



prof. dr hab. Izabela Makałowska  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6  
61-614 Poznań  
e-mail: izabel@amu.edu.pl

Poznań, 25.08.2021

**Ocena pracy doktorskiej mgr Konrada Stawiskiego pt. „Głębokie sieci neuronowe w integracji profilu ekspresji krążących i wewnątrzkomórkowych cząsteczek miRNA pacjentów z rakiem trzustki.”**

**Ocena formalna**

Eksperymenty i analizy, na podstawie których została przygotowana oceniana rozprawa doktorska zostały wykonane w Zakładzie Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Wojciecha Fendlera. Rozprawa ma formę monografii naukowej składającej się ze wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji i wniosków. Na końcu pracy zamieszczone są streszczenia, w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel i rycin, wykaz skrótów oraz dwa załączniki. Całość obejmuje 217 stron. Wstęp zajmuje 27 stron, w tym cztery z nich to tabele zawierające przegląd powiązanej tematycznie literatury. Omówione w nim są zagadnienia powiązane z przedstawioną rozprawą w tym epidemiologia, diagnostyka i leczenie raka trzustki, biomarkery diagnostyczne ze szczególnym uwzględnieniem miRNA i biomarkerów raka trzustki oraz podstawowe metody sztucznej inteligencji wykorzystywane w poszukiwaniu wzorów w wielkich zbiorach danych. Myślę, że ta ostatnia część wymagałaby w niektórych miejscach nieco szerszego opisu, szczególnie, że to właśnie modelowanie z wykorzystaniem technik głębokiego uczenia jest głównym tematem pracy. Zabrakło mi na przykład omówienia i przedstawienia przykładów wykorzystania metod sztucznej inteligencji w diagnostyce medycznej, szczególnie w poszukiwaniu biomarkerów.

Po wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr Konrad Stawiski przedstawił cel swojej pracy. Głównym celem było zaprojektowanie i walidacja sygnatury profilu krążącego miRNA pacjentów z rakiem trzustki poprzez wykorzystanie metod selekcji zmiennych, głębokiego uczenia i opartej o nie integracji wewnątrzkomórkowego profilu miRNA w schemacie uczenia przeniesionego. Doktorant postawił hipotezę, że integracja wewnątrzkomórkowego oraz krążącego miRNA przy użyciu głębokiego uczenia z uczeniem przeniesionym pozwoli na stworzenie opornego na nadmierne

dopasowanie testu diagnostycznego.

Materiały i metody opisane zostały na 28 stronach. Mgr Stawiski opisał tu grupy pacjentów jak i zastosowane metody. Podobnie jak w przypadku wstępu niektóre aspekty opisane są zbyt ogólnikowo. Przykładowo, plan badań wymagałby nieco szerszego omówienia. Nie znalazłam także solidnego uzasadnienia dla wykorzystania w fazie eksploracji danych miRNA-seq kohort z Bostonu i Łodzi, a w fazie walidacji qPCR kohort z Łodzi i Niemiec. Jest jedynie dość enigmatyczne wyjaśnienie, że wynika to ze względu na czas pobrania oraz ilość dostępnego materiału biologicznego. Bardzo prosiłabym o doprecyzowanie. Wyjaśnienie, że w fazie walidacji qPCR doktorant ograniczył się do 10 miRNA jest również bardzo ogólnikowe. Wybór sygnatury z 10 miRNA opiera się jedynie na przypuszczeniach, że model mierzący więcej niż 10 miRNA nie spełniałby kryteriów koszt-efektywności.

Wyniki pracy przedstawione są w 11 podrozdziałach. Ta część rozprawy zawiera 35 tabel i 48 rycin. W poszczególnych podrozdziałach mgr Konrad Stawiski w logicznym i dobrze uporządkowanym ciągu przedstawił wyniki kolejnych etapów swojej pracy doktorskiej. Wyniki opisane są w bardzo zwięzły sposób, ale pozwalający na zapoznanie się z procesem badawczym i jego rezultatami. Rozprawę zamyka dyskusja. Szczegółowa ocena zarówno wyników jak i dyskusji znajduje się w części oceny merytorycznej.

Spisy literatury, tabel, rycin i skrótów nie budzą zastrzeżeń. Natomiast umieszczone pod koniec rozprawy ponad trzystronicowe streszczenia wydają się być nieco długie jak na streszczenia.

Wymienione powyżej niedociągnięcia nie mają od strony formalnej istotnego wpływu na jakość przedstawionej rozprawy i stwierdzam, że przygotowana przez mgr Konrada Stawiskiego praca spełnia wszystkie formalne warunki stawiane pracom doktorskim. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

### **Ocena merytoryczna**

Rak trzustki należy do nowotworów o najwyższej śmiertelności. Jednym z powodów jest zazwyczaj późna diagnoza wynikająca z niskiej specyficzności objawów pojawiających się najczęściej w zaawansowanym stadium choroby. Biomarkery wykorzystywane obecnie w diagnostyce cechuje natomiast stosunkowo niska czułość i specyficzność. Zarówno rozwój wysokoprzepustowych technologii jak i ogromne postępy w wiedzy w obszarze biologii molekularnej przyczyniły się do ogromnej intensyfikacji poszukiwań nowych biomarkerów. Jedną z obszernie badanych w tym celu klas cząsteczek molekularnych jest krążące miRNA. Przeprowadzone dotąd badania nie są spójne i nie pozwalają na jednoznaczne wyznaczenie grupy najbardziej wiarygodnych biomarkerów. Mgr Konrad Stawiski postawił sobie zatem bardzo ambitne zadanie zaprojektowania sygnatury krążącego miRNA wykorzystując głębokie uczenie wraz z uczeniem przeniesionym integrując przy tym profil wewnątrzkomórkowy i profil obwodowy ekspresji miRNA. Przeprowadzone analizy obejmowały trzy fazy: fazę eksploracji danych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania miRNA izolowanego z surowicy obwodowej, fazę walidacji qPCR oraz fazę integracji, w której wykorzystano dane miRNA-seq pochodzące z raka trzustki i tkanek zdrowych pobrane z bazy The Cancer Genome Atlas. Grupę badawczą stanowiło 332 pacjentów z Polski, Niemiec i Stanów Zjednoczonych, w tym

120 pacjentów z rakiem trzustki oraz 212 pacjentów kontrolnych. Wśród tych ostatnich 70 osób miało rozpoznanie ostrego lub przewlekłego zapalenia trzustki. W każdej z faz wyszukiwany był najlepszy model diagnostyczny. Ostatnim etapem analizy była analiza funkcjonalna miRNA wybranych jako potencjalne biomarkery. Analiza sygnatur miRNA, modelowanie sieci oraz przenoszenie wiedzy wykonane zostały w oparciu o autorskie podejście metodyczne i utworzone przez doktoranta oprogramowanie OmicSelector.

W fazie eksploracji miRNA-seq wykorzystano 182 próbki, w tym 76 próbek od pacjentów z rakiem trzustki. Byli to wyłącznie pacjenci z Polski i Stanów Zjednoczonych. Zgodnie z obowiązującymi standardami, dane miRNA-seq zostały ocenione pod względem jakościowym, a następnie zmapowane do genomu człowieka oraz znanych cząsteczek miRNA i innych krótkich RNA. Analiza ta wykazała znaczne różnice w jakości danych pochodzących z Łodzi i Bostonu. Różnice te polegają nie tylko na istotnie większej liczbie uzyskanych odczytów w przypadku danych z Bostonu, ale przede wszystkim w odsetku zmapowanych odczytów. Różnice te doktorant tłumaczy większą degradacją materiału w kohorcie z Łodzi. Nie jestem jednak przekonana czy można w ten sposób wyjaśnić wysoki odsetek odczytów, które się nie mapowały. Różnice tutaj są dość drastyczne co doskonale obrazuje rycina 12. W niektórych próbkach z Łodzi, aż 60% odczytów nie zostało zmapowanych. Można więc mieć wątpliwości co do jakości tych danych. W związku z tym mam pytania. Czy w przypadku wszystkich próbek, zarówno tych z Polski jak i Bostonu, izolacja i sekwencjonowanie były wykonywane w tych samych laboratoriach i przez te same osoby? Jaki był udział doktoranta w tych pracach? Ponadto, czy podjęto próbę wyjaśnienia z jakiego powodu, aż tak dużo odczytów w próbkach z Polski nie mapowało się? Czy może to być wynik zanieczyszczenia innym materiałem biologicznym?

Różnicowa analiza ekspresji miRNA izolowanego z surowicy pacjentów z rakiem trzustki i osób zdrowych wykazała, że 65 miRNA ze 163 wykazywało istotną statystycznie różnicę. Nie do końca jest dla mnie jasne skąd wartość 163. Baza miRBase zawiera aż 1 917 rekordów miRNA człowieka. Czy 163 miRNA wykazywały różnice, ale tylko 65 na poziomie statystycznie istotnym?

W dalszych krokach, mających na celu wybranie najlepszej sygnatury miRNA, zbiór danych podzielono losowo na zbiór treningowy, testowy i walidacyjny. Taki podział wynikał z potrzeby systematycznej walidacji wyników. Stosując różne warianty i metody selekcji zmiennych, doktorant, wykorzystując oprogramowanie OmicsSelector, zidentyfikował sygnatury zawierające od 3 do 163 miRNA. Do dalszej analizy wybrana została sygnatura zawierająca 10 miRNA z najniższą adjustowaną wartością p. Sygnatura ta posłużyła następnie do utworzenia modeli sztucznych sieci neuronowych. Najlepszy ze stworzonych modeli charakteryzował się dokładnością na poziomie 88,5%, czułością 84,6% i specyficznością 92,3%. Zarówno w przypadku zbioru testowego jak i walidacyjnego wartości te były nieco niższe.

W następnym etapie realizacji projektu doktorskiego, mgr Konrad Stawiski przeprowadził walidację wybranej sygnatury za pomocą qPCR. Wykorzystano tu panel 10 wybranych wcześniej miRNA oraz dodatkowo miRNA będące normalizatorami i miRNA służące do oceny hemolizy. Uwzględniona została także kontrola izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji. Analizie poddano 89 próbek pacjentów z rakiem trzustki i 182 próbki osób zdrowych lub z rozpoznaniem zapalenia trzustki. W tym przypadku próbki pochodziły z kohorty Łódzkiej i Niemieckiej. Analiza wyników qPCR 10 miRNA

nie wykazała silnej tendencji do klasteryzacji pacjentów z rakiem trzustki i pacjentów kontrolnych. Udało się jednak wyodrębnić trzy miRNA, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-192-5p i hsa-miR-122-5p, które wykazywały istotną statystycznie różnicę poziomu ekspresji pomiędzy osobami z rakiem trzustki i kontrolą. Dalsze etapy przeprowadzono podobnie jak w przypadku fazy eksploracyjnej. Dane podzielono na zestaw treningowy, testowy i walidacyjny i wytrenowano na wybranej sygnaturze modele o różnych hiperparametrach. W tym przypadku, najlepszy model diagnostyczny cechował się dokładnością 91,2%, czułością 94,4% i specyficznością 86,4%. Wartości te były ponownie nieco niższe w przypadku zbioru testowego i walidacyjnego.

W trzeciej fazie badań, fazie integracji, doktorant najpierw przeprowadził analizy modelu wewnątrzkomórkowego, a więc modelu opartego na danych sekwencjonowania miRNA izolowanego z guza trzustki i zdrowych tkanek. Analizie poddano odpowiednio 178 próbek pochodzących z guza i 675 pochodzących z różnych zdrowych tkanek. Wszystkie dane pobrane zostały z bazy The Cancer Genome Atlas. Podobnie jak w przypadku qPCR, analizie poddano 10 wybranych w fazie eksploracyjnej miRNA. Profil ekspresji wybranych miRNA pozwolił na pewną klasteryzację przypadków raka trzustki, ale nie różnił się od profilu w zdrowych tkankach przewodu pokarmowego i układu moczowego. W oparciu o analizowane dane ponownie stworzonych zostało niemal 100 000 modeli głębokiej sztucznej sieci neuronowej o różnych parametrach. Najlepszy model cechował się czułością na poziomie 99,1% i specyficznością 98,5%. Wysokie wartości tych wskaźników uzyskano także w przypadku zbioru testowego i walidacyjnego.

Ostatnią fazą modelowania było nauczanie przenoszone integrujące wyniki analiz wykonanych na wcześniejszych trzech etapach. Wszystkie te etapy zwierały analizę różnicową ekspresji miRNA. Porównanie wyników analizy poziomu ekspresji w trzech różnych zestawach danych: miRNA-seq z surowicy, qPCR i miRNA-seq z guza i zdrowych tkanek, wykazało całkowitą zgodność jedynie w przypadku dwóch miRNA: hsa-miR-194-5p i hsa-miR-192-5p. Wykorzystując uczenie przenoszone, doktorant najpierw podjął się integracji profili uzyskanych na podstawie analizy danych z bazy TCGA i tych uzyskanych w fazie eksploracji miRNA z surowicy. W nauczaniu tym punktem wyjścia była sieć wytrenowana na zbiorze TCGA. Wykorzystano tu 1000 najlepszych modeli stosując 5 technik transferu. Najlepsze właściwości diagnostyczne uzyskały sieci przy użyciu transferu „structure\_recalibrated”, ale wszystkie sieci wykorzystujące w procesie rekalkibracji wiedzę z profilu wewnątrzkomórkowego wykazywały istotnie lepsze parametry diagnostyczne niż sieci korzystające z własnych wag startowych. Podobnie w przypadku integracji modelu wewnątrzkomórkowego z profilami fazy walidacji qPCRT wszystkie sieci transferowane wykazywały istotnie lepsze parametry.

Końcowym etapem badań prowadzonych przez mgr Konrada Stawiskiego była analiza wartości prognostycznej wybranych miRNA oraz analiza funkcjonalna. Analiza przeżycia wykazała, że wyższa ekspresja hsa-let-7a-5p, hsa-miR-98-5p lub hsa-miR-26b-5p była istotnym niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko zgonu. Podzielenie pacjentów pod względem wysokiej i niskiej ekspresji poszczególnych miRNA pozwoliło na stwierdzenie, że różnica w przeżyciu jest istotna statystycznie także w przypadku hsa-let-7f-5p. Analiza funkcjonalna wykazała natomiast, że wybrane 10 miRNA uczestniczą w klasycznych ścieżkach sygnałowych karcynogenezy i są istotnie powiązane z rakiem trzustki.

Rozprawę zamyka dyskusja, w której doktorant omawia efektywność diagnostyczną stworzonych modeli, techniczne aspekty analizy, funkcje wybranych miRNA oraz ich powiązanie z rakiem trzustki. Doktorant dokonał także oceny strategii transferu wiedzy jak i użyteczności klinicznej uzyskanych modeli. Nieco zaskakującym jest umieszczenie w dyskusji informacji o oprogramowaniu OmicSelector, które to doktorant stworzył i wykorzystał w przeprowadzonych analizach. Wykorzystane oprogramowanie powinno być opisane w części „Materiały i metody” i to w znacznie szerszym zakresie, szczególnie, że wszystkie modelowania były wykonane z użyciem tego właśnie narzędzia. Zamiast tego, doktorant odsyła czytelnika do dokumentacji umieszczonej na stronie internetowej. W dyskusji zabrakło mi także szerszego odniesienia się do innych metod/prac dotyczących modelowania sieci neuronowych na potrzeby diagnostyki raka. Doktorant przedstawia swoje, autorskie rozwiązanie, ale nie dokonuje porównania z wcześniej opracowanymi przez innych badaczy. Porównanie takie jest niezwykle istotne w przypadku nowych narzędzi. Doktorant informuje jedynie, że skuteczność podejścia została przebadana na kilku zbiorach danych, a artykuł opisujący rezultaty znajduje się w recenzji. Czy doktorant mógłby przedstawić wybrane wyniki oceny skuteczności opracowanego podejścia?

Podsumowując ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr Konrada Stawiskiego, mogę stwierdzić, że praca jest niewątpliwie nowatorska, a otrzymane wyniki są nie tylko ciekawe, ale mają także duży potencjał aplikacyjny. Chciałabym przy tym podkreślić, że przeprowadzając swoje badania, doktorant wykazał się dużą starannością i dbałością o jakość przeprowadzanych analiz. Przykładem może być zwrócenie uwagi na to, aby system nie został przetrenowany, systematyczna walidacja zdolności prognostycznych modeli, wykorzystywanie i porównanie kilku schematów transferu wiedzy czy też upewnienie się, że na wyniki qPCR nie miały wpływu błędy techniczne.

Nieco zawiedzona czy może zaskoczona byłam natomiast brakiem takiej staranności w odniesieniu do strony edytorskiej rozprawy. W tekście znajdują się liczne błędy literowe, w kilkunastu miejscach brakowało wyrazu w zdaniu lub też wyrazy były powtórzone. Rozplanowanie rycin, tabel i tekstu w kilku miejscach zaskakiwało. Przykładowo, na stronie 63 znajdują się jedynie ostatnie trzy wiersze tabeli 6 i dwa zdania odnoszące się do tabeli 7. Reszta strony jest pusta i nie bardzo wiadomo dlaczego tabela 7 umieszczona została dopiero na następnej stronie, za paragrafem odnoszącym się już do następnej tabeli, znajdującej się z kolei na stronie 65. Podobnie, na stronie 72 znajdują się jedynie dwa zdania i nie wiadomo, dlaczego nie znalazły się one na częściowo pustej stronie 71. Zastrzeżenia mam także do wielu rycin, na których opisy są mało czytelne lub wręcz nieczytelne. Np. na rycinie 17, przedstawiającej wyniki analizy różnicowej ekspresji miRNA w postaci wykresu wulkanu, oznaczone zostało 15 najbardziej istotnych miRNA. Odczytanie tych opisów wymagało użycia szkła powiększającego. Podobnie było w przypadku rycin 18, 23, 27, 39, 40, 50 i innych. Pewna niestaranność widoczna jest także w opisywaniu wyników. Przykładowo, doktorant podał, że otrzymane sygnatury zawierały od 3 do 63 miRNA, ale nie podał, ile sygnatur uzyskał. Jak już wcześniej zostało zaznaczone, brakuje także rzetelnego wyjaśnienia wykorzystania danych z kohorty Bostońskiej jedynie w pierwszej fazie, a kohorty z Niemiec jedynie w fazie walidacji qPCR. Niektóre aspekty pracy opisane są nieco ogólnikowo, dobrym przykładem jest tutaj algorytm wybierania sygnatur przedstawiony na schemacie jedynie jako „zarys algorytmu”.

## **Wnioski końcowe.**

Do najważniejszych osiągnięć mgr Konrada Stawiskiego można zaliczyć identyfikację dwóch miRNA, które we wszystkich przeprowadzonych analizach wykazywały nadekspresję u pacjentów z rakiem trzustki, identyfikację trzech miRNA, których wyższa ekspresja jest czynnikiem zwiększającym ryzyko śmierci oraz wykazanie, że zastosowanie transferu wiedzy zwiększa potencjał modelu, a sieć neuronowa oparta o 10 miRNA i wykorzystująca transfer wiedzy z profili wewnątrzkomórkowych ma lepsze właściwości diagnostyczne niż rutynowo stosowane biomarkery. Znaczenia tych osiągnięć oraz jakości przeprowadzonej pracy eksperymentalnej i analitycznej nie umniejszają wymienione niedociągnięcia. Wiele z nich przytoczonych zostało z czystego obowiązku recenzenta. Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Proszę Radę Naukową Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Konrada Stawiskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



## **Wnioski końcowe.**

Do najważniejszych osiągnięć mgr Konrada Stawiskiego można zaliczyć identyfikację dwóch miRNA, które we wszystkich przeprowadzonych analizach wykazywały nadekspresję u pacjentów z rakiem trzustki, identyfikację trzech miRNA, których wyższa ekspresja jest czynnikiem zwiększającym ryzyko śmierci oraz wykazanie, że zastosowanie transferu wiedzy zwiększa potencjał modelu, a sieć neuronowa oparta o 10 miRNA i wykorzystująca transfer wiedzy z profili wewnątrzkomórkowych ma lepsze właściwości diagnostyczne niż rutynowo stosowane biomarkery. Znaczenia tych osiągnięć oraz jakości przeprowadzonej pracy eksperymentalnej i analitycznej nie umniejszają wymienione niedociągnięcia. Wiele z nich przytoczonych zostało z czystego obowiązku recenzenta. Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Proszę Radę Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Konrada Stawiskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

