тренировочный набор, на котором нейросеть обучается, валидационный набор, который препятствует «переучиванию» сети, и экзаменационный набор данных, который требуется для оценки качества обучения ИНС и расчета ошибок определения искомым параметров решаемой задачи на независимых данных [14]. Полученный экспериментально массив спектров флуоресценции случайным образом был разделен на тренировочный, валидационный и экзаменационный наборы в соотношении 70:20:10, соответственно. В результате в тренировочный набор вошли 175 примера (спектра), в валидационный – 49 примеров, в экзаменационный – 24 примера.

Для решения задачи классификации использовался классический МСП с полносвязными слоями. Рассматривались следующие архитектуры МСП: с одним скрытым слоем – N01 (с 8, 16, 32 и 64 нейронами в скрытом слое), и с двумя скрытыми слоями – N02 (с (8+2), (8+4), (12+3), (16+8), (32+16) нейронами в скрытых слоях). В качестве функции активации нейронов использовалась логистическая функция. Для обучения МСП использовался алгоритм обратного распространения ошибки, использующий стохастический градиентный спуск. Для того, чтобы исключить влияние исходного распределения весов МСП, обучалось по три одинаковых архитектуры с различным распределением величин весов, а затем их результаты усреднялись.

### 3.1. Тренировка ИНС на полном наборе входных признаков

На первом этапе работы все используемые архитектуры ИНС обучались на полном наборе входных признаков. На рисунке 4 представлены наилучшие результаты классификации всех использованных архитектур МСП, обученных на полном наборе входных признаков. Процент правильных ответов рассчитан по всем классам вместе.



**Рисунок 4.** Процент правильного распознавания для различных архитектур МСП, натренированных на полном наборе входных признаков (наилучшие результаты, экзаменационный набор).

Как видно из полученных результатов, наилучшую классификацию нанокomпозитов УТ+соп+ФК и их всевозможных компонентов продемонстрировал персептрон с 32 нейронами в единственном скрытом слое – 72.2%. Это значение усреднено по всем 5 классам.

### 3.2. Тренировка ИНС после отбора существенных входных признаков

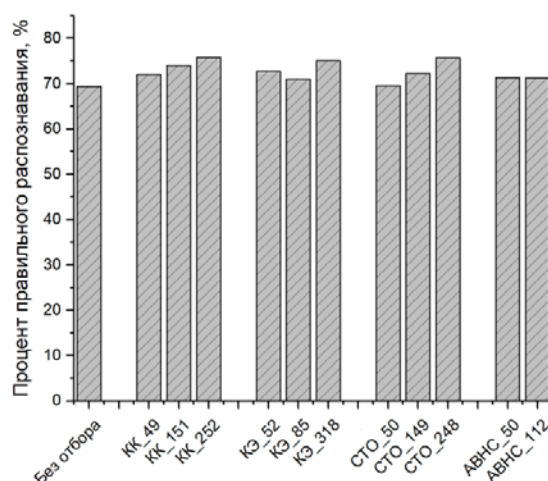
Качество обучения и работы ИНС существенно зависит от входной размерности задачи. Часто бывает так, что не все входные признаки являются одинаково информативными, а в то же время оказавшаяся наилучшей архитектура нейросети имеет очень большое количество весовых коэффициентов. В этом случае уменьшение количества используемых входных признаков может привести к улучшению нейросетевой аппроксимации искомой зависимости благодаря упрощению аппроксимирующей функции (нейронной сети). При этом существенные

входные признаки должны отбираться объективным образом, а не вручную. В данной работе использовалось несколько алгоритмов отбора значимых входных признаков.

Для уменьшения входной размерности задачи и возможного переучивания ИНС были проведены 4 альтернативные процедуры отбора существенных входных признаков: по кросс-корреляции, по кросс-энтропии, по стандартному отклонению и с помощью анализа весов нейронной сети [15]. Для сравнения эффективности способов отбора при использовании каждого из них были, по возможности, сформированы наборы с количеством значимых входных признаков около 50, около 150 и около 250. На отобранных наборах входных признаков во всех случаях тренировался персептрон с 8 нейронами в единственном скрытом слое.

**Кросс-корреляция (КК).** Вычислялись значения кросс-корреляции значений в каждом спектральном канале со значениями каждого выхода. Для каждого выхода значимые входные признаки определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.

Наилучший результат продемонстрировала ИНС, обученная на наборе с 252 значимыми признаками, – 75.8% правильного распознавания на экзаменационном наборе (рисунок 5).



**Рисунок 5.** Процент правильного распознавания для различных способов отбора признаков, признаков (наилучшие результаты, экзаменационный набор). Столбцу под названием «Без отбора» соответствует результат, полученный с помощью МСП с 8 нейронами в единственном скрытом слое.

**Кросс-энтропия (КЭ).** Вычислялись значения кросс-энтропии значений в каждом спектральном канале со значениями каждого выхода. Для каждого выхода значимые входные признаки определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.

В данном случае не удалось подобрать параметры, обеспечивающие выбор 50, 150 и 250 значимых признаков, что обусловлено структурой самих данных. Поэтому нейронные сети были натренированы на наборах с 52, 85 и 318 входными признаками. Наилучший результат продемонстрировала сеть, обученная на наборе с 318 входными признаками, – 75.1% правильного распознавания на экзаменационном наборе (рисунок 5)

**Стандартное отклонение (СТО).** Вычислялось значение стандартного отклонения значений в каждом спектральном канале по всем примерам, пропорциональное значению энтропии, т.е. количеству информации в данном канале. Для каждого выхода значимые входные признаки определялись отдельно, а затем все признаки, значимые хотя бы для одного выхода, использовались для последующей тренировки персептрона.

Наилучший результат продемонстрировала сеть, обученная на наборе с 248 значимыми признаками, – 75.7% правильного распознавания на экзаменационном наборе (рисунок 5).

Анализ весов нейронной сети (АВНС). Этот метод отбора существенных признаков [16] основан на значениях весов нейронных сетей, натренированных на полном наборе данных. Идея метода заключается в том, что существенный входной признак обычно имеет большие значения весовых коэффициентов хотя бы для некоторых из связей, соединяющих его с выходным слоем; исходя из этого, определяется показатель существенности для каждого входного признака (канала спектра). Для каждого класса веществ определение значимых каналов производилось отдельно следующим образом: на полном наборе данных тренировались 5 идентичных нейронных сетей с 32 нейронами в единственном скрытом слое, различающихся начальными значениями весов. Далее производился анализ весов каждой из полученных нейронных сетей, и для каждой из них вычислялось среднее по всем каналам значение показателя существенности, а также его стандартное отклонение. Если значение показателя существенности в данном канале превышало значение «среднее + k стандартных отклонений», то канал признавался значимым. Далее, если канал внутри класса был значимым хотя бы для трех сетей из пяти, то канал полагался значимым для класса. Если канал был значим хотя бы для одного класса, то канал признавался значимым и использовался для последующей тренировки ИНС. В зависимости от параметра k можно было варьировать количество значимых каналов.

Наилучший результат продемонстрировала ИНС, обученная на наборе с 50 значимыми признаками, – 71.4% правильного распознавания на экзаменационном наборе (рисунок 5).

#### 4. Заключение

В работе предложен новый подход к реализации оптической визуализации флуоресцирующих наночастиц в биоматериале. С помощью искусственных нейронных сетей решалась задача контроля выведения нанокompозитов и их компонентов с уриной. Показано, что наилучшие результаты решения задачи классификации нанокompозитов и их компонентов в урине обеспечивает перцептрон с 8 нейронами в единственном скрытом слое, натренированный на наборе существенных входных признаков, отобранных с помощью кросс-корреляции. Процент правильного распознавания, усредненный по всем пяти классам, составил 75.8%.

#### 5. Благодарности

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-12-01481).

#### 6. Литература

- [1] Ferlay, J. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 / J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray // *International journal of cancer*. – 2015. – Vol. 136(5). – P. 359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
- [2] Jones, S.K. Tackling breast cancer chemoresistance with nano-formulated siRNA / S.K. Jones, O.M. Merkel // *Gene therapy*. – 2016. – Vol. 23(12). – P. 821-828. DOI: 10.1038/gt.2016.67.
- [3] Doane, T.L. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy / T.L. Doane, C. Burda // *Chem Soc Rev*. – 2012. – Vol. 41(7). – P. 2885-2911. DOI: 10.1039/c2cs15260f.
- [4] Hong, G. Carbon nanomaterials for biological imaging and nanomedicinal therapy / G. Hong, S. Diao, A.L. Antaris, H. Dai // *Chem. Rev.* – 2015 – Vol. 115(19). – P. 10816-10906. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00008.
- [5] Jenkins, R. Mini-review: fluorescence imaging in cancer cells using dye-doped nanoparticles / R. Jenkins, M.K. Burdette, S.H. Foulger // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6(70). – P. 65459-65474. DOI: 10.1039/C6RA10473H.
- [6] Wu, Y. Programmable biopolymers for advancing biomedical applications of fluorescent nanodiamonds / Y. Wu, A. Ermakova, W. Liu, G. Pramanik, T.M. Vu, A. Kurz, J. Wrachtrup // *J. Advanced Functional Materials*. – 2015. – Vol. 25(42). – P. 6576-6585. DOI: 10.1002/adfm.201502704.

- [7] Prabhakar, N. Functionalization of graphene oxide nanostructures improves photoluminescence and facilitates their use as optical probes in preclinical imaging / N. Prabhakar, T. Näreoja, E. von Haartman, D. Karaman, S.A. Burikov, T.A. Dolenko, O.A. Shenderova // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7(23). – P. 10410-10420. DOI: 10.1039/c5nr01403d.
- [8] Zhao, J. Fructose-coated nanodiamonds: promising platforms for treatment of human breast cancer / J. Zhao, H. Lai, H. Lu, C. Barner-Kowollik, M.H. Stenzel, P. Xiao // *Biomacromolecules*. – 2016. – Vol. 17(9). – P. 2946-2955. DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00754.
- [9] He, D. Remote-controlled drug release from graphene oxide-capped mesoporous silica to cancer cells by photoinduced pH-jump activation / D. He, X. He, K. Wang, Z. Zou, X. Yang, X. Li // *Langmuir*. – 2014. – Vol. 30(24). – P. 7182-7189. DOI: 10.1021/la501075c.
- [10] Wagnières, G. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications / G. Wagnières, W. Star, B. Wilson // *Photochemistry and Photobiology* – 1998. – Vol. 68(5). – P. 603-632.
- [11] Dolenko, T. Optical imaging of fluorescent carbon biomarkers using artificial neural networks / T. Dolenko, S. Burikov, A. Vervalde, I. Vlasov, S. Dolenko, K. Laptinskiy, J.M. Rosenholm, O. Shenderova // *Journal of Biomedical Optics*. – 2014. – Vol. 19(11). – P. 1170071- 1170079. DOI: 10.1117/1.JBO.19.11.117007.
- [12] Laptinskiy, K. Monitoring of nanodiamonds in human urine using artificial neural networks / K. Laptinskiy, S. Burikov, S. Dolenko, A. Efitorov, O. Sarmanova, O. Shenderova, I. Vlasov, T. Dolenko // *Physica Status Solidi A*. – 2016. – Vol. 213(10) P. 2614-2622.
- [13] Kim, Y. Role of folate in colon cancer development and progression / Y. Kim // *J. Nutr.* – 2003. – Vol. 133. – P. 3731S-3739S.
- [14] Haykin, S. Neural networks and learning machines / S. Haykin // Upper Saddle River: Pearson. – 2009. – Vol. 3. – 936 p.
- [15] Efitorov, A. Significant feature selection in neural network solution of an inverse problem in spectroscopy / A. Efitorov, S. Burikov, T. Dolenko, K. Laptinskiy, S. Dolenko // *Procedia Computer Science*. – 2015. – Vol. 66. – P. 93-102. DOI: 10.1016/j.procs.2015.11.012.
- [16] Gevrey, M. Review and comparison of methods to study the contribution of variables in artificial neural network models / M. Gevrey, I. Dimopoulos, S. Lek // *Ecological Modelling*. – 2003. – Vol. 160. – P. 249-264.



# Optical visualization and control of the excretion of theranostic fluorescent nanocomposites from the body using artificial neural networks

K.A. Laptinskiy<sup>1,2</sup>, S.A. Burikov<sup>1,2</sup>, S.A. Dolenko<sup>2</sup>, I.V. Isaev<sup>2</sup>, N. Prabhakar<sup>3</sup>, J.M. Rosenholm<sup>3</sup>, O.E. Sarmanova<sup>1</sup>, T.A. Dolenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119991

<sup>2</sup>Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, 119991

<sup>3</sup>Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University, Turku, Finland

**Abstract.** In this paper, we present the results of the usage of the artificial neural networks to develop a new method for monitoring the excreted nanocomposite carriers of drugs and their components from the fluorescence spectra. The situation of removal of nanocomposites consisting of fluorescent carbon dots covered with copolymers and ligands of folic acid and their components with urine was modeled and the problem of classification of all nanoparticles was solved. Various architectures of neural networks were used for solving this problem, as well as compression of input features: cross-correlation, cross-entropy, standard deviation, use of the analysis of the neural network weights. The best results of the classification of nanocomposites and their components in urine are provided by a perceptron with 8 neurons in a single hidden layer, trained on a set of significant input features identified by cross-correlation. The percentage of correct recognition, averaged over all possible five classes of nanoparticles, is 75.8%.

**Keywords:** artificial neural network, inverse problems of spectroscopy, carbon nanoparticles, nanocomposites, applications of the machine learning.