

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: Beata Sokołowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplomy:

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Kierunek Fizyka Stosowana.

1986 rok: magisterium w zakresie fizyki specjalność stosowana.

Praca magisterska pt. „Fosforescencja związków aromatycznych w roztworach micelarnych w temperaturze pokojowej”, zrealizowana w Zakładzie Biofizyki Doświadczalnej.

Uniwersytet Warszawski, Wydział Fizyki, Kierunek Fizyka Medyczna.

1990 rok: magisterium w zakresie zastosowań fizyki w medycynie.

Praca magisterska pt. „Model Fermiego-Eyges'a dla terapeutycznej wiązki elektronów”, zrealizowana w Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Stopień naukowy: Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

2003 rok: doktor nauk medycznych w zastosowaniach biologii medycznej.

Rozprawa doktorska pt. „Kompensacja oddechowa po stopniowym odnerwianiu przepony u kota”, zrealizowana w Zakładzie Neurobiologii Oddychania.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

1990-1995: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk (ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa). W Zakładzie Neurofizjologii, w Pracowni Kontroli Zachowania Ruchowego: praca naukowo-badawcza nad oceną wpływu różnorodnych bodźców na stan pobudliwości motoneuronów mięśni prostowników i zginaczy kończyn u kotów i szczurów, z wykorzystaniem zaproponowanego i opracowanego modelu eksperymentalnego „*in vivo*”.

1995-2010: Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk (ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa). W Zakładzie Neurobiologii Oddychania: praca naukowo-badawcza nad poznaniem mechanizmów regulacji oddechowej w warunkach eksperymentalnych u zwierząt (kotów, królików i szczurów). W dniu 18 marca 2003 roku obrona rozprawy doktorskiej, przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Mieczysława Pokorskiego, pt. „*Kompensacja oddechowa po stopniowym odnerwianiu przepony u kota*” i uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych w zastosowaniach biologii medycznej. Recenzentami pracy byli: prof. dr hab. Hanna Kaciuba-Uściłko (IMDiK PAN) i prof. dr hab. inż. Wojciech Zmysłowski (IBIB PAN).

- 2010-2011:** Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa). W Zakładzie Biologii Molekularnej (ZBM), w Pracowni Chemicznych Podstaw Mutagenyzy i Reperacji Adduktów Egzocyklicznych: praca naukowo-badawcza nad mechanizmami naprawy egzocyklicznych adduktów zasad przez glikozylazy *DNA* w eksperymentalnym modelu *Escherichia Coli* i w układzie biologicznym *Faga M13*. Wcześniej, odbycie stażu podoktorskiego (2005-2009) w Pracowni Oksydacyjnych Uszkodzeń *DNA* (w ZBM), włączając poznanie technik i metod biologii molekularnej.
- 2012-2015:** Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. W nowo utworzonej Pracowni Bioinformatyki IMDiK PAN, udział w realizowanych pracach badawczych i badawczo-rozwojowych na rzecz projektu (z udziałem funduszy Unii Europejskiej) Konsorcjum „BIOCENTRUM - OCHOTA - infrastruktura informatyczna dla rozwoju strategicznych kierunków biologii i medycyny” (POIG 02.03.00-00-003/09) oraz kontynuacja współpracy naukowo-badawczej w obszarze poszukiwania i oceny markerów w klinice chorób rzadkich oraz medycznego obrazowania i badań posturograficznych w klinice chorób neurologicznych i reumatycznych.
- 2015-obecnie:** jako adiunkt w Pracowni Bioinformatyki IMDiK PAN, podjęcie nowych i kontynuacja dotychczasowych badań w ramach współpracy naukowej, w tym nowe badania w zakresie modelowania matematyczno-statystycznego i dynamiki molekularnej w klinice chorób rzadkich i reumatycznych oraz własne badania z wykorzystaniem rozszerzonej i wirtualnej rzeczywistości realizowane w oparciu o nowe innowacyjne technologie medyczne.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy:

Oświadczenia wszystkich współautorów określających indywidualnych wkład każdego z nich w tworzenie poszczególnych publikacji zawarto w „Oświadczeniach współautorów”.

a) tytuł osiągnięcia naukowego/ artystycznego

Osiągnięcie naukowe przedstawione jako cykl wybranych 10 publikacji, powiązanych i stanowiących podstawę dla prezentowanego tematu, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, objętych wspólnym tytułem:

***Ocena istotności i znaczenia parametrów/ markerów, z uwzględnieniem
statystycznego modelu z klasyfikacją, w badaniach klinicznych i w
modelowych eksperymentach na zwierzętach***

b)(autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Sokołowska B*, Sadura-Sieklucka T, Czerwosz L, Hallay-Suszek M, Lesyng B, Księżopolska-Orłowska K: Estimation of posturographic trajectory parameters using a k neighbors classifier in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2018**; 39: 85-90 (DOI: 10.1007/5584_2018_150). *Autor korespondencyjny.

IF = 1,760 ; KBN.MNiSW = 25.

Sokołowska B*, Czerwosz L, Hallay-Suszek M, Sadura-Sieklucka T, Księżopolska-Orłowska K. Posturography in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2015**; 2: 63-70 (DOI: 10.1007/5584_2014_29). *Autor korespondencyjny.

IF = 1,953; KBN.MNiSW = 25.

Niebrój-Dobosz I*, **Sokołowska B***, Madej-Pilarczyk A, Marchel M, Hausmanowa-Petrusewicz I. Cardiovascular risk markers in dilated cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). *International Journal of Cardiology* **2014**; 173(2): 324-325 (DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.03.058). *Równy udział autorów.

IF = 4,036 ; KBN.MNiSW = 40.

Janik P, Kwieciński H, **Sokołowska B***, Niebrój-Dobosz I*. Erythropoietin concentration in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of Neural Transmission* **2010**; 117: 334-347 (DOI: 10.1007/s00702-009-0354-2). *Równy udział autorów.

IF = 2,597 ; KBN.MNiSW = 32.

Niebrój-Dobosz I*, Janik P, **Sokołowska B***, Kwieciński H. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neurology* **2010**; 17: 226-231 (DOI: 10.1111/j.1468-1331.2009.02775.x). *Równy udział autorów.

IF = 3,765 ; KBN.MNiSW = 27.

Sokołowska B*, Józwick A, Niebrój-Dobosz I, Janik P, Kwieciński H. Evaluation of matrix metalloproteinases in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis with pattern recognition methods. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2009**; 60 (Suppl. 5): 117-120 (PMID: 20134051). *Autor korespondencyjny.

IF = 1,489 ; KBN.MNiSW = 32.

Sokołowska B*, Józwick A: Distinguishing the strength of hypoxic stimulus in intermittent hypoxia. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2007**; 58 (Suppl. 5): 657-663 (PMID: 18204180). *Autor korespondencyjny.

IF = 4,466 ; KBN.MNiSW = 20

Sokołowska B*, Pokorski M. Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2006**; 57 (Suppl. 4): 341-347 (PMID: 17072063). *Autor korespondencyjny.

IF = 2,974 ; KBN.MNiSW = 20.

Sokołowska B*, Józwick A. Statistical evaluation of ventilatory patterns in response to intermittent hypoxia in the rabbit. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2005**; 56 (Suppl. IV): 203-207 (PMID: 16204794). *Autor korespondencyjny.

IF = 2,212 ; KBN.MNiSW = 20.

Sokołowska B, Józwick A, Pokorski M. A fuzzy-classifier system to distinguish respiratory patterns evolving after diaphragm paralysis in the cat. *The Japanese Journal of Physiology* **2003**; 53(4): 301-307 (PMID: 14606969).

IF = 0,860 ; KBN.MNiSW = 8.

SUMARYCZNY IF PRAC: 26,112 ; ŁĄCZNA PUNKTACJA KBN.MiNiSW: 244 ; H-index: 5

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Ocena istotności i znaczenia parametrów/ markerów, z uwzględnieniem statystycznego modelu z klasyfikacją, w badaniach klinicznych i w modelowych eksperymentach na zwierzętach

Spis przedstawionych zagadnień

I. WPROWADZENIE

I.1. Statystyczne systemy uczące się z klasyfikacją nadzorowaną w badaniach

I.2. Klasyfikator k najbliższych sąsiadów

I.3. Krzywe ROC i binarny klasyfikator dla danych biomedycznych

I.4. Podsumowanie podejścia badawczo-analitycznego dla oceny istotności i znaczenia wybranych parametrów/ zmiennych klinicznych i biologicznych z zastosowaniem modeli z klasyfikacją nadzorowaną w badaniach

II. PRZEWODNIK PO PUBLIKACJACH

II.1. Publikacje prezentujące zastosowanie statycznej posturografii w klinice chorób układu ruchu, wraz z oceną istotności i znaczenia parametrów posturograficznych w diagnostyce różnicowej i/lub rozpoznaniu (typu) choroby

II.2. Publikacje prezentujące poszukiwanie i porównanie istotnych biomarkerów w klinicznej prognostyce i/lub diagnostyce/ rozpoznaniu chorób nerwowo-mięśniowych i ich znaczenie

II.3. Publikacje prezentujące zjawisko plastyczności oddechowej w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach oraz wskazanie istotnych zmian parametrów wzorca oddechowego i ich znaczenie

III. PODSUMOWANIE i przyszłe projekty badawcze jako rozszerzenie realizowanych badań

I. WPROWADZENIE

Badania uwzględniające ocenę parametrów fizjologicznych/ zmiennych biologicznych, jako (bio)markerów w różnych jednostkach chorobowych, odgrywają ważną i kluczową rolę zarówno w diagnostyce/ prognostyce/ predykcji, jak również w podejmowanej terapii i rehabilitacji w praktyce medycznej [1,2]. Ważne jest to szczególnie w dziedzinie chorób przewlekłych i/lub genetycznych, o nieznanym etiologii, oraz dla których nie opracowano dotąd skutecznej terapii [3,4].

Warto zauważyć i podkreślić, iż w ostatnim dwudziestopięcioleciu najważniejszym, znaczącym podejściem w medycynie/ praktyce klinicznej stała się medycyna oparta na aktualnych i wiarygodnych faktach/ dowodach naukowych, czyli „EBM” (*ang. evidence-based medicine*), która jest obowiązującym paradygmatem współczesnej medycyny, odwołującym się do statystyki i obiektywnych danych naukowych [5,6]. Według koncepcji EBM podstawą poznania naukowego w medycynie są badania naukowe spełniające odpowiednie kryteria (standardy) wiarygodności (jest to prawidłowo metodologicznie zrealizowany eksperyment/ badanie/ przegląd aktualnych danych/ odkryć w określonej dziedzinie/ dyscyplinie medycyny, celem wykorzystania/ wdrożenia tak uzyskanych

rezultatów w praktyce klinicznej). Na polskim gruncie idee *EBM* są propagowane i wdrażane przez *Polski Instytut Evidence Based Medicine (PI-EBM)*, mający swoją stronę internetową pod adresem <http://ebm.org.pl/>.

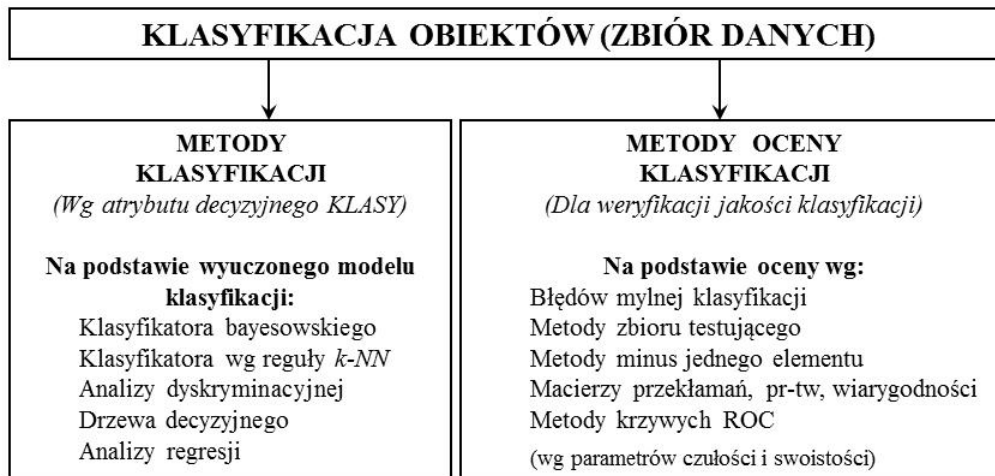
Najczęściej badacze i klinicyści nie ograniczają się w swoich badaniach na opracowaniu i analizie danych/ wyników z zastosowaniem jednej metody analitycznej, lecz stosują kilka różnych technik, algorytmów i/lub modeli matematyczno-statystycznych. Celem większości prowadzonych prac naukowo-badawczych jest zebranie i/lub (u)tworzenie *baz danych/ baz wyników* dotyczących określonego obszaru badań naukowych. Konstruując miary, które opisują istotne charakterystyki tych (baz) danych, możemy informację o nich kondensować, a przez to tworzyć pewien „obraz” *danych (czyli „obraz” pewnego fragmentu rzeczywistości)*. I temu przede wszystkim służy zastosowanie podejścia matematyczno-probabilistyczno-statystycznego do zebranych danych, w tym i gromadzonych/ analizowanych danych (bio)medycznych. Parametry statystyczne są szacowane w próbie losowej (pochodzącej z badanej populacji generalnej) przez funkcje matematyczne, które są określane/ definiowane jako „statystyki” (np. *test t-Studenta, test Manna-Whitneya/ Wilcoxona, etc.*). Formułowane hipotezy statystyczne i ich falsyfikacja pozwala na ocenę wyznaczanych/ obliczanych parametrów statystycznych. Przy weryfikacji hipotez statystycznych można podjąć poprawną decyzję lub można popełnić jeden z dwóch błędów: (a) *błąd I rodzaju* – polegający na odrzuceniu testowanej hipotezy zerowej (H_0), gdy jest ona prawdziwa, oraz (b) *błąd II rodzaju* – polegający na przyjęciu hipotezy H_0 , gdy jest ona w istocie fałszywa, jak przedstawiono w *Tabeli 1*. Prawdopodobieństwo (p) popełnienia błędu I rodzaju określamy jako *poziom istotności* testu i oznaczamy symbolem „ α ” (jeśli $p \leq \alpha$ to mamy „istotność statystyczną”, jeśli $p > \alpha$ to jest „brak istotności statystycznej”). Prawdopodobieństwo popełnienia błędu II rodzaju oznaczamy symbolem „ β ”, a jego dopełnienie „ $1-\beta$ ” definiujemy jako *moc* danego testu statystycznego.

Tabela 1. Klasyczne przedstawienie błędów popełnianych przy testowaniu (weryfikacji) hipotez statystycznych.

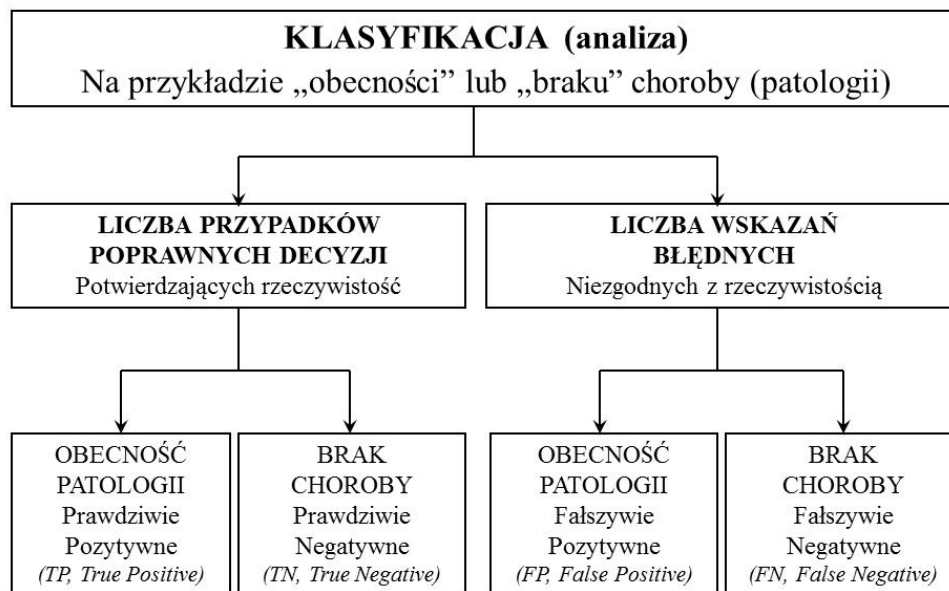
HIPOTEZA ZEROWA H_0	HIPOTEZA H_0 PRAWDZIWA	HIPOTEZA H_0 FALSZYWA
<u>DECYZJA</u> PRZYJĄĆ H_0	<i>Decyzja</i> <i>Prawidłowa</i>	<i>Błąd I rodzaju (α)</i> <i>„α” poziom istotności statystycznej</i>
<u>DECYZJA</u> ODRZUCIĆ H_0 (na korzyść H_1)	<i>Błąd II rodzaju (β)</i> <i>„$1-\beta$” moc testu</i>	<i>Decyzja</i> <i>Prawidłowa</i>

Test statystyczny, który przy ustalonym prawdopodobieństwie błędu I rodzaju minimalizuje prawdopodobieństwo błędu II rodzaju nazywamy *testem najmocniejszym* dla hipotezy H_0 względem hipotezy alternatywnej H_1 . W biomedycynie najczęściej przyjmuje się założenia podstawowe (wyjściowe) istotności statystycznej dla następujących wartości: $\alpha \leq 0,05$ i $\beta \leq 0,20$.

Przedstawione powyżej klasyczne podejście dla weryfikacji/ testowania hipotez w statystyce matematycznej wraz z szacowaniem ich błędów, stanowi podstawę wielu statystycznych *metod, algorytmów i modeli klasyfikacji*, dla zdefiniowania np. „relacji przynależności” w zbiorach danych ze znaną przynależnością do określonych klas/ grup (w medycynie będzie to np. przypisanie pacjentów do grupy badanej *versus* przypisanie osób zdrowych do grupy kontrolnej). Klasyfikacja *obiektów/ obrazów* (przy czym „objektami” mogą być np. osoby badane) niezależnie od tego, jaką metodą jest przeprowadzana, zawsze wymaga oceny *jakości klasyfikacji*. Istnieje wiele różnych propozycji dla dokonania takiej oceny, jak zilustrowano na *Rysunkach 1 i 2*.



Rysunek 1. Przykłady metod klasyfikacji i oceny jakości klasyfikacji według atrybutu decyzyjnego „klasy”.

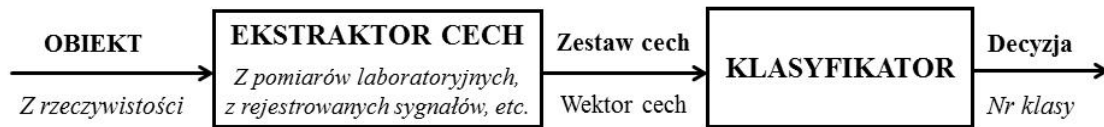


Rysunek 2. Przykład (analizy) klasyfikacji wg kryterium obecności lub braku choroby (czyli rozpoznanie patologii). Wskazania błędne: (a) fałszywie pozytywne, FP, stwierdzenie choroby, przy jej rzeczywistym braku, lub (b) fałszywie negatywne, FN, stwierdzenie braku choroby, gdy w rzeczywistości ona istnieje. Wskazania błędne są tym liczniejsze, im większy jest wpływ „niewłaściwie” dobranych parametrów/ zmiennych w badaniu, „błędnych” danych i innych (np. nieznanymi badaczowi) czynników.

1.1. Statystyczne systemy uczące się z klasyfikacją nadzorowaną w badaniach

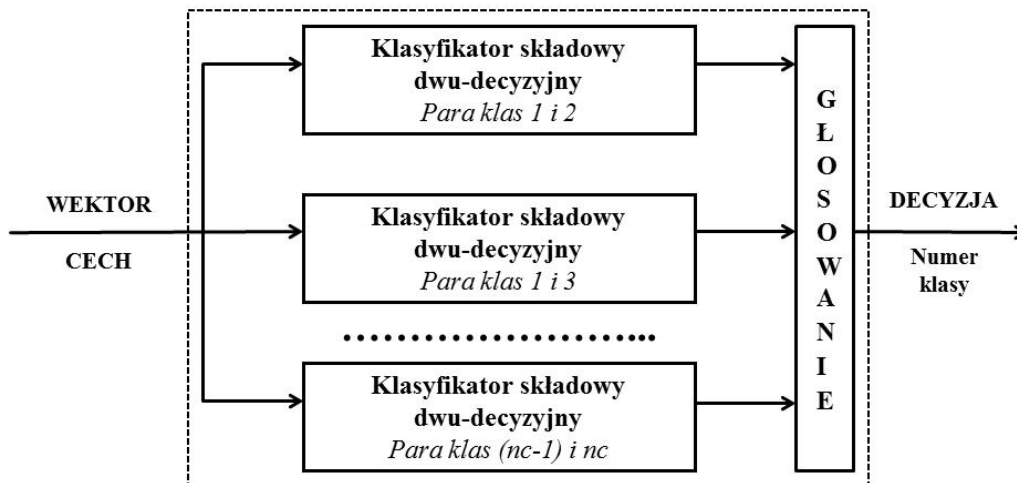
Wspomniana we wstępie klasyfikacja obiektów jest przedmiotem badań dziedziny określanej jako „rozpoznawanie obiektów”, „rozpoznawanie obrazów” lub „rozpoznawanie wzorców” (np. Jain i wsp. 2000 [7] dokonali przeglądu definicji, modeli oraz zastosowań dla prezentowanego podejścia badawczo-analitycznego, ogólnie opisywanego jako „Statistical Pattern Recognition”). Obiekty/ obrazy/ wzorce rozumiane są tutaj w jak najbardziej ogólnym sensie. Zakłada się przy tym, że obiekty opisane są zestawem cech/ wektorem cech, które mogą być zmiennymi ilościowymi, jakościowymi lub binarnymi. Wektorom cech odpowiadają punkty w przestrzeni cech, i najczęściej jest to przestrzeń euklidesowa.

W prowadzonych i przedstawionych badaniach w przyjętym modelu klasyfikacji z zastosowaniem metod rozpoznawania obrazów oparto się na *klasyfikacji nadzorowanej*, której reguły decyzyjne wyprowadzane są ze *zbioru uczącego*. Zbiór uczący jest to zbiór *obiektów ze znaną przynależnością do klas* (np. klasa 1 - grupa kontrolna/ osoby zdrowe, klasa 2 - grupa ze zidentyfikowaną eksperymentalną/ kliniczną patologią/ pacjenci). Proces obliczeniowy prowadzący do konstrukcji klasyfikatora nazywany jest „*uczeniem*”. Ogólnie, w modelu/ układzie rozpoznającym można wyróżnić dwa podstawowe *bloki* (procesy): (a) blok wydzielania cech - *ekstraktor cech* (cech, czyli zmiennych, które odpowiadają np. danym/ wynikom z eksperymentu biologicznego lub badania klinicznego, czy też danym z wypisów rejestrów medycznych), oraz (b) *klasyfikator* (tj. odpowiedni/ właściwy algorytm, określona procedura lub program komputerowy), jak zilustrowano na *Rysunku 3*.



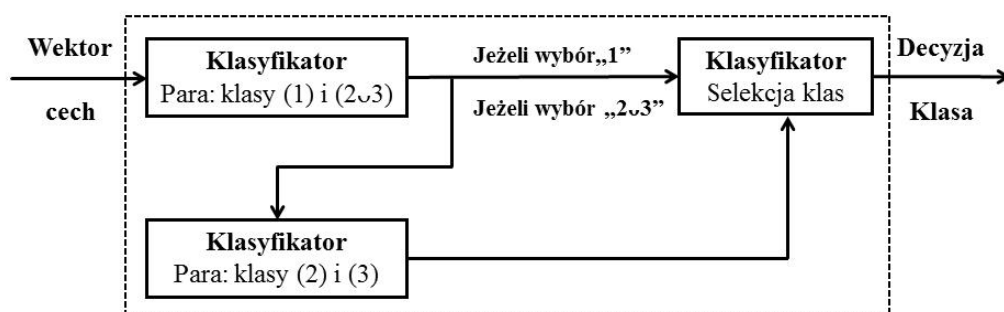
Rysunek 3. Ogólny schemat modelu/ układu rozpoznającego przyjęty w badaniach.

Klasyfikator realizuje określoną regułę decyzyjną, na podstawie której wskazana zostaje jedna z rozpatrywanych dwóch klas, bądź też z wielu klas *nc* (ang. *number class*). W przypadku, gdy wykorzystana w klasyfikatorze reguła decyzyjna dotyczy tylko dwóch klas (np. obecność choroby lub jej brak), lub gdy jest zastosowana reguła *wielo-decyzyjna*, ale ograniczona do pary klas, to klasyfikator taki określany jest jako *dwu-decyzyjny*. *Klasyfikatory dwu-decyzyjne* można wykorzystać do konstrukcji klasyfikatorów *wielo-decyzyjnych*. Przykładem takiego rozwiązania/ podejścia jest *klasyfikator równoległy* złożony z tylu klasyfikatorów dwu-decyzyjnych, ile jest możliwych par klas, czyli jest ich dokładnie $nc \cdot (nc-1) / 2$. Ogólną strukturę takiego modelu klasyfikatora przedstawiono na *Rysunku 4*. W takim modelu, każdy ze składowych klasyfikatorów *dwu-decyzyjnych* wskazuje/ głosuje na jedną z dwóch klas, dla których został skonstruowany. I ostatecznie (finalny/ globalny) klasyfikator równoległy wskazuje na klasę, która uzyskała najwięcej „głosów” od jego klasyfikatorów składowych.



Rysunek 4. Ogólny schemat struktury klasyfikatora równoległego, utworzonej przez składowe klasyfikatory dwu-decyzyjne dla par klas oraz finalne głosowanie nad wyborem klasy (np. taki układ modelowy opisano i zastosowano w pracy [8]).

W przypadku większej liczby klas niż dwie, możliwa jest również struktura hierarchiczna klasyfikatora, tj. wielo-etapowa, z utworzeniem na wstępnym etapie „makroklas” łączących pewne klasy w zbiory klas, według ustalonego kryterium klinicznego/ modelu eksperymentalnego (np. chorzy z objawami łagodnymi i poważnymi początkowo stanowią jedną grupę pacjentów, drugą grupę tworzą osoby zdrowe bądź nosicielki mutacji, etc.). Wówczas na wstępnym etapie następuje klasyfikacja do makroklas, a dopiero w kolejnych etapach następuje klasyfikacja (odpowiedni wybór) pomiędzy klasami każdej z makroklas (np. rozpoznanie objawów łagodnych i poważnych w grupie pacjentów), a w końcowym etapie klasyfikacja dotyczy już przynależności do każdej z pojedynczych/ szczegółowych klas. Hierarchiczną sekwencję klasyfikacji można też uzyskać ze struktury równoległej poprzez zorganizowanie hierarchicznego głosowania składowych klasyfikatorów, jak przedstawiono na Rysunku 5. Zastosowano/ testowano ten wariant modelu klasyfikacji w badaniach prezentowanych m.in. w pracach [8,9].



Rysunek 5. Przykład struktury klasyfikatora hierarchicznego dla trzech klas (który zastosowano w badaniach u pacjentów ze stwardnieniem bocznym zanikowym [8]). W tych badaniach makroklasę tworzą obie grupy chorych (2,3). W pierwszym etapie klasyfikowane są objekty-osoby badane do klasy 1-zdrowej kontroli, a w następnym etapie klasyfikacja dotyczy przynależności już do określonej grupy pacjentów (klasy 2 – z łagodnymi objawami oraz klasy 3 – z poważnymi objawami chorobowymi).

Obok założenia, że obiekt może należeć do jednej z wielu rozważanych/ zdefiniowanych nc klas (tzw. klasyfikacja ostra), możliwe jest zaproponowanie klasyfikacji określanej jako klasyfikacja rozmyta (nieostra), którą po raz pierwszy opisał w swojej pracy Adam Jóźwik [10]. A zatem, szczególnym przypadkiem ogólniejszej klasyfikacji rozmytej jest właśnie klasyfikacja ostra, dla której składowe wektora przynależności (zgodnie z decyzją klasyfikatora) przyjmują wartości binarne (tylko dwie) 0 lub 1. Zastosowano model klasyfikacji wg rozmytej reguły we własnych badaniach eksperymentalnych przedstawionych w pracy [11], jak również użyto go w badaniach klinicznych, dla oceny stanu pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym [9]. Model ten jest szczególnie przydatny w przypadku znacznego pokrywania się obszarów rozważanych klas.

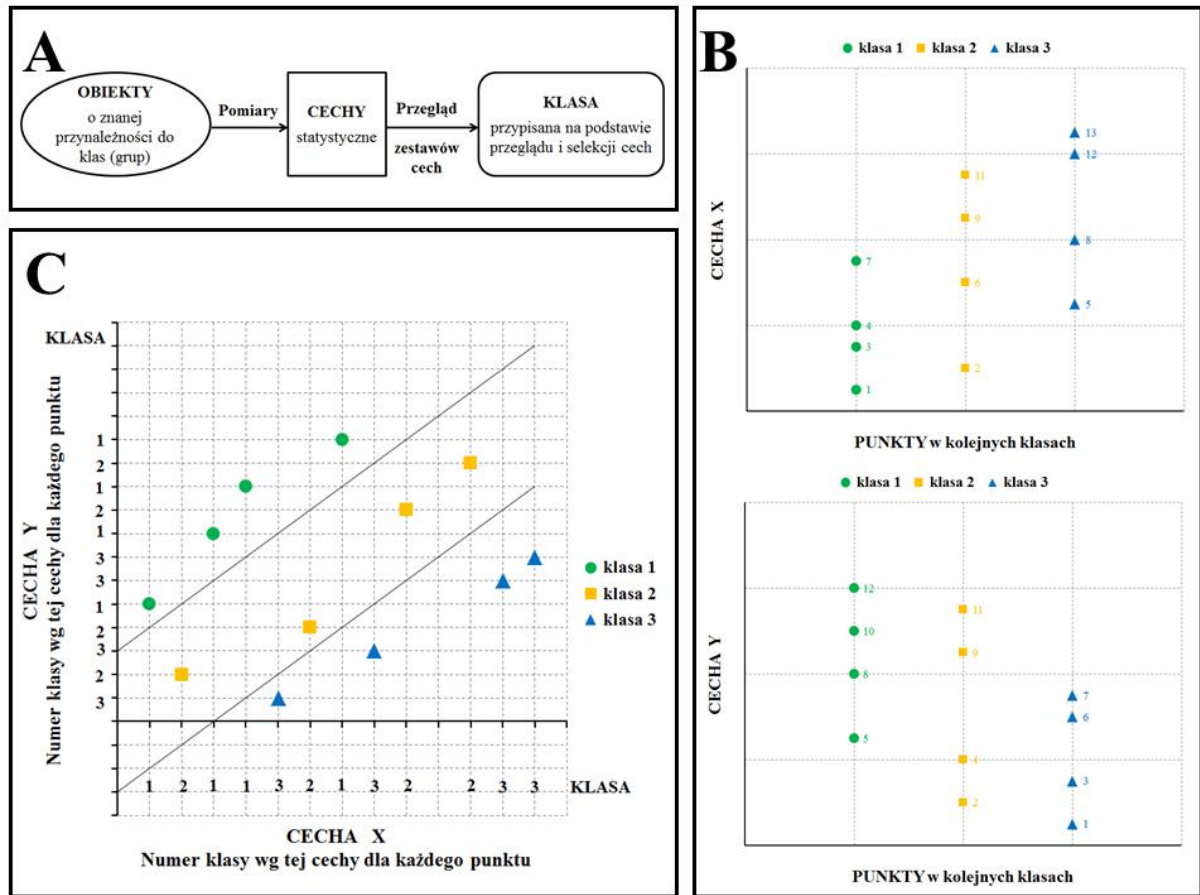
Jak już wspomniano powyżej, w procesie decyzyjnym dotyczącym przynależności do określonej klasy/ klas, ważnym etapem jest ocena jakości (przeprowadzonej) klasyfikacji, czyli jej skuteczność w rozpoznaniu klas, np. w zidentyfikowaniu określonych grup osób badanych bądź warunków eksperymentu (Rysunek 1). Podstawowym kryterium oceny jakości klasyfikacji jest prawdopodobieństwo mylnej decyzji, szacowane frakcją (odsetkiem) błędnych decyzji. Naturalną metodą oszacowania prawdopodobieństwa mylnej decyzji klasyfikatora, jest zastosowanie dwóch zbiorów: zbioru testującego T i zbioru uczącego U . Wszystkie objekty ze zbioru T , których jest na przykład m_T , są klasyfikowane zgodnie z regułą decyzyjną wyprowadzoną ze zbioru uczącego U . Liczba obiektów mylnie klasyfikowanych, e_T , podzielona przez liczbę wszystkich obiektów zbioru testującego T , m_T , czyli frakcja błędów $E_{rT}=e_T/m_T$ (ang. error rate, E_r) jest oszacowaniem prawdopodobieństwa mylnej klasyfikacji.

W przypadku, gdy dysponujemy jednym zbiorem obiektów o znanej przynależności do klas, możemy podzielić ten zbiór na część uczącą U oraz część testującą T . Kolejnym rozszerzeniem tej metody jest metoda l -krotnej walidacji, która polega na podzieleniu zbioru U na l równych części. Każda z tych l części pełni kolejno rolę zbioru testującego. Szczególnym przypadkiem metody l -krotnej walidacji dla $l=1$ jest *metoda minus jednego elementu* (ang. *leave one out method*). Tę metodę zastosowano, dla oceny klasyfikacji z użyciem reguły k -najbliższych sąsiadów zarówno w prezentowanych badaniach klinicznych (u pacjentów z chorobami nerwowo-mięśniowymi i reumatycznymi), jak i w modelowych badaniach oddechowych (z udziałem zwierząt). Metodę *minus jednego elementu* stosuje się i jest ona polecana w przypadkach małych zbiorów uczących [12]. Ogólnie procedura dla *metody minus jednego elementu* polega na klasyfikacji każdego obiektu u_i ze zbioru uczącego U , zawierającego m_U obiektów, z użyciem klasyfikatora zdefiniowanego/ „wyprowadzonego” ze zbioru $U - \{u_i\}$ (tj. zbioru pomniejszonego o klasyfikowany obiekt). Podobnie postępujemy w znanej metodzie „*jackknifing*”, a jej zaletą jest to, że korzystamy z kompletnego zbioru danych, bez tworzenia podzbiorów (podgrup). Oszacowaniem prawdopodobieństwa mylnej decyzji jest frakcja $E_{rU} = e_U / m_U$, gdzie e_U jest liczbą błędów. Frakcja błędów jest standardowym kryterium oceny klasyfikatora, z kolei informacja o rodzaju błędów jest przedstawiana jako *macierze przekłamań* R , *prawdopodobieństw* P lub *wiarygodności* Q (opisano macierze R , P i Q np. w pracy [8]).

W prezentowanym podejściu z klasyfikacją rozpoznawania obiektów ważnym etapem jest *selekcja cech* – w przyjętym modelu - *cechy te są tożsame z oznaczonymi/ obliczonymi parametrami/ markerami w prezentowanych badaniach*. Najogólniej, wśród wszystkich analizowanych cech, część z nich może nie mieć żadnego związku z rozważanymi klasami, część może zawierać informacje nadmiarowe, przez co mogą one nawet obniżyć/ „pogarszać” jakość klasyfikacji. Na *Rysunku 6* zilustrowano taką hipotetyczną sytuację, na przykładzie *dwóch cech* X i Y , które pojedynczo nie mają żadnego znaczenia w *rozpoznaniu trzech klas: klasy 1 (kółka), klasy 2 (prostokąty) i klasy 3 (trójkąty)*, ale razem w zestawie są idealną kombinacją cech dla rozpoznania rozważanych klas, oferując najlepszą jakość klasyfikacji, tutaj perfekcyjne rozpoznanie ($E_r=0$). Najlepszą procedurą dla selekcji cech jest *przegląd wszystkich możliwych kombinacji spośród n cech, i dla każdej z nich oszacowanie prawdopodobieństwa mylnej decyzji (E_r) oraz wybór spośród wszystkich kombinacji tej z nich, która oferuje najniższą wartość błędu E_r* . Warto jednak zauważyć, że *liczba możliwych kombinacji cech rośnie wraz ze wzrostem liczby n cech i równa jest $2^n - 1$* . W prowadzonych badaniach w przyjętym modelu klasyfikacji użyto procedurę przeglądu wszystkich kombinacji cech, gdyż liczba analizowanych cech/ zmiennych/ parametrów nie była aż tak duża, aby wymagała oszczędnych obliczeniowo procedur przeglądu tylko niektórych kombinacji cech. Do takich „szybkich/ oszczędnych” procedur należą m.in. algorytmy polegające na: (a) kolejnym dołączaniu cech, bądź (b) kolejnym odrzucaniu cech z zestawu wszystkich cech, bądź też (c) kombinacji ich dołączania i/lub odrzucania [12]. We wcześniejszych własnych badaniach takie procedury również były testowane w modelach biologicznych [13].

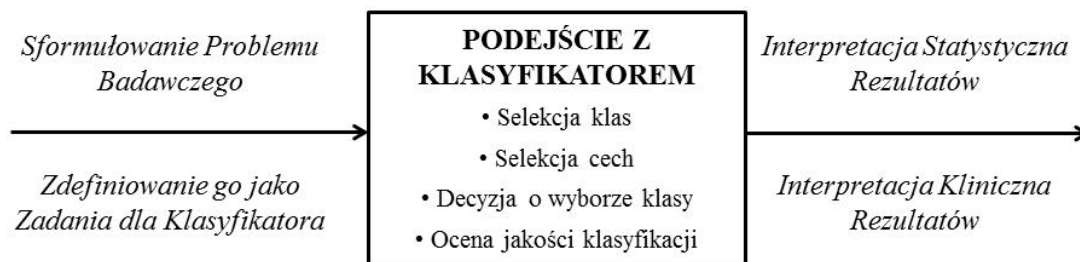
Kolejnym ważnym zagadnieniem jest pytanie o „status nowych obiektów w zbiorze uczącym U ”. Klasyfikacja nowych obiektów (czyli obiektów spoza „aktualnego/ bieżącego” zbioru uczącego) jest przeprowadzana na podstawie klasyfikatora skonstruowanego z użyciem pełnego/ uzupełnionego zbioru uczącego U . Nowe obiekty (o znanej przynależności do klas), są włączane do dotychczasowego zbioru uczącego, a zatem są podstawą do „*douczenia*” klasyfikatora, czyli wyprowadzenia nowej reguły klasyfikacji w oparciu o pełną uzyskaną informację, czyli z nowymi danymi (np. w sytuacji gdy badania są nadal prowadzone/ kontynuowane). Taką strategię zastosowano w podejściu modelowym z algorytmami klasyfikacyjnymi w prowadzonych i przedstawionych badaniach, uaktualniając

bazy danych/ wyników w kolejnych analizach/ ocenach znaczenia parametrów/ zmiennych, bądź w metaanalizach, czyli „douczając”, jeżeli było to wskazane, klasyfikator/ klasyfikatory, i w efekcie wyprowadzając reguły klasyfikacji w oparciu o cały/ uzupełniony/ bądź uzupełniany na bieżąco i weryfikowany zbiór uczący (strategie te stosowano w podejmowanych problemach i zagadnieniach badawczych, np. przeprowadzona metaanaliza dotychczasowych wyników badań u pacjentów w pracach [14-16]).



Rysunek 6. Ilustracja sytuacji, gdy dla badanych obiektów z trzech różnych klas, dwie cechy tych obiektów: cecha X i cecha Y pojedynczo są nieistotne dla rozpoznania tych klas, ale razem tworzą zestaw perfekcyjnie różnicujący rozważane klasy: kółek - klasa 1, prostokątów - klasa 2 i trójkątów - klasa 3. Panel A: przyjęty model klasyfikacji z włączeniem przeglądu zestawów cech (w tym przypadku są to $\{X\}$, $\{Y\}$ i $\{X,Y\}$). Panel B: wartości cechy X (górny panel) i cechy Y (dolny panel) w każdej z klas 1,2,3. Obszary klas znacząco pokrywają się: po zrzutowaniu punktów/obiektów na oś cechy X, jak i na oś cechy Y, klasy są bardzo trudno rozdzielne i użycie pojedynczo którejkolwiek z tych cech nie ma sensu. Panel C: analiza obu cech razem pozwala już bezbłędnie zidentyfikować przynależność każdego obiektu do właściwej mu klasy (tj. bezbłędna diagnostyka/rozpoznanie punktów-obiektów).

Na Rysunku 7 podsumowano dotychczasowe rozważania na temat podejścia badawczo-analitycznego z zastosowaniem metod klasyfikacji nadzorowanej. W tym podejściu problem badawczy był formułowany również jako konkretne zadanie dla klasyfikatora. Otrzymane wyniki interpretowano w kontekście nie tylko (a) ich istotności statystycznej, najniższych błędów mylnej klasyfikacji, (b) skuteczności rozpoznawania klas (czyli rozpoznawania grup osób badanych lub warunków eksperymentalnych w modelach z udziałem zwierząt), ale też i ich (c) istotności klinicznej (potencjalnego znaczenia np. w badaniach/ praktyce (bio)medycznej).

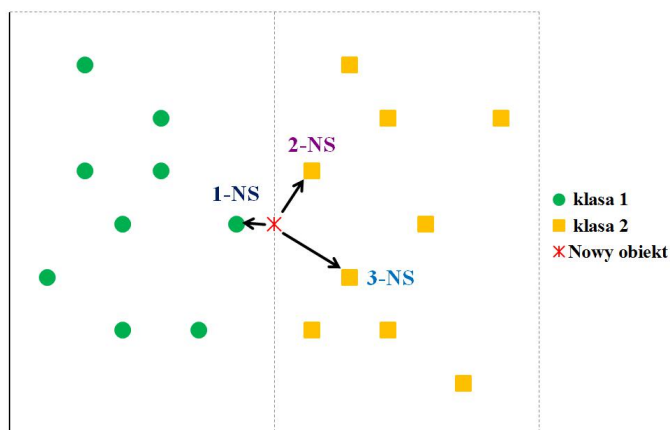


Rysunek 7. Uogólnione podejście badawczo-modelowe z zastosowaniem klasyfikacji (nadzorowanej).

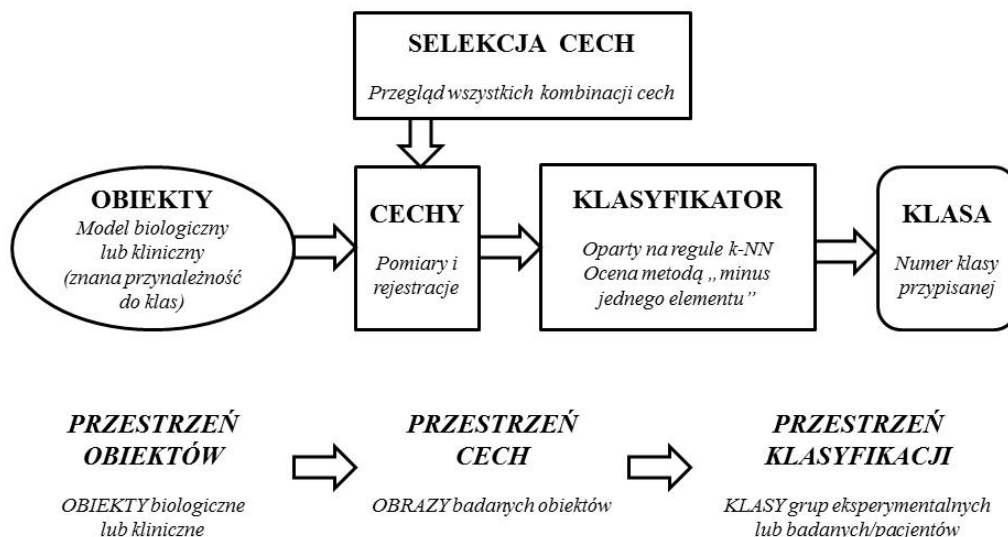
1.2. Klasyfikator k najbliższych sąsiadów

W podejściu badawczo-modelowym z użyciem metod klasyfikacyjnych, zarówno w badaniach klinicznych jak i w modelach eksperymentalnych, zastosowano (najefektywniejszy spośród klasyfikatorów) *klasyfikator działający wg reguły decyzyjnej k najbliższych sąsiadów* (ang. *k nearest neighbor*, k -NN) [17,18], który należy do ogólniejszej grupy klasyfikatorów minimalno-odległościowych. Podobieństwo obiektu do klasy mierzone może być np. jako funkcja odległości euklidesowej. Klasyfikator k -NN oferuje wysoką jakość klasyfikacji, w sensie prawdopodobieństwa poprawnej decyzji, w porównaniu do innych znanych algorytmów [19], i stąd jego wybór zastosowania w prowadzonych badaniach klinicznych i eksperymentalnych. Klasyfikator k -NN może być traktowany jako aproksymacja klasyfikatora bayesowskiego, dla którego prawdopodobieństwa nie są szacowane bezpośrednio, lecz z wykorzystaniem wzoru Bayesa. Klasyfikatory działające wg reguły k -NN mogą być stosowane dla dowolnej liczby klas. Liczba k najbliższych sąsiadów wyznaczana jest eksperymentalnie, z zastosowaniem jako kryterium frakcji błędów szacowanych „metodą minus jednego elementu”.

Na Rysunku 8 zilustrowano działanie standardowej reguły decyzyjnej k -NN. Klasyfikator działający wg reguły k -NN przyporządkowuje danemu *obiektowi* klasę, z której pochodzi większość spośród jego k najbliższych obiektów w zbiorze uczącym. Z kolei, Rysunek 9 ilustruje modelowe podejście z klasyfikatorem opartym na regule decyzyjnej k -NN, który zastosowano w badaniach.



Rysunek 8. Ilustracja działania standardowej reguły k -NS.



Rysunek 9. Uogólnione modelowe podejście z klasyfikatorem k -NN zastosowane w badaniach.

1.3. Krzywe ROC i binarny klasyfikator dla danych biomedycznych

W prezentowanych badaniach klinicznych włączono również klasyczną metodę analizy krzywych ROC, ang. Receiver Operating Characteristic curve [20,21]. Metoda wykreślenia i analizy krzywych ROC oparta jest na klasyfikatorze binarnym oraz zbiorze obiektów/osób badanych o znanym prawdziwym statusie przynależności do jednej z dwóch klas, jako wynik zastosowania „testu złotego standardu” lub innego „uznanego” testu klinicznego. Wg tego testu osoba jest kwalifikowana jako prawdziwie chora lub zdrowa. Porównując wyniki dla uznanego testu z wynikami dla nowego proponowanego testu (klinicznego) możemy porównać oba testy, tworząc i analizując tablicę kontyngencji 2×2 , jak zilustrowano w Tabeli 2.

Tabela 2. Przykładowy sposób przedstawiania wyników klasyfikacji dla klasyfikatora binarnego.

DECYZJE	Prawdziwa diagnoza/rozpoznanie kliniczne/eksperymentalne (klinicysta/badacz zgodne z uznanym testem)		
	Choroba/pacjenci (zmiana patologiczna)	Norma/zdrowi (kontrola)	Suma
Klasyfikacja wg nowego testu (klasyfikator/algorytm)			
Choroba/zmiana	A (TP)	B (FP)	$A+B$
Norma/kontrola	C (FN)	D (TN)	$C+D$
Suma	$A+C$	$B+D$	$A+B+C+D$

Przyjęte oznaczenia:

A – liczba przypadków kwalifikowanych przez nowy algorytm rozpoznawania i badacza jako zaburzenie – przypadki prawdziwie dodatnie (ang. true positive, TP), czyli liczba pacjentów chorych poprawnie sklasyfikowanych przez klasyfikator/algorytm,

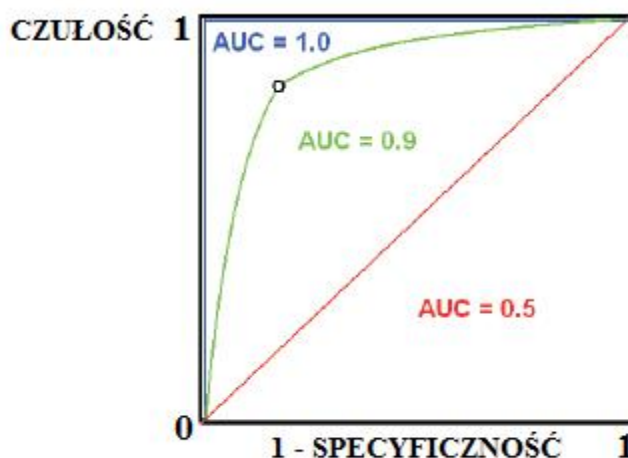
B – liczba przypadków klasyfikowanych przez algorytm jako normę, a przez badacza/lekarza jako zaburzenie – przypadki fałszywie dodatnie (ang. false positive, FP), liczba tych zdrowych, których klasyfikator błędnie zaklasyfikował jako chorych,

C – liczba przypadków uznanych przez klasyfikator za zaburzenie, a przez uznany test diagnostyczny za normę – przypadki fałszywie ujemne (ang. false negative, FN), czyli liczba chorych, których nowy algorytm błędnie sklasyfikował jako zdrowych,

D – liczba przypadków klasyfikowanych w normie przez klasyfikator i zdiagnozowanych w oparciu o kryteria kliniczne (klinicysta) lub wyznaczone zgodnie z założeniami procedury eksperymentalnej (badacz) – przypadki prawdziwie ujemne (ang. true negative, TN), czyli zdrowi poprawnie sklasyfikowani jako zdrowi,

(Przy ostatecznej klasyfikacji warto zwrócić uwagę, aby możliwie najmniej przypadków pozostało w polu C przy rozsądnej liczbie przypadków w polu B).

W prezentowanym podejściu analizy/ oceny markerów/ testów w badaniach z zastosowaniem klasyfikatora binarnego ważne są trzy wskaźniki (parametry statystyczne) oceny klasyfikatora: (a) *jakość rozpoznania*, (b) *czułość*, czyli zdolność do wykrywania rzeczywiście chorych pacjentów, i (c) *swoistość (specyficzność)*, czyli ocena w jakim stopniu klasyfikator wskazuje prawdziwie zdrowe osoby. Zgodnie z notacją przyjętą w Tabeli 2, powyższe wskaźniki można obliczyć według następujących wzorów: *jakość rozpoznania* = $(A+D)/(A+B+C+D)$, *czułość* = $A/(A+B)$, *swoistość* = $D/(C+D)$. Ponadto, zgodnie z informacją zawartą w Tabeli 2 mogą być obliczone również dodatkowe wskaźniki, takie jak: *predykcja dodatnia* = $A/(A+B)$, *predykcja ujemna* = $D/(C+D)$, *częstość zmiany* = $(A+C)/(A+B+C+D)$, *iloraz wiarygodności* = $[A/(A+C)]/[B/(B+D)]$. Jednakże interpretacja tych czterech ostatnich wskaźników wymaga pewnej ostrożności, szczególnie w przypadku analizy danych biomedycznych, stąd nie są one tak często stosowane, jak pierwsze trzy, czyli *jakość*, *czułość* i *specyficzność*. *Specyficzność* i *czułość* są podstawowymi parametrami/ zmiennymi dla wykreślenia krzywych ROC (Rysunek 10). Ogólnie, analiza krzywych ROC pozwala weryfikować nie tylko fakt popełnienia błędów klasyfikacji, ale także oceniać i identyfikować ich rodzaj.



Rysunek 10. Przykłady krzywych ROC. Każdy punkt na tej krzywej ma współrzędne [1-specyficzność; czułość]. Pole pod krzywą ROC (wartość AUC) jest miarą jakości danej metody klasyfikacji: pole AUC=0,5 oznacza losowy układ, zaś pole AUC=1,0 układ idealny.

W przypadku oceny różnych testów diagnostycznych/ klinicznych, krzywe ROC pozwalają na porównanie skuteczności tych testów (np. w warunkach występowania tej samej choroby), poprzez obliczenie pola powierzchni pod krzywą ROC (AUC, ang. Area Under Curve). Test z większym polem powierzchni AUC jest testem lepiej różnicującym/ rozpoznającym daną jednostkę chorobową. Analizę krzywych ROC wykorzystuje się bardzo często w przypadku poszukiwania i testowania oraz porównywania (bio)markerów różnych stanów chorobowych. W analizie krzywych ROC, np. marker o większym polu AUC względem innych markerów będzie bardziej związany z daną chorobą/ stanem pacjenta, i poprzez to może być skuteczniejszy w jej rozpoznaniu/ diagnozie. Przy właściwej kwalifikacji badanych do zdefiniowanych klas/ grup/ kategorii (np. osoba zdrowa versus chora) korzysta się też z metody, polegającej na wyznaczeniu granicznego „poziomu” badanego markera, czyli jego *wartości odcięcia* (ang. cut-off points). Wykorzystując krzywe ROC można wyznaczyć taką wartość graniczną markera, której odpowiada najmniejsza liczba błędnie zakwalifikowanych przypadków prawdziwych (wysoka specyficzność) oraz największa liczba prawidłowo zakwalifikowanych przypadków prawdziwych (wysoka czułość).

Reasumując, zgodnie z podejściem opartym na klasyfikatorze binarnym i krzywych ROC, system klasyfikacji powinien cechować się jak największą czułością, czyli możliwie jak najwyższą liczbą prawidłowych rozpoznań/ prawidłowych diagnoz, wraz z możliwą do przyjęcia/ zaakceptowania swoistością.

I.4. Podsumowanie podejścia badawczo-analitycznego i oceny istotności oraz znaczenia wybranych parametrów/ zmiennych klinicznych i biologicznych z zastosowaniem modeli z klasyfikacją nadzorowaną w badaniach

W ocenie i analizie metodami klasycznej statystyki matematycznej oparto się na:

- Ocenie istotności statystycznej klasycznymi testami statystycznymi dla miar centralnych (średnich z odchyleniem standardowym i/lub median z odstępami kwartylnymi) dla mierzonych/ obliczanych parametrów trajektorii posturograficznych, parametrów laboratoryjnych oraz składowych wzorca oddechowego i wentylacji płucnej;
- Analizie korelacyjnej i regresji;
- Wykreślaniu i analizie parametrów krzywych ROC.

W ocenie i analizie metodami rozpoznawania obrazów zastosowano:

- Ocenę wg modelu klasyfikacji opartym na regule decyzyjnej k -najbliższych sąsiadów dla klasyfikatora w wersji: (a) standardowej, (b) rozmytej, (c) klasyfikatora równoległego (głosowania dla składowych dwu-decyzyjnych klasyfikatorów równoległych), lub (d) w systemie hierarchicznym klasyfikacji.
- Procedury metodyczno-analityczne realizowano oraz wyniki/ rezultaty interpretowano zgodnie z opisem zaprezentowanym w Tabeli 3.

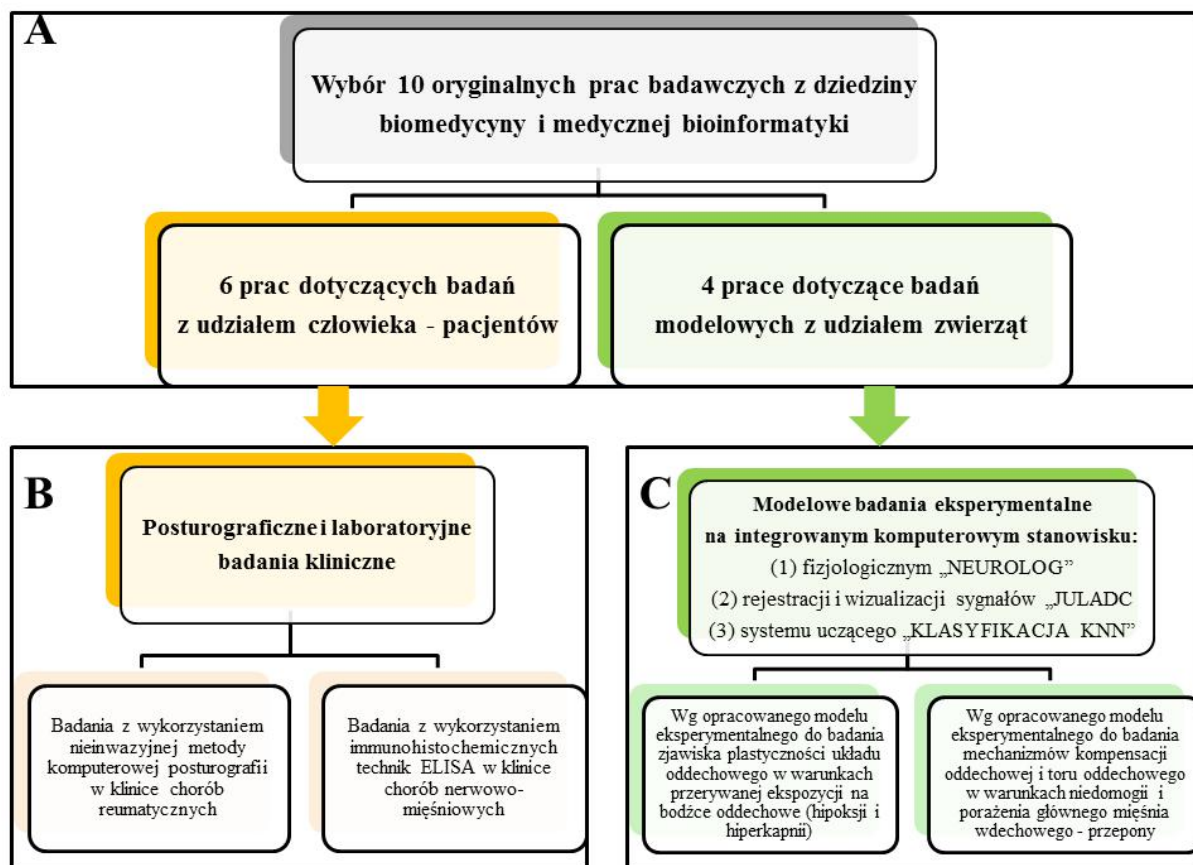
Zarówno w klasycznej analizie statystycznej, jak i użyciem opisanych metod rozpoznawania obrazów można zastosować podejście matematyczno-statystyczne, w którym: (a) obliczane są miary centralne dla pomiarów w badanych klasach/ grupach, jak w pracy [22], bądź (b) prowadzone są niezależne analizy dla każdego pojedynczego badanego obiektu, jak w pracy [23]), bądź (c) poprzez połączenie obu podejść w wariancie uwzględniającym przyjęte założenia i cele, jak w pracach [11,24].

Tabela 3. Przykład ogólnego opisu realizacji określonego zadania dla klasyfikatora.

KLASY Statystyczne	CECHY Statystyczne	ZBIÓR Istotnych Cech	BŁĘDY E_r Mylnej Klasyfikacji	ZADANIA
·Badane grupy ·Warunki eksperymentu biologicznego	·Parametry mierzonych (bio)sygnalów ·Parametry fizjologiczne	·Wskazanie cech ·Procedura selekcji cech wg kryterium najniższego błędu mylnej klasyfikacji	·Różnicowanie wszystkich klas z błędem globalnym E_r ·Różnicowanie dwóch klas z błędem szczegółowym E_r	·Sformułowanie celu klasyfikacji ·Opis zadania
PODSUMOWANIE najistotniejszych wyników i wnioski				

II. PRZEWODNIK PO PUBLIKACJACH

Prezentowane publikacje należą do dwóch bloków prowadzonych badań, pierwszy z nich dotyczy (a) badań klinicznych z udziałem pacjentów, drugi (b) badań modelowych z udziałem zwierząt (w których to badaniach po raz pierwszy testowano i wdrożono podejście z klasyfikacją nadzorowaną, a następnie zastosowano je również w badaniach klinicznych). Oba bloki prac badawczych zilustrowano na *Rysunku 11*.



Rysunek 11. Ogólne tematyczne zestawienie prezentowanych publikacji.

We wstępie wskazano, iż obecnie w prowadzonych badaniach przygotowanie i analiza danych/ wyników nie ogranicza się do jednej techniki, ale wykorzystywane są różne podejścia matematyczno-probabilistyczno-statystyczne. W ocenie informacji zawartej w (bazach) danych (bio)medycznych ważną rolę odgrywają statystyczne koncepcje i metodologie wykorzystujące zarówno testy eksperymentalne/ kliniczne, jak również coraz częściej statystyczne systemy uczące się, które włączono także w prezentowanych badaniach, wskazując na ich użyteczność zarówno w eksperymentach biologicznych jak i w praktyce medycznej. Zilustrowano wyniki takiego podejścia (w ocenie i analizie oraz perspektyw dla przyszłych badań) na podstawie wybranych trzech bloków tematycznych, dotyczących następujących realizowanych problemów badawczych:

- Wskazania istotnych parametrów posturograficznych z zastosowaniem statycznej posturografii u pacjentów z chorobami reumatycznymi, typu choroba zwyrodnieniowa stawów (*ang. osteoarthritis, OA*) oraz reumatoidalne zapalenie stawów (*ang. reumatoid arthritis, RA*), celem ilościowej oceny i analizy narządu ruchu, uwzględniającej typ i/lub postępowanie choroby, czy też efekty podjętej terapii i/lub rehabilitacji;

- Oceny istotności i znaczenia oznaczonych wybranych biologicznych/ laboratoryjnych markerów u pacjentów z chorobami nerwowo-mięśniowymi, typu stwardnienia bocznego zanikowego (*ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS*) oraz dystrofii mięśniowej Emery’ego-Dreifussa (*ang. Emery-Dreifuss muscular dystrophy, EDMD*), celem wskazania tych spośród oznaczonych markerów, które są lub mogą być: (a) związane z progresem choroby, (b) markerem o znaczeniu diagnostycznym, prognostycznym, i/lub pomocnym w poszukiwaniu/ wskazaniu potencjalnie skutecznych terapii;
- Oceny i charakterystyki (a) zmian wentylacji płucnej i wzorca oddechowego oraz (b) wczesnej odpowiedzi oddechowej w warunkach dysfunkcji głównego mięśnia wdechowego – przepony, jak również po ekspozycji na oddechowe bodźce chemiczne, typu przerywanej hipoksji i/lub hiperkapnii (*ang. intermittent hypoxia or hypercapnia*), w modelowych eksperymentach na zwierzętach, a dotyczących badania m.in. zjawiska wczesnej kompensacji (plastycznej) w układzie oddechowym.

W części 1 (*punkt II.1*) prezentowane badania kliniczne zostały zrealizowane we współpracy z Kliniką Rehabilitacji Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji im. prof. dr hab. med. Eleonory Reicher w Warszawie (NIGRiR), w części 2 (*punkt II.2*) - we współpracy z Zespołem Chorób Nerwowo-Mięśniowych w IMDiK PAN. Część 3 prezentacji (*punkt II.3*) dotyczy własnych eksperymentalnych/ modelowych badań nad układem oddechowym z udziałem zwierząt.

II.1. Publikacje prezentujące zastosowanie statycznej posturografii w klinice chorób układu ruchu, wraz z oceną istotności i znaczenia parametrów posturograficznych w diagnostyce różnicowej i/lub rozpoznaniu (typu) choroby

Praca nr 1 to: *Sokołowska B, Czerwosz L, Hallay-Suszek M, Sadura-Sieklucka T, Książopolska-Orłowska K: Posturography in Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. ADV EXP MED BIOL 2015, 2: 63-70.*

Praca nr 2 to: *Sokołowska B, Sadura-Sieklucka T, Czerwosz L, Hallay-Suszek M, Lesyng B, Książopolska-Orłowska K: Estimation of Posturographic Trajectory Parameters using k-Nearest Neighbors Classifier in Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. ADV EXP MED BIOL 2018, 39: 85-90.*

W cyklu wcześniejszych prac klinicznych (nie włączonych do autoreferatu), oceniano zastosowanie „nieinwazyjnej” metody statycznej posturografii w rozwiązaniu ważnych diagnostycznych zagadnień/ problemów dotyczących pacjentów z normotensyjnym wodogłowieciem (*ang. normal pressure hydrocephalus, NPH*) i pacjentów z zanikiem mózgu (*ang. brain atrophy, BA*) [25-27]. Cel wsparcia diagnostyki różnicowej w *NPH* i *BA* był wiodącym wątkiem w tych badaniach/ publikacjach, a obecnie realizowany jest z zastosowaniem nowej metody badawczo-analitycznej, opartej na analizie danych wolumetrycznych z tomografii komputerowej i/lub rezonansu magnetycznego (*CT/MRI, ang. Computed Tomography, Magnetic Resonance Imaging*) z wykorzystaniem nowego komputerowego systemu *VisNow* [28,29,15].

Prezentowane *Publikacje nr 1 i 2* należą do cyklu kontynuowanych badań posturograficznych z udziałem nowej grupy pacjentów, u których zmiany patologiczne w obrębie narządu ruchu wynikają z przebiegu choroby reumatycznej. Te badania kliniczne dotyczą pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (*ang. osteoarthritis, OA*) oraz pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (*ang. rheumatoid arthritis, RA*). *Choroba zwyrodnieniowa stawów (OA)* to postępujący proces chorobowy powodujący ból, zmiany strukturalne oraz funkcjonalne w zajętych stawach. Coraz częstsze występowanie tej choroby

ma m.in. związek z wydłużeniem czasu życia oraz z epidemią otyłości w populacji ludzkiej. Proces chorobowy w zwyrodnieniu stawów (*OA*) jest przyczyną utraty samodzielności. Leczenie przede wszystkim polega na łagodzeniu objawów bólowych, ale też ważnym aspektem terapeutycznym jest stosowanie zabiegów fizjoterapeutycznych, włączając w to także pomoce ortopedyczne oraz sprzęt ułatwiający poruszanie się. Z kolei, *reumatoidalne zapalenie stawów (RA)* jest chorobą autoimmunologiczną, w której zaburzone są mechanizmy obronne organizmu. Choroba zwykle nie ogranicza się jedynie do stawów, lecz powoduje uogólniony stan zapalny, np. w mięśniu serca, naczyniach krwionośnych, czy tkance podskórnej. *RA* różni się od zwykłego zapalenia kości i stawów tym, że „atakuję” niemal wszystkie stawy (w przypadku „zwykłego zapalenia” stan zapalny dotyczy jednego stawu).

W **Pracy nr 1** przedstawiono wyniki badań klinicznych dotyczących pacjentów leczonych w NIGRiR w Warszawie, w których to badaniach zastosowano testy kliniczne na (statycznej) platformie posturograficznej, celem oceny i analizy stabilności równowagi u badanych. W prezentowanych badaniach, w *pierwszym etapie* (a) rejestrowano trajektorie/ posturogramy u osób bez zmian patologicznych w obrębie narządu ruchu (grupa kontrolna) oraz u chorych ze zmianami reumatycznymi (grupa pacjentów z *OA* oraz *RA*), w *drugim etapie* (b) wyznaczano i obliczano wartości różnych parametrów opisujących te posturogramy, które w *kolejnym etapie* (c) poddano analizie i ocenie statystycznej oraz klinicznej. Podobnie, jak we wcześniejszych pracach nad wodogłowie normotensyjnym (*NPH*) i zanikiem mózgu (*BA*), badanie prowadzono na platformie posturograficznej w pozycji swobodnej stojącej z użyciem podstawowych testów (klinicznych) posturograficznych, tj. przy oczach otwartych (*ang. eyes open, EO*) oraz oczach zamkniętych (*ang. eyes closed, EC*). Dodatkowo (czego w poprzednich badaniach nie rejestrowano) zastosowano trzeci (nowy) test z elementem „wizualnego sprzężenia zwrotnego” (*ang. biofeedback, BF*). W teście *BF*, zgodnie z przyjętą metodologią, osoby badane miały możliwość wzrokowej kontroli położenia „wyświetlanego znacznika”, w celu utrzymania go w zadanym wyświetlonym polu na ekranie monitora. Znacznik ten był wizualizacją aktualnego położenia siły nacisku na stopy osoby badanej, *COP* (*ang. center of foot pressure*). W badaniu tym analizowano i oceniano następujące parametry/ zmienne posturograficzne: średni promień wychwiał *R* (*ang. average sway radius*), pole (rozwinętej) powierzchni *A* (*ang. developed area*) i długość trajektorii *TL* (*ang. total length*), oraz dwie składowe dla wychwiał: w płaszczyźnie czołowej *LRL* (*ang. left-right length*) i w płaszczyźnie strzałkowej *FBL* (*ang. forward-backward length*), a także obliczano dodatkowy parametr *BFC* dla testu *BF* (*ang. biofeedback coordination*, oznaczany jako parametr *BFC* lub *BF coordination*). Analizowano i porównywano wartości tych parametrów, macierze korelacji posturograficznych w trzech grupach badanych: kontroli osób zdrowych, pacjentów z *RA* oraz pacjentów z *OA*, a ponadto w pracy tej wykreślono i poddano analizie również krzywe *ROC* dla grupy *RA* i *OA*. U pacjentów z chorobami reumatycznymi analiza ich wyników dla trzech testów klinicznych wskazała na nieistotność tzw. *indeksu wzrokowego* (definiowanego w oparciu o wyniki w teście *EO* i *EC*), który w badaniach u pacjentów z *NPH* i *BA* był istotnym parametrem w diagnostyce różnicowej [27]. Wyniki przedstawione w *Pracy nr 1* wskazują, iż u pacjentów z poważnymi (wielo-stawowymi) zmianami reumatycznymi, zaproponowany dodatkowy test ze sprzężeniem zwrotnym na platformie posturograficznej jest testem czulszym od klasycznych klinicznych testów z *EO* i *EC*, i może być testem wskazanym dla oceny efektów podejmowanej terapii/ rehabilitacji, jak też przy wyborze tej formy leczenia, która jest najefektywniejsza dla danego pacjenta. Ponadto, jak wskazują wyniki kolejnych naszych badań oraz dane literaturowe, taka terapia/ rehabilitacja z włączeniem do niej ćwiczeń/ testów na platformie posturograficznej skutecznie poprawia zdolność do utrzymywania równowagi w życiu codziennym, i w efekcie przekłada się również na zmniejszenie liczby upadków, na co wskazują sami pacjenci, a co ma też wpływ na polepszenie funkcjonowania w życiu codziennym i poprawieniu jakości ich życia.

Praca nr 2 to kontynuacja badań na platformie posturograficznej u osób bez i ze zmianami reumatycznymi (u pacjentów) z zastosowaniem metod rozpoznawania obrazów i w oparciu o otrzymane wyniki dla trzech testów posturograficznych: *testu EO*, *EC* i *BF*. Zadaniem dla klasyfikatora było rozpoznanie każdej z klas (czyli badanych grup) na podstawie cech odpowiadających obliczonym parametrom zarejestrowanych, dla każdego badanego, trajektorii posturograficznych. W tym badaniu wybrano model klasyfikacji z klasyfikatorem opartym na regule decyzyjnej *k-NN* i z włączeniem procedury selekcji cech (*Rysunek 9*). Rezultaty tej analizy *k-NN* doprecyzowały ocenę jak też i wybór istotnych parametrów przeprowadzonego badania posturograficznego, jako potencjalnych parametrów/ markerów, np. w monitorowaniu skutków/ efektów progresu choroby i/lub podjętego leczenia. Jak wynika z przeprowadzonej analizy *k-NN*, wśród wyznaczonych cech statystycznych trajektorii posturograficznych, najlepiej różnicującymi badane grupy (a) w teście *EO* był promień *R*, (b) w teście *EC* pole *A*, zaś (c) w teście ze sprzężeniem zwrotnym parametr *BF coordination*. Ponadto, jak się należało spodziewać, najniższe błędy mylnej klasyfikacji E_r obserwowano w grupie pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (chorobą o cięższym przebiegu w stosunku do *OA*).

Podsumowując, prezentowane podejście metodyczno-analityczne w statycznej posturografii jest uniwersalnym narzędziem (jak wynika nie tylko z prowadzonych badań we współpracy z klinicystami, ale i z danych piśmiennictwa), które może być użyteczne w weryfikacji i/lub poprawieniu skuteczności diagnostyki klinicznej, szczególnie w przypadkach diagnoz trudnych lub „ryzykownych” mogących dodatkowo „obciążać” pacjenta. Ponadto, może być stosowane w ocenie i/lub porównaniu efektów i skuteczności różnych form/ programów terapii/ rehabilitacji u pacjentów z deficytami/ dysfunkcjami w obrębie narządu ruchu, również w badaniach dotyczących naturalnego procesu starzenia się, np. włączając dodatkowo trening na platformie posturograficznej w programy prozdrowotne. Warto też wskazać na fakt, że dotychczas nie opracowano „standardu” dla badania czy treningu posturograficznego, stąd konieczne są badania dla określenia najlepszych testów/ protokołów lub wyboru rodzaju platform przeznaczonych dla różnych grup pacjentów, a wsparciem w tym wyborze mogą być i są proponowane analityczne narzędzia i modele oceny stosowanych testów i komputerowych systemów rehabilitacji.

W prezentowanych kolejnych publikacjach, dotyczących badań klinicznych u pacjentów ze *stwardnieniem boczny z zanikiem* i u pacjentów z *dystrofią mięśniową typu Emery’ego-Dreifussa*, u tych chorych występuje postępująca dysfunkcja ruchowa, ale badania posturograficzne w tych grupach pacjentów były niedostępne.

II.2. Publikacje prezentujące poszukiwanie i porównanie istotnych biomarkerów w klinicznej prognosyce i/lub diagnostyce/ rozpoznaniu chorób nerwowo-mięśniowych i ich znaczenie

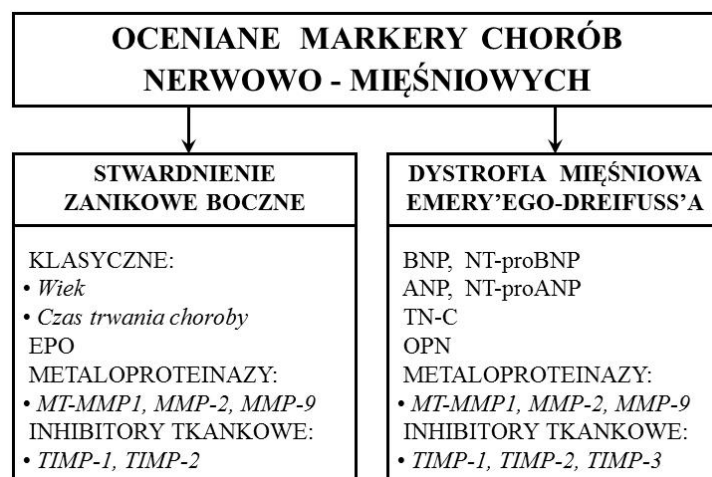
Praca nr 3 to: Janik P, Kwieciński H, **Sokołowska B**, Niebrój-Dobosz I: *Erythropoietin concentration in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. *J NEURAL TRANSM (VIENNA)* 2010, 117: 334-347.

Praca nr 4 to: Niebrój-Dobosz I, Janik P, **Sokołowska B**, Kwieciński H. *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. *EUR J NEUROL* 2010, 17: 226-231.

Praca nr 5 to: **Sokołowska B**, Józwick A, Niebrój-Dobosz I, Janik P, Kwieciński H: *Evaluation of matrix metalloproteinases in serum of patients with amyotrophic lateral sclerosis with pattern recognition methods*. *J PHYSIOL PHARMACOL* 2009, 60 (suppl 5): 117-120.

Praca nr 6 to: Niebrój-Dobosz I, **Sokołowska B**, Madej-Pilarczyk A, Marchel M, Hausmanowa-Petrusewicz I: Cardiovascular risk markers in dilated cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). *INT J CARDIOL* 2014, 173(2): 324-325.

Prezentowany w tej części cykl wskazanych czterech publikacji (i innych niewłączonych do autoreferatu) to efekt wieloletniej współpracy i udziału w badaniach w Zespole Nerwowo-Mięśniowym IMDiK PAN, prowadzonych pod kierunkiem prof. IMDiK PAN Ireny Niebrój-Dobosz. Badania skupiły się na analizie, ocenie i porównaniu znaczenia kolejnych wybranych potencjalnych markerów u pacjentów z chorobami nerwowo-mięśniowymi, jak zilustrowano na Rysunku 12.



Rysunek 12. Podsumowanie przedstawionych badań nad markerami w klinice chorób nerwowo-mięśniowych.

W przedstawionych badaniach zastosowano do oznaczania poziomu wybranych biomarkerów, w surowicy krwi (*ang. serum*) i/lub płynie mózgowo-rdzeniowym (*ang. cerebrospinal fluid, CSF*), immunoenzymatyczną metodę *ELISA* (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*). Wyniki badań laboratoryjnych i dane genetyczne stanowiły bazę dla wygenerowanych zbiorów i podzbiorów uczących w prezentowanym modelu z klasyfikacją (*Rysunek 9*) oraz dla krzywych *ROC*.

Prace nr 3-5 prezentują wyniki badań klinicznych u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym (*ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS*), u których zdiagnozowano postać sporadyczną *ALS* (*ang. sporadic ALS, sALS*). U osób badanych potencjalne markery, takie jak erytropoetyna (*ang. erythropoietin, EPO*) i wybrane metaloproteinazy (*ang. matrix metalloproteinases, MMPs*): *MT-MMP-1, MMP-2, MMP-9* oraz ich inhibitory tkankowe (*ang. tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMPs*): *TIMP-1, TIMP-2*, oznaczano w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym. Natomiast ostatnia w tym cyklu prezentowanych publikacji **Praca nr 6** jest przeglądem (metaanalizą) i podsumowaniem poszukiwań i oceny potencjalnych badanych biomarkerów u pacjentów z dystrofią mięśniową typu Emery'ego-Dreifussa (*ang. Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD*) W tej grupie pacjentów zostały przebadane też i kolejne markery, tym razem związane ze stresem oksydacyjnym [30].

Jak powyżej wspomniano, prezentowane w tej części badania kliniczne obejmują pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym (*ALS*) oraz pacjentów z dystrofią mięśniową Emery'ego-Dreifussa (*EDMD*). *Stwardnienie zanikowe boczne* jest rzadką chorobą neurodegeneracyjną, którą zalicza się do chorób neuronu ruchowego, rocznie notuje się około 4-6 zachorowań na 100 000 osób. Według Kryteriów *EL Escorial* chorobę *ALS* potwierdza występowanie klinicznych objawów uszkodzenia obwodowego i ośrodkowego

neuronu ruchowego w opuszcze i w dwóch innych segmentach rdzenia kręgowego lub uszkodzenia w trzech segmentach rdzeniowych. *ALS* może przebiegać w postaci opuszkowej (występują zaburzenia połykania i mowy, fibrylacje języka, zaniki mięśni języka z towarzyszącymi objawami osłabienia kończyn), postaci obwodowej (z uszkodzeniami neuronu obwodowego) bądź piramidowej (występują drżenia, wygórowane odruchy, objaw Babińskiego i wzmożone napięcie mięśniowe). Lokalizacja objawów w ok. 1/3 przypadków dotyczy kończyn górnych, ok. 1/3 kończyn dolnych, i ok. 1/3 objawów opuszkowych. *ALS* jest chorobą nieuleczalną (w odniesieniu do której brak jest skutecznego leczenia przyczynowego). *Przyczyny ALS są nadal niejednoznaczne*. U 10% pacjentów choroba ma podłoże genetyczne, a u pozostałych 90% chorych występuje postać sporadyczna *ALS*. Stwardnienie zanikowe boczne to choroba przewlekła, odbierająca stopniowo sprawność fizyczną, prowadząc do inwalidztwa, oraz oddziałująca na stan psychiczny. Ogólnie, osoby chore zmagają się ze stresem, depresją, lękami, bezsennością i wahaniem nastroju. Pacjenci objęci są wszechstronną opieką medyczną, mającą na celu poprawę jakości ich życia i zmniejszenia różnorodnych uciążliwości, pojawiających się wraz z coraz poważniejszymi objawami chorobowymi. Zaburzenia te potęguje i niedotlenienie spowodowane m.in. bezdechami i postępującą niewydolnością oddechową, która najczęściej jest też przyczyną zgonu. *Dystrofie mięśniowe* to z kolei grupa genetycznie uwarunkowanych chorób, u podłoża których leży zanik tkanki mięśniowej, jej zastąpienie tkanką tłuszczową i włóknieniem. Klinicznym obrazem tego procesu jest postępujące osłabienie i zanik mięśni. *Dystrofia mięśniowa Emery'ego-Dreifussa (EDMD)* to heterogenna genetycznie grupa dystrofii mięśniowych, która charakteryzuje się zajęciem mięśni szkieletowych i mięśnia serca. Jednostki chorobowe *EDMD* należą do chorób ultra rzadkich, ich częstość w populacji szacowana jest na około 4-8 na 1000 000 osób. W obrazie klinicznym *EDMD* dominują: wczesne przykurcze wielostawowe, usztywnienie kręgosłupa, powoli postępujący zanik i osłabienie mięśni grupy ramienno-strzałkowej oraz objawy sercowe. Chorzy objęci są poradnictwem genetycznym i otrzymują leczenie, które poprawia jakość ich życia, chroni przed powikłaniami kardiologicznymi i nagłymi zgonami sercowymi. Obecnie poznano różne typy dystrofii *EDMD*, które wynikają z mutacji genów kodujących białka jądrowe, jak np.: (1) postać zależną od emerynopatii, spowodowaną mutacjami w genie emeryny o dziedziczeniu recesywnym sprzężonym z płcią, oznaczaną jako *X-EDMD* lub *EDMD1* (ang. gene: *EMD* /protein: *emerin* /chromosome locus: *Xq28*), (2) postać zależną od laminopatii, skutek mutacji genu laminy i dziedziczy się ona w sposób autosomalnie dominujący, oznaczana jako *AD-EDMD* lub *EDMD2* (ang. gene: *LMNA* /protein: *lamin A/C* /chromosome locus: *1q22*), lub też dziedziczy się (3) autosomalnie recesywnie w postaci *EDMD3*, ponadto należą do tej grupy dystrofii (4) inne nowo rozpoznawane postacie od *EDMD4* do *EDMD7*. Prezentowane badania objęły grupę chorych ze zdiagnozowaną postacią typu *X-EDMD* oraz *AD-EDMD*, u których niepełnosprawność fizyczna wynikała z osłabienia mięśni szkieletowych, deformacji stawów wskutek przykurczów, a także ciężkich powikłań kardiologicznych. Odmienny jest przebieg choroby u tych chorych, których cechuje inny genotyp (postać *X-* vs. *AD-EDMD*, czyli *emerynopatia* vs. *laminopatia*), i u pacjentów z *AD-EDMD* z reguły obserwowany jest przebieg cięższy i szybciej prowadzi do ich niepełnosprawności.

W **Pracy nr 3** analizowano i oceniano klasyczne markery dla *ALS*, takie jak wiek pacjentów, czas trwania choroby, nasilenie i rodzaj objawów, oraz włączono do tej analizy ocenę poziomu stężenia erytropoetyny (*EPO*) w surowicy i w płynie mózgowo-rdzeniowym (*CSF*). *Erytropoetyna* jest hormonem/ cytokiną (powstającym głównie w nerkach i wątrobie) o szerokim spektrum aktywności biologicznej, np. (a) jest kluczowym czynnikiem regulującym erytropoezę (reguluje liczbę erytrocytów w układzie krążenia, zapewniając prawidłowe utlenowanie tkanek), (b) ma wpływ na angiogenezę (moduluje lokalny przepływ krwi oraz jej utratę po urazie naczyń), (c) pełni funkcję antyapoptyczną i przeciwzapalną

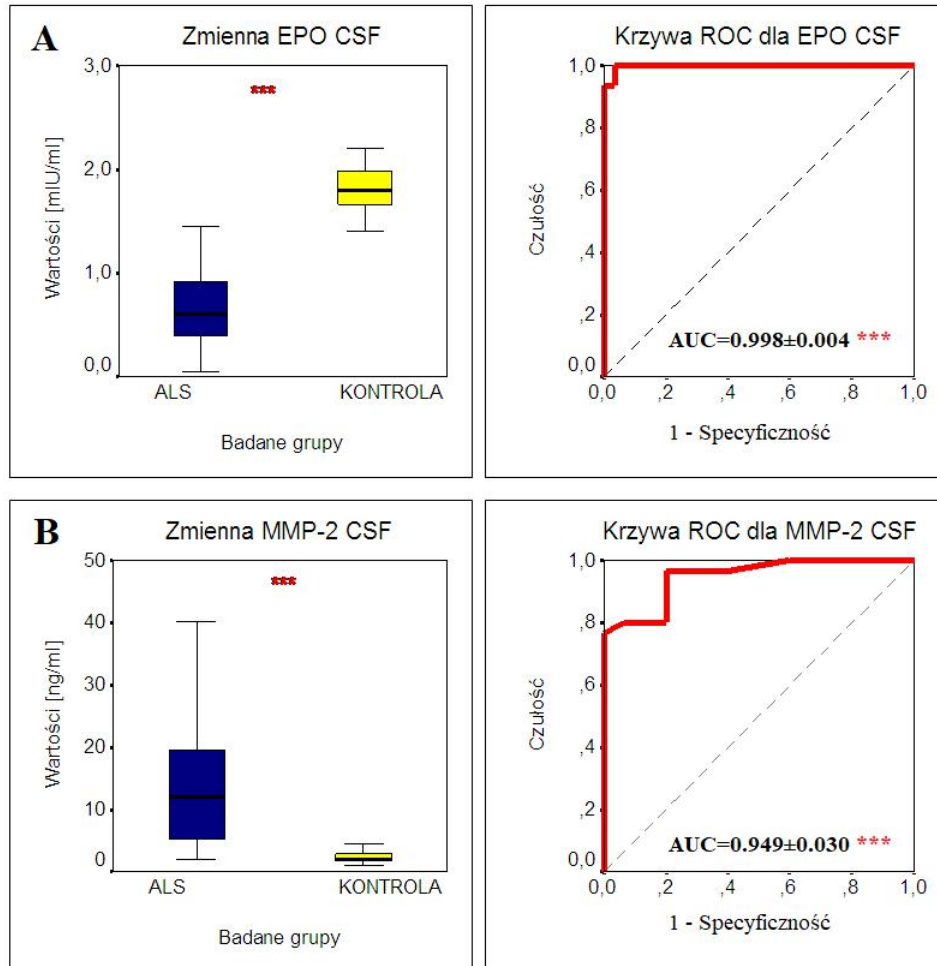
(np. zapobiega apoptozie w przebiegu zawału mięśnia sercowego), (d) posiada właściwości ochronne dla komórek układu nerwowego. Podsumowując, *EPO* ma cytoprotekcyjne właściwości, niezależnie od działania hematopoetycznego, w stosunku do komórek mózgu, serca, nerek i innych tkanek, a które polegają na zapobieganiu apoptozie i stresowi oksydacyjnemu (chroniąc komórki przed niekorzystnymi czynnikami, jak niedotlenienie, ekscytotoksyczność, ekspozycja na wolne rodniki tlenowe) oraz ułatwia regenerację tkanek i przywraca ich funkcję. *U badanych chorych z ALS obserwowano spadek stężenia EPO w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym.* Poziom *EPO* u pacjentów z łagodną i ciężką postacią choroby nie różnił się istotnie statystycznie, chociaż był istotnie statystycznie niższy względem grupy zdrowej kontroli. Wyniki badań laboratoryjnych wskazały, że zbiór wartości *EPO* u pacjentów z ciężkimi objawami stanowi podzbiór zbioru wartości *EPO* u pacjentów z łagodną postacią *ALS*. Porównano poziom *EPO* u pacjentów z postacią rdzeniową *ALS* (dominującą w badanej grupie chorych, 24/30) z poziomem u pacjentów z postacią opuszkową *ALS* (6/30). Chorzy z postacią opuszkową cechowali się niższym poziomem *EPO* w stosunku do postaci rdzeniowej *ALS* zarówno w surowicy jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym (*CSF*), ale spadek w *CSF* był znacząco i istotnie statystycznie niższy względem poziomu *EPO* w surowicy. Obniżony poziom *EPO* u pacjentów z *ALS* sugeruje, że podanie *EPO* celem wyrównania jej poziomu byłoby obiecującym kierunkiem w postępowaniu terapeutycznym. W istocie wyniki badań na modelach zwierzęcych oraz podejmowanych prób klinicznych wytyczają i taki kierunek w poszukiwaniu skutecznych strategii terapeutycznych dla chorych z *ALS*. Wskazuje się jednakże i na potencjalnie niekorzystne skutki takiej terapii, jako że podawanie zwiększonych dawek *EPO* może prowadzić do rozwoju nadciśnienia, retinopatii, powstawania zakrzepów czy obkurczania naczyń wieńcowych. *Kontynuację analiz i oceny znaczenia EPO jako markera choroby u pacjentów z ALS, z zastosowaniem modelu z klasyfikatorem k-NN w wersji standardowej (Rysunek 8), równoległej (Rysunek 4) i hierarchicznej (Rysunek 5), przedstawiono w pracy [8].* W tym podejściu modelowym zachowano kliniczny podział chorych według przebiegu *ALS*, definiując 3 podstawowe klasy, a były to: klasa I - osoby zdrowe (kontrola), klasa II - pacjenci z łagodną oraz klasa III - pacjenci z ciężką postacią *ALS*, oraz zaproponowano do oceny 4 cechy: cecha 1 - wiek osoby badanej, cecha 2 - poziom/ stężenie *EPO* w surowicy, cecha 3 - poziom *EPO* w *CSF*, cecha 4 - czas trwania choroby. Przeprowadzona ocena istotności cech/ tych zmiennych w różnicowaniu osób zdrowych i chorych z łagodną i ciężką postacią *ALS*, wg klasyfikatora *k-NN*, wskazała, iż zbiór cech {1,3,4} różnicuje 3 klasy z globalnym błędem mylnej klasyfikacji $E_r=0,11$. Najlepszą, po zastosowanej procedurze selekcji cech, cechą - kandydatem na markera - jest cecha nr 3, czyli *EPO* w *CSF*, która różnicuje pacjentów *ALS* względem zdrowej kontroli z nieznacznym błędem mylnej klasyfikacji $E_r=0,022$, oraz bezbłędnie był rozpoznawany ciężki przebieg *ALS*, $E_r=0,00$.

Praca nr 4 to kontynuacja badań klinicznych z kolejnymi potencjalnymi markerami dla *ALS*, tym razem z grupy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. matrix metalloproteinase, MMP*) i ich tkankowych inhibitorów (*ang. tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP*). *MMP* należą do rodziny wielodomenowych enzymów proteolitycznych (endopeptydaz) zawierających w centrum katalitycznym jon cynku. Występują one w postaci proenzymu lub pozostają związane z błonami komórkowymi. Aktywność *MMP* jest regulowana na poziomie transkrypcji, aktywacji prekursorowych zymogenów *proMMP* i oddziaływań z endogennymi inhibitorami *TIMP*. Odkryto cztery inhibitory tkankowe dla metaloproteinaz, od *TIMP1* do *TIMP4*. W warunkach patologicznych często obserwuje się wzrost aktywności *MMP*, jednocześnie spada poziom *TIMP* bezpośrednio odpowiedzialnych za aktywność *MMP*. Podstawową funkcją *MMP* jest degradacja i przebudowa przestrzeni/ macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. extracellular matrix, ECM*) i/lub błony podstawnej zbudowanej m.in. z kolagenu, żelatyny, elastyny,

fibronektyny, fibryny, lamininy, czy tenascyny, które są substratami dla *MMP*. Degradacja znosi fizyczne i strukturalne bariery, umożliwiając migrację komórek zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Zmiany w strukturze *ECM* towarzyszą procesom fizjologicznym, takim jak embriogeneza, angiogeneza, apoptoza, czy rozwój i odbudowa tkanki łącznej. Zaburzenia w układzie *MMP-TIMP* występują w wielu stanach patofizjologicznych, np. w chorobach neurologicznych (Alzheimera, stwardnieniu rozsianym), autoimmunologicznych (reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczeniu trzewnym układowym), sercowo-naczyniowych (chorobie wieńcowej), czy też nowotworach (płuc, szpiczaku mnogim, czerniaku złośliwym). Wśród *MMP* wyróżnia się wiele podgrup, różniących się nieznacznie strukturą czwartorzędową i swoistością substratową, wśród nich są (a) kolagenazy, (b) żelatynazy (gelatynazy), (c) stromelizyny, (d) *MMP* błonowe (ang. *membrane-type matrix metalloproteinases*, *MT-MMP*), oraz (e) inne. W **Pracy nr 4** przedstawiono wyniki analizy stężenia takich metaloproteinaz jak *MT-MMP-1* (*MMP transbłonowa*), *MMP-2* (gelatynaza A), *MMP-9* (gelatynaza B) oraz inhibitorów tkankowych typu *TIMP-1* i *TIMP-2*. U chorych na stwardnienie zanikowe boczne zaobserwowano, iż (a) w surowicy stężenie *MT-MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9* i *TIMP-1* było podwyższone, szczególnie u pacjentów z łagodną postacią *ALS*, a poziom *TIMP-2* był w normie, zaś (b) w płynie mózgowo-rdzeniowym stężenie *MT-MMP-1*, *MMP-2* i *TIMP-1* było podwyższone, *MMP-9* obniżone, zaś *TIMP-2* był w normie. W konkluzji dla znaczenia klinicznego, to zwiększony poziom tych badanych *MMP* i *TIMP-1* u pacjentów *ALS* może odzwierciedlać proces degeneracji motoneuronów mięśni szkieletowych i/lub związany z tym proces przemodelowania tkanek. Niski poziom *MMP-9* w *CSF* może być skutkiem osłabionego oddziaływania między *MMP-9* i *TIMP-1* i/lub degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzona równowaga w procesach powstawania i degradacji *ECM* w patogenezie *ALS* wymaga dalszych badań, ale zmiany relacji w układzie *MMP-TIMP* mogą być wykorzystane jako prognostyczny czynnik/ marker np. dla monitorowania efektów podejmowanych nowych strategii terapeutycznych. We wcześniejszej **Pracy nr 5** dotyczącej analizy wyników laboratoryjnych oznaczeń poziomu badanych metaloproteinaz w surowicy zastosowano po raz pierwszy model z klasyfikatorem *k-NN* w wersji standardowej, równoległej i hierarchicznej. W tej analizie *k-NN* cechy odpowiadały kolejnym *MMP*: cecha 1 odpowiada *MT-MMP1*, cecha 2 - *MMP-2*, cecha 3 - *MMP-9*, oraz włączono też cechę 4 - wiek osoby badanej oraz cechę 5 - czas trwania choroby. Zdefiniowano 3 klasy zgodnie z badanymi grupami. W procedurze z selekcją cech wskazanym zestawem cech, który najlepiej różnicował wszystkie klasy (z globalnym błędem mylnej klasyfikacji $E_r=0,089$) był zestaw/ wektor cech $\{1,2,3\}$. Natomiast cechą najlepiej różnicującą obie klasy/ grupy pacjentów była cecha 2, czyli *MMP-2* (z błędem $E_r=0,067$). Podobnie w płynie mózgowo-rdzeniowym najlepszym zestawem cech, różnicującym 3 klasy był zbiór zawierający *MMP* $\{1,2,3\}$ ($E_r=0,044$), oraz cechą najlepiej różnicującą progres choroby była również cecha 2, czyli *MMP-2* ($E_r=0,033$) [31], i jak wskazuje porównanie błędów mylnej klasyfikacji E_r , to były one najniższe dla oznaczeń markerów w płynie mózgowo-rdzeniowym.

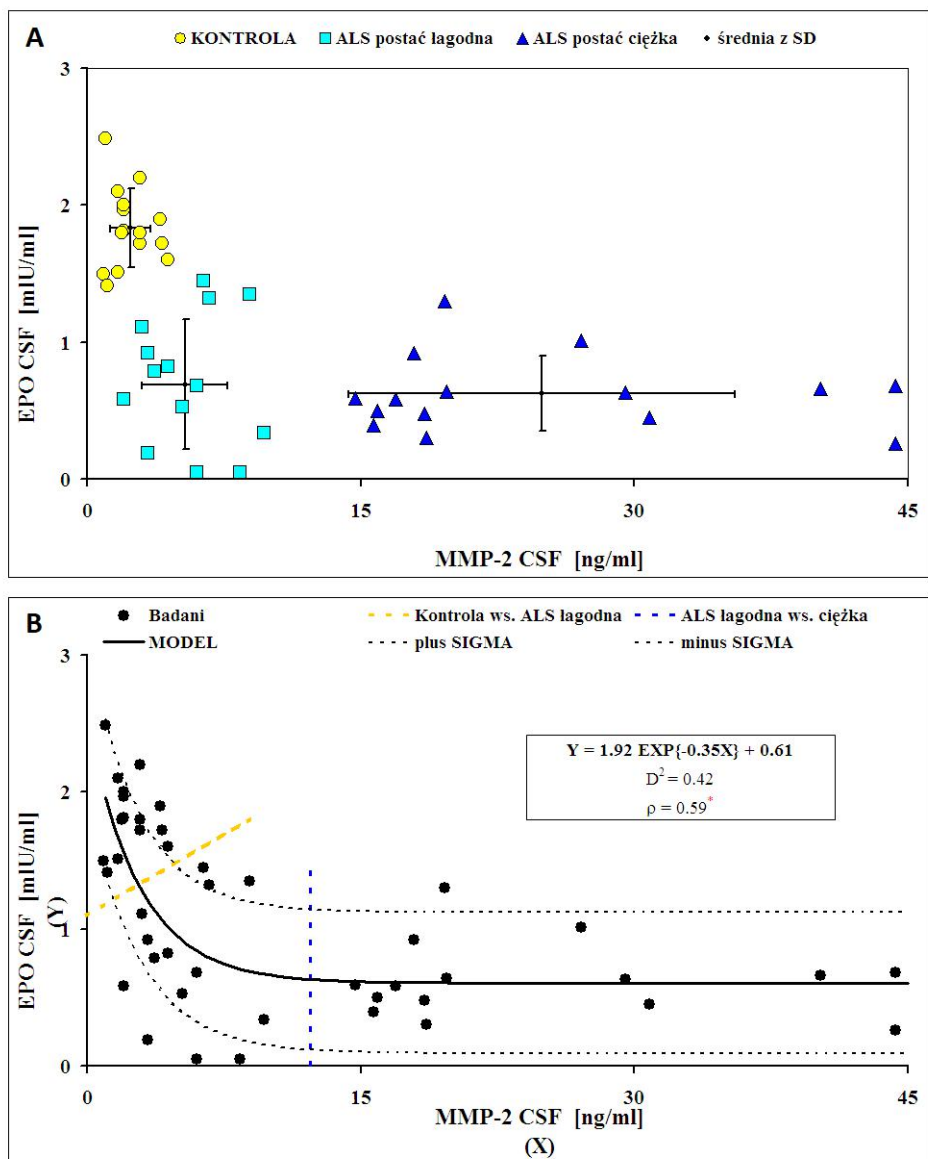
W konkluzji, przedstawione wyniki prowadzonych badań klinicznych i modelowych z klasyfikacją nadzorowaną nad biomarkerami dla *ALS*, wskazują iż zdecydowanym drugim, obok *EPO* (*Praca nr 3*) kandydatem na biomarkera jest *MMP-2* (*Praca nr 4 i 5*), przy czym oznaczony ich poziom w *CSF* pozwala na rozpoznanie badanych grup z najniższymi błędami mylnej klasyfikacji E_r . Zauważmy też, że zbiory uczące i wyprowadzone z nich reguły decyzyjne zostały zdefiniowane niezależnie od siebie w obu tych badaniach klinicznych. Stąd poprowadzono dodatkowo metaanalizę opartą o wyniki z tych badań łącznie, dla zbioru uczącego zawierającego oba podzbiory uczące się, jak również przeprowadzono analizę krzywych *ROC* [15] (czyli włączono proces „douczenia” klasyfikatora, opisany we „Wprowadzeniu”).

Otrzymane wyniki, które zilustrowano na *Rysunkach 13 i 14*, wskazują, iż oba te markery/parametry laboratoryjne oznaczone w płynie mózgowo-rdzeniowym, czyli zestaw cech {*EPO*, *MMP-2*} - zgodnie z analizą *k-NN* - cechuje perfekcyjna jakość klasyfikacji, oraz czułość i swoistość równe 1,0, co oznacza doskonałe rozpoznanie badanych grup ($E_r=0,0$). Zgodnie zaś z analizą krzywych *ROC*, dla *EPO* otrzymano wartości $AUC=0,998$, czułość=0,967 i specyficzność (swoistość)=1.000, oraz dla *MMP-2* wartości $AUC=0,998$, czułość=0,967 i specyficzność=0,800.



Rysunek 13. Prezentacja wyników jako median z odstępem kwartylnym i zakresem minimum-maksimum oraz krzywe *ROC* dla wskazanych dwóch markerów erytropoetyny (*EPO*) (panel górny A) i metaloproteinazy *MMP-2* (panel dolny B) oznaczonych w płynie mózgowo-rdzeniowym (*CSF*), na podstawie badań klinicznych przedstawionych w *Pracy nr 3 i 4* [15]. $P<0.001$ (***)

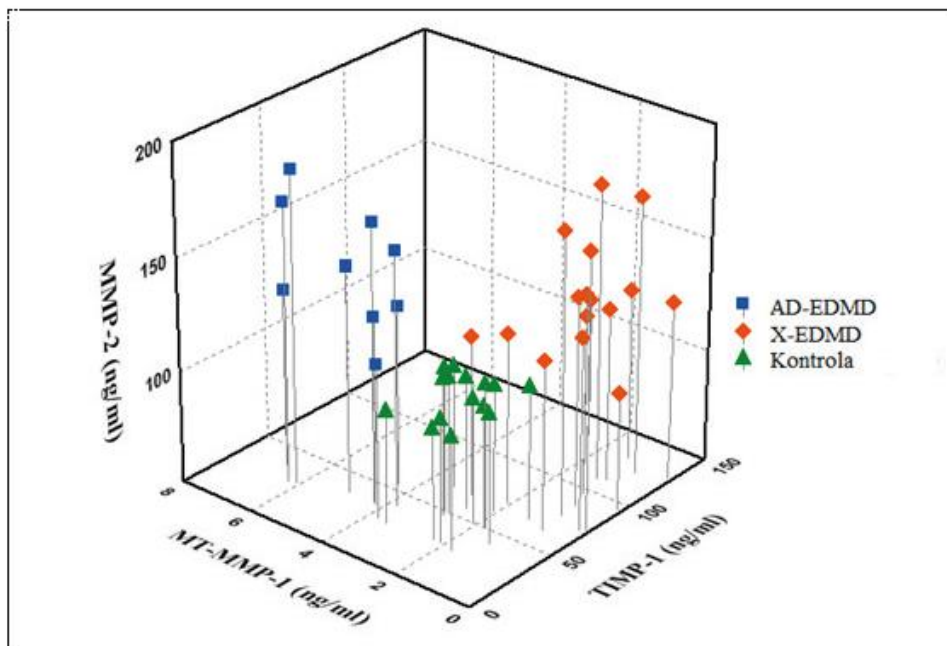
Podsumowując, z przeprowadzonej metaanalizy wyników badań klinicznych nad wybranymi potencjalnymi markerami łącznie, czyli ocena i porównanie znaczenia erytropoetyny oraz wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych u pacjentów ze sporadyczną postacią *ALS*, wynika, że dwa markery spośród nich razem w zestawie {*EPO*, *MMP-2*} w *CSF* pozwalają skutecznie diagnozować/rozpoznawać zarówno osoby chore, jak i różnicować/rozpoznawać postępowanie choroby w jej łagodnej i ciężkiej postaci, i jest to nowy interesujący wynik, który wnosi istotną wartość dodaną do tych badań.



Rysunek 14. Prezentacja wyników osób badanych (wartości średnie z odchyleniem standardowym, panel górny A) i modelu regresji (panel dolny B) dla wskazanych markerów oznaczonych w płynie mózgowo-rdzeniowym, na podstawie badań klinicznych przedstawionych w Pracy nr 3 i 4 [15].

Praca nr 6 wpisuje się w nurt podjętych badań nad poszukiwaniem istotnych markerów w chorobach nerwowo-mięśniowych, jako że równoległe z badaniami klinicznymi u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS), prowadzono badania u pacjentów z rozpoznaną dystrofią nerwowo-mięśniową Emery’ego-Dreifussa (EDMD), w jej dwóch postaciach: AD-EDMD i X-EDMD. W tych badaniach skoncentrowano się na ocenie potencjalnych markerów uszkodzenia mięśnia sercowego, które mogłyby być pomocne we wczesnym wykrywaniu niewydolności serca związanej z kardiomiopatią, prognozowaniu postępu choroby serca, jak też ocenie odpowiedzi na wdrożone leczenie. Z punktu widzenia pacjentów z dystrofią EDMD, leczenie objawów kardiologicznych jest najważniejsze, gdyż zajęcie mięśnia sercowego w przebiegu choroby może stanowić bezpośrednie zagrożenie ich życia. Dla tych chorych dostępnych jest szereg możliwości terapeutycznych od farmakoterapii poprzez elektroterapię do transplantacji serca.

W *Pracy nr 6* przedstawiono rezultaty metaanalizy oraz podsumowanie wyników badań szczegółowych, w których zastosowano klasyfikator binarny oparty na krzywych *ROC* (*analiza krzywych ROC*). Włączono do tej zbiorczej analizy i oceny porównawczej przebadane już markery, których poziom oznaczano metodą *ELISA* w surowicy, a były to: peptydy natriuretyczne (markery sercowe) takie jak *ANP* - przedsionkowy peptyd natriuretyczny i *BNP* - mózgowy peptyd natriuretyczny oraz *NT-proANP* (*N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu A*) i *NT-proBNP* (*N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B*), *tenascyna-C* i *osteopontyna* (białka, które odgrywają ważną rolę zarówno w procesach fizjologicznych i w patogenezie licznych schorzeń), oraz metaloproteiny takie jak *MT-MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-9* i ich inhibitory tkankowe *TIMP-1*, *TIMP-2*, *TIMP-3*. Przeprowadzona metaanaliza z zastosowaniem modelu z klasyfikatorem *k-NN* [32,16] wskazała iż w tym zestawie bardzo obiecujące są markery dla układu *MMP-TIMP*, które pozwalają nie tylko na rozpoznawanie chorych, ale również na różnicowanie pacjentów z formą *AD-* i *X-EDMD*, jak zilustrowano na *Rysunku 15*. Ten zestaw wskazanych markerów może wspierać zarówno diagnostykę jak też może być pomocny w monitorowaniu i prognozowaniu stanu chorych na dystrofię mięśniową Emery’ego-Dreifussa, włączając i ocenę efektów podjętego leczenia i rehabilitacji. Zauważmy, iż badania nad syntetycznymi inhibitorami *MMP* oraz możliwymi interakcjami i mechanizmami funkcjonowania układu *MMP-TIMP* wytyczają już nowe kierunki leczenia dla przywrócenia zaburzonej ich równowagi w różnych procesach i jednostkach chorobowych.



Rysunek 15. Przykład modelu rozpoznawania chorych z dystrofią *EDMD* i zdrowej kontroli w przestrzeni cech rozpiętej według proponowanych cech/ markerów układu *MMP-TIMP* [16].

W konkluzji dotyczącej wszystkich przebadanych potencjalnych markerów przedstawionych w *Pracy nr 6*, wyniki u pacjentów z *EDMD* wskazują, iż najlepszymi kandydatami na biomarkery przydatne w wykrywaniu kardiomiopatii rozstrzeniowej mogłyby być *osteopontyna*, *TIMP-3* i *MMP-2*, zaś w ocenie dysfunkcji skurczowej lewej komory serca – *tenascyna-C* i *NT-proBNP*. Korelacje pomiędzy niektórymi biomarkerami i parametrami echokardiologicznymi wskazują na możliwość ich wykorzystania w ocenie progresu procesu chorobowego, podobnie jak modelowy zestaw $\{MT-MMP-1, MMP-2, TIMP-1\}$. W tych badaniach zostały dodatkowo oznaczone również markery związane ze stresem oksydacyjnym [30].

Podsumowanie dotyczące zastosowania statystycznego podejścia/ modelowania z klasyfikacją (nadzorowaną) i systemami uczącymi się w badaniach klinicznych

Warto podkreślić, że przedstawione podejście analityczno-modelowe jest podejściem uniwersalnym i może być zastosowane w odkrywaniu i ocenie istotnych parametrów/ markerów dla różnych jednostek chorobowych, jak również dla zdefiniowanych określonych warunków eksperymentalnych i/lub klinicznych, w diagnostyce, prognostyce, ocenie i monitorowaniu efektów klinicznych podjętej terapii i rehabilitacji. Dokumentują to również otrzymane wyniki w prezentowanych pracach, które pochodzą z konkretnych zagadnień/ problemów z praktyki medycznej, łącznie z tymi, których nie włączono do prezentacji, ale zostały zamieszczone w spisie. Przydatność i skuteczność modelowania z klasyfikacją i systemami uczącymi wykazano już (1) w ocenie efektywności różnych testów klinicznych w badaniu posturograficznym u pacjentów z chorobami reumatycznymi, (2) w rozpoznaniu potencjalnych markerów progresu choroby u pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym, (3) wskazaniu biomarkerów w różnicowaniu/ diagnozowaniu różnych postaci dystrofii Emery'ego-Dreifussa na podstawie np. wyselekcjonowanych markerów układu *MMP-TIMP* i innych przebadanych markerów prognostycznych dla wsparcia opieki kardiologicznej nad tymi pacjentami, ponadto (4) w różnicowaniu terapeutycznego efektu przed i po implantacji zastawki w neurochirurgicznym leczeniu wodogłowia normotensyjnego, lub (5) w skutecznym różnicowaniu wodogłowia normotensyjnego i zaniku mózgu z wykorzystaniem nieinwazyjnej metody posturograficznej oraz w oparciu o system *VisNow* z obrazowaniem *CT/MRI*, które są obiecującymi metodami i algorytmami w przeciwieństwie do tej obecnie związanej z testem infuzyjnym, diagnostyki trudnej i obciążającej dla pacjenta [25-29,15].

II.3. Publikacje prezentujące zjawisko plastyczności oddechowej w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach oraz wskazanie istotnych zmian wzorca oddechowego i ich znaczenie

Praca nr 7 to: Sokołowska B, Pokorski M: Ventilatory augmentation by acute intermittent hypoxia in the rabbit. J PHYSIOL PHARMACOL 2006, 57 (Suppl. 4): 341-347.

Praca nr 8 to: Sokołowska B, Józwik A: Statistical evaluation of ventilatory patterns in response to intermittent hypoxia in the rabbit. J PHYSIOL PHARMACOL 2005, 56 (Suppl. IV): 203-207.

Praca nr 9 to: Sokołowska B, Józwik A: Distinguishing the strength of hypoxic stimulus in intermittent hypoxia. J PHYSIOL PHARMACOL 2007; 58 (Suppl. 5): 657-663.

Praca nr 10 to: Sokołowska B, Józwik A, Pokorski M: A fuzzy-classifier system to distinguish respiratory patterns evolving after diaphragm paralysis in the cat. JPN J PHYSIOL 2003, 53(4): 301-307.

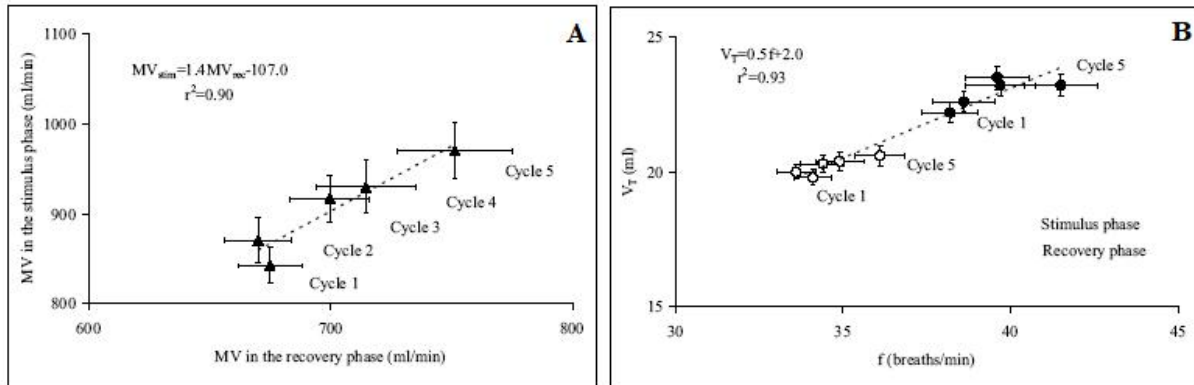
Ostatni cykl czterech publikacji, oraz inne prace nie włączone do prezentacji, przedstawia wyniki prowadzonych eksperymentalnych badań na różnych modelach zwierzęcych, które dotyczą fizjologii i patologii oddechowych wynikających z dysfunkcji mięśni oddechowych lub oddziaływania bodźców oddechowych typu hipoksji lub hiperkapnii i wywołanych/ indukowanych zmian plastycznych w układzie oddechowym. W badaniach tych zaproponowano, opracowano i przetestowano podejście analityczno-modelowe z nadzorowaną klasyfikacją i systemami uczącymi się, opartymi na regule decyzyjnej *k* najbliższych sąsiadów, które to podejście/ model następnie wdrożono/ stosowano w prezentowanych już badaniach klinicznych, jako wsparcie i/lub podstawę dla rozwiązania

konkretnych zagadnień/ problemów z praktyki medycznej (realizowanych w ramach współpracy naukowo-badawczej z różnymi grupami klinicystów).

Warto wspomnieć, że szczególnie w chorobach nerwowo-mięśniowych często dochodzi do takiego osłabienia mięśni oddechowych i niewydolności oddechowej, które wymagają początkowo tylko okresowo, a następnie już stałej wentylacji płuc. Na przykład, z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku chorych na stwardnienie boczne zanikowe, bądź też u pacjentów z dystrofią mięśni oddechowych (o czym wspomniano w rozdziale II.2). Niewydolność oddechowa to zaburzenie dostarczania tlenu lub odbierania dwutlenku węgla z tkanek organizmu, które doprowadza do stanu nieprawidłowych ciśnień parcjalnych (P_a) O_2 lub CO_2 obserwowanych w badaniu gazometrycznym krwi tętniczej, to jest takiego ich poziomu dla $P_aO_2 < 60 \text{ mmHg}$ (stan określany jako hipoksemia) lub $P_aCO_2 > 45 \text{ mmHg}$ (stan hiperkapnii). Niewydolność oddechowa w przebiegu chorób nerwowo-mięśniowych może mieć tło neurogenne lub pierwotnie mięśniowe. Może przebiegać ostro, podostro lub przewlekłe. Choroby nerwowo-mięśniowe przede wszystkim zaburzają fazę wentylacji oddychania. We własnych eksperymentalnych badaniach modelowych nad układem oddechowym, w warunkach zarówno fizjologicznych jak i eksperymentalnie wywołanej patologii oddechowej, badano i analizowano/ oceniano wentylację płuc i jej podstawowe składowe, wzorzec oddechowy (dla fazy wdechu i wydechu) oraz rejestrowano aktywność nerwową i mięśniową pompy oddechowej. Eksperymentalnym modelem do badania zjawiska plastyczności oddechowej jest zastosowanie na przykład przerywanej ekspozycji na bodźce oddechowe typu hipoksji (lub hiperkapnii), jak zaproponowano i przedstawiono po raz pierwszy we własnych badaniach u uśpionych swobodnie oddychających królików w **Pracy nr 7**, zrealizowanych wg pilotażowej wcześniejszej metodologicznej **Pracy nr 8**. W pracy tej opracowano i testowano, korzystając z metod rozpoznawania obrazów, protokół doświadczalny dla modelu indukcji oddechowych zmian plastycznych w odpowiedzi na krótkotrwałą przerywaną hipoksję (*ang. acute intermittent hypoxia*). Z kolei, w **Pracy nr 9** analizowano wpływ siły bodźca hipoksyjnego przy zachowaniu wzorca (sekwencji) jego ekspozycji na wentylację płucną i jej składowe z zastosowaniem klasyfikatora k - NN . Ostatnia prezentowana **Praca nr 10** przedstawia inny eksperymentalny model naśladujący dysfunkcję głównego mięśnia wdechowego przepony, w którym badano efekty wczesnej kompensacyjnej (kompensacji plastycznej) odpowiedzi oddechowej na odnerwienie przepony. W tym przypadku porażenie mięśnia było wynikiem całkowitego odnerwienia (poprzez leżę nerwów przeponowych), u uśpionych swobodnie oddychających kotów, W **Pracy nr 10** po raz pierwszy też w badaniach nad układem oddechowym zastosowano system klasyfikacji z rozmytą regułą k najbliższych sąsiadów.

Jak dotąd, nie ma opracowanych standardów dotyczących stosowania protokołów dla ekspozycji na różne bodźce oddechowe i efektów oddechowych (i innych) wynikających z ich stosowania [33-35]. Szczególnie dotyczy to wczesnych zmian wzorca oddechowego po krótkiej ekspozycji na przerywaną hipoksję (czyli sekwencję następujących po sobie ekspozycji tego bodźca) (*ang. acute intermittent hypoxia, IH*). W **Pracy nr 7** (jak wspomniano) po raz pierwszy zaproponowano eksperymentalny model do badania (wczesnej odpowiedzi) plastyczności oddechowej w eksperymentach u uśpionych swobodnie oddychających królików. Zaproponowany testowany protokół ekspozycji na przerywaną hipoksję był sekwencją pięciu 1-minutowych kolejnych ekspozycji na bodziec hipoksyjny (14% O_2 w N_2) przedzielonych 3-minutowymi fazami powrotu w warunkach normoksji. Stąd zdefiniowano 5 cykli, każdy cykl złożony z 1-minutowej ekspozycji na bodziec hipoksyjny oraz 3-minutowej fazy powrotu normoksyjnego. W takim układzie doświadczalnym obserwowano w kolejnych cyklach trend wzrostu wentylacji minutowej po każdej ekspozycji na hipoksję oraz utrzymywanie się podwyższonego poziomu wentylacji płucnej w

normoksyjnych powrotach (*Rysunek 16*). Zmiany wentylacji minutowej i jej składowych częstotliwościowej (f) i objętościowej (V_T) oceniano stosując zarówno klasyczne metody statystyczne (analizowane zmiany nie osiągały istotności statystycznej) jak i statystyczny model klasyfikacji oparty na standardowej regule k najbliższych sąsiadów.



Rysunek 16. Ilustracja wyników uzyskanych w proponowanym eksperymentalnym modelu badania efektów plastyczności oddechowej po ekspozycji na przerywaną hipoksję (IH) u uśpionych swobodnie oddychających królików przedstawiony w *Pracy nr 7 i 8*. Zilustrowane są: (panel A) zmiany wentylacji minutowej (MV) w każdym cyklu IH w kolejnych fazach ekspozycji na bodziec i w fazach powrotu normoksyjnego oraz (panel B) zmiany podstawowych jej składowych, czyli częstotliwości oddychania (f) i objętości oddechowej (V_T) [*Praca nr 7*].

W *Pracy nr 8* sformułowano 3 zadania rozpoznawania dla klasyfikatora: (1) rozpoznanie/różnicowanie 5-ciu faz ekspozycji na hipoksję; (2) rozpoznanie 5-ciu faz powrotu normoksyjnego; oraz (3) rozpoznanie 5-ciu cykli (każdy cykl to faza ekspozycji na bodziec i powrót po jego ekspozycji). Klasyfikację oparto na trzech cechach odpowiadających wentylacji minutowej (V_E) i jej składowym: cecha 1 - f ; cecha 2 - V_T oraz cecha 3 - V_E . Najniższy błąd mylnej klasyfikacji ($E_r = 0,15$) uzyskano w ostatnim zadaniu różnicowania dotyczącym rozpoznania cykli w oparciu o wszystkie cechy, co naturalnie ma odzwierciedlenie w obserwowanym wzroście wentylacji i jej składowych w obu fazach każdego cyklu IH, zaś w badaniu gazometrycznym krwi tętniczej obserwowano w podstawowej kontroli (przed ekspozycją na przerywaną hipoksję) ciśnienie parcjalne tlenu i dwutlenku węgla na poziomie dla $P_aO_2 = 76,7 \pm 3,9$ mmHg i $P_aCO_2 = 29,1 \pm 1,4$ mmHg, w fazie ekspozycji 5-tego cyklu były to odpowiednio wartości $P_aO_2 = 46,3 \pm 4,7$ mmHg i $P_aCO_2 = 23,7 \pm 2,0$ mmHg, oraz w fazie powrotu 5-tego cyklu wartości $P_aO_2 = 71,8 \pm 4,8$ mmHg i $P_aCO_2 = 24,9 \pm 2,3$ mmHg, które pozostały na tym poziomie jeszcze przez okres ponad 30 minut po ostatniej ekspozycji IH, jako efekt wzmocnienia odpowiedzi oddechowej (*ang. ventilatory long-term facilitation*) [*Praca nr 7*]. W *Pracy nr 9* porównano odpowiedzi oddechowe dla dwóch bodźców o różnej sile w eksperymentalnym modelu IH, tj. 14% (umiarkowany bodziec) i 11% (silny bodziec hipoksyjny) O_2 w N_2 , z zastosowaniem klasyfikatora k -NN. Porównanie efektów różnych protokołów doświadczalnych (jak należało się spodziewać) wskazuje na wzmocnienie odpowiedzi oddechowej po ekspozycji na silniejszy bodziec ($E_r = 0,007$).

W modelowych eksperymentach oddechowych u uśpionych swobodnie oddychających zwierząt rejestrowano i analizowano również aktywności EMG przepony i innych mięśni oddechowych oraz ENG nerwów przeponowych. Wyniki tych badań (nie włączonych do autoreferatu, a udokumentowanych w spisie publikacji), w których również obok analiz klasycznych stosowano algorytm rozpoznawania obrazów, wskazały jednoznacznie, że przede wszystkim zmiany oddychania oceniane zmiennymi/parametrami wentylacji minutowej (V_E) i jej podstawowych składowych (f , V_T) najlepiej odzwierciedlają wczesne

efekty oddechowe, zaś ocena gazometryczna krwi tętniczej jest wykładnikiem skuteczności uruchamianych mechanizmów oddechowych.

Praca nr 10 przedstawia eksperymentalny model badań nad układem oddechowym w warunkach dysfunkcji głównego mięśnia wdechowego przepony; w tym przypadku jego wyłączeniu z udziału w oddychaniu poprzez całkowite odnerwienie (leżę nerwów przeponowych), u uśpionych swobodnie oddychających kotów. W modelu tym badano efekty wczesnej kompensacyjnej odpowiedzi oddechowej na porażenie (odnerwienie) przepony (formy kompensacji plastycznej). W tej pracy przygotowano i po raz pierwszy w badaniach nad układem oddechowym zastosowano statystyczny *system klasyfikacji z rozmytą regułą k najbliższych sąsiadów* (ang. *fuzzy k-NN*), przydatny szczególnie w sytuacji znacznego pokrywania się obszarów klas.

W warunkach zaburzeń/ chorób układu oddechowego obserwuje się odmienny wzorzec oddychania w zależności od wzajemnej relacji pomiędzy V_T i f , stąd poszukiwano dominującej komponenty wzorca oddychania, która wspiera wentylację w badanych warunkach eksperymentalnych. Zgodnie z modelem doświadczalnym zdefiniowano zatem dwie klasy, odpowiadające warunkom prowadzonych doświadczeń, były to: klasa I dla oddychania z udziałem przepony (ang. *intact diaphragm*), oraz klasa II dla oddychania bez przepony, po jej odnerwieniu (ang. *denervated diaphragm*). Następnie zdefiniowano 6 cech opisujących efektywność oddychania i jego wzorzec, zgodnie z mierzonymi/ analizowanymi zmiennymi/ parametrami oddechowymi, czyli: częstość oddychania f (cecha 1), objętość oddechową V_T (cecha 2), wentylację minutową V_E (cecha 3), oraz dla wyników badania gazometrii krwi tętniczej, P_aCO_2 (cecha 4), P_aO_2 (cecha 5) i pH_a (cecha 6). W każdym doświadczeniu rejestrowano dwa zbiory danych: zapis oryginalny/ surowy dla kolejnych oddechów, oraz zbiór ich wartości uśrednionych (jak przedstawiono w Tabeli 4). Wyniki klasycznej analizy statystycznej (dla danych uśrednionych), jak i wyniki rozpoznawania wzorca z uwzględnieniem procedury selekcji cech, wskazały na istotne zmiany w zbiorze cech/ parametrów $\{V_E\downarrow, P_aCO_2\uparrow\}$, po porażeniu przepony.

Tabela 4. Opis i wyniki zastosowanego modelu klasyfikacji z rozmytą regułą k -NN w badaniach wg „Pracy nr 10”.

KLASY Statystyczne	CECHY Statystyczne	ZBIÓR Cech	BŁĘDY E_r Mylnej Klasyfikacji	PODEJŚCIE Rozmyta Reguła k -NN
I-Oddychanie z przeponą	1- f 2- V_T 3- V_E 4- P_aCO_2	Wszystkie cechy: {1,2,3,4,5,6}	$E_r=0,28$	Rozpoznawanie klas
II-Oddychanie bez przepony	5- P_aO_2 6- pH_a	Po selekcji cech: {3,4}	$E_r=0,19$	Analiza dla wartości uśrednionych
I-Oddychanie z przeponą	Wentylacja, jej składowe: f i V_T	Po selekcji cech 3 zbiory, wzorce : { f } albo { V_T } albo { f, V_T }	$E_r=0,00$	Rozpoznawanie klas
II-Oddychanie bez przepony	dla każdego indywidualnego doświadczenia (zwierzęcia)		za wyjątkiem jednego eksperymentu $E_r(nr4)=0,21$	Analiza dla nieuśrednionych oddechów
PODSUMOWANIE: W badaniach opisano podstawowe wzorce wczesnej kompensacyjnej odpowiedzi oddechowej, które są obserwowane w warunkach oddychania bez udziału głównego mięśnia wdechowego przepony w proponowanym modelu eksperymentalnym.				

W kolejnym etapie obliczeniowym, analizowano każdy eksperyment niezależnie od pozostałych, dla wentylacji V_E i jej podstawowych składowych, czyli cech f i V_T , opierając się na ich danych z zapisu sygnału surowego (nieuśrednionego). Dla zaproponowanej *rozmytej reguły k-NN* i po przeprowadzeniu dodatkowo procedury selekcji cech (*podejście modelowej analizy wg Rysunku 9*) bezbłędnie ($E_r=0,00$) rozpoznawano stan po porażeniu przepony, za wyjątkiem tylko jednego eksperymentu (*nr 4* dla którego $E_r=0,21$). W tym modelu eksperymentalnym wyznaczono i opisano kilka wzorców oddechowych uruchamianych w warunkach oddychania bez udziału głównego mięśnia wdechowego przepony. Zaobserwowano spadek wentylacji minutowej V_E i w następstwie tego wzrost poziomu CO_2 , jako konsekwencję porażenia przepony, po jej odnerwieniu (w krótkim czasie po lezji nerwów przeponowych). Najmniejszy spadek obserwowano, gdy następowało zwiększenie częstości oddychania po odnerwieniu mięśnia. Ten wzrost f pojawia się jako mechanizm kompensacyjny dla przeciwdziałania ubytkowi funkcji przepony. Pozostałe trzy zaobserwowane strategie kompensacyjne okazały się niewystarczające dla zachowania koniecznego poziomu spoczynkowej wentylacji płuc.

Podsumowanie, w prezentowanych badaniach eksperymentalnych wczesne efekty plastyczności oddechowej analizowano zarówno z zastosowaniem klasycznych metod statystyki matematycznej, jak i metodami - opracowanymi na potrzeby modeli eksperymentalnych - z wykorzystaniem algorytmów rozpoznawania obrazów i opartych na różnych wersjach reguły decyzyjnej *k-NN*. W proponowanym eksperymentalnym modelu „ostrej” przerywanej hipoksji (*ang. acute intermittent hypoxia*) pokazano, iż ekspozycja kilku cykli hipoksyjno-normoksyjnych jest w stanie wywołać znaczące zmiany wentylacyjne. Zmiany te odzwierciedlają plastyczność odpowiedzi oddechowej pogłębiającej się podczas trwających cykli niedotlenienia, i jej siła koreluje z liczbą cykli *IH*. Zwiększenie wentylacji, w odpowiedzi na te cykliczne epizody niedotlenienia, daje możliwość wglądu w mechanizmy „poprawy” oddychania poprzez trening w warunkach „przerywanej hipoksji”, coraz częściej stosowany zarówno w fizjologii sportu, jak i w medycynie. W innym eksperymentalnym modelu, zaprezentowano różne możliwe strategie wczesnej kompensacyjnej odpowiedzi oddechowej, która jest przykładem zjawiska kompensacji plastycznej w układzie oddechowym. Efekty oddechowe w tym modelu eksperymentalnym analizowano na poziomie wentylacji spoczynkowej przed i po porażeniu głównego mięśnia wdechowego również z zastosowaniem statystycznego modelu z klasyfikacją opartą po raz pierwszy na klasyfikatorze działającym według rozmytej reguły *k-NN*. Z praktycznego punktu widzenia wydaje się istotną możliwość przewidywania strategii kompensacji oddechowej na podstawie monitorowanych zmiennych fizjologicznych. Zastosowane modelowe podejście z regułą decyzyjną *k-NN* w tych badaniach eksperymentalnych skutecznie rozpoznawało/ różnicowało oddychanie z przeponą i bez jej udziału, a ponadto - po selekcji cech – wskazano kluczowe zmienne oddechowe w tej zmianie „toru” oddychania.

Podejście z zastosowaniem statystycznych systemów uczących jest równie skutecznym podejściem w rozwiązaniu przedstawionych problemów w badaniach eksperymentalnych jak i klinicznych.

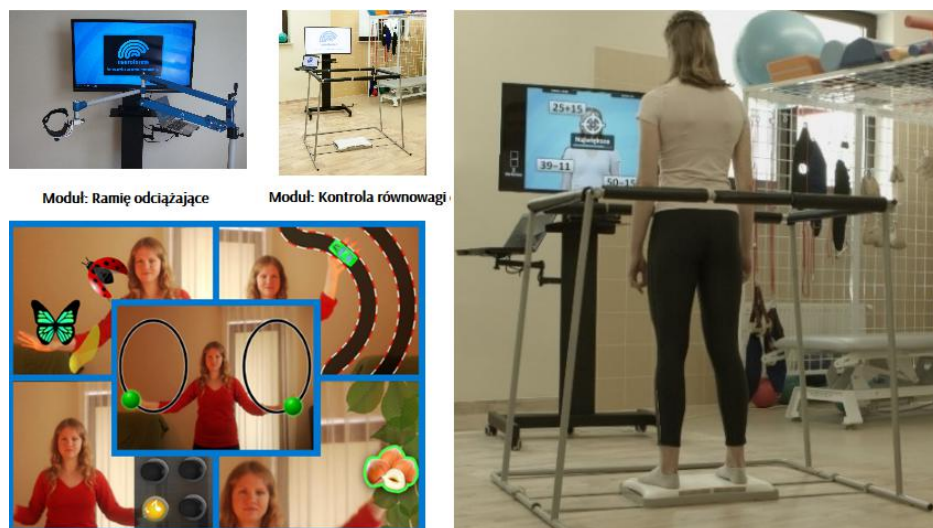
III. PODSUMOWANIE i przyszłe projekty badawcze jako rozszerzenie realizowanych badań

Moim osiągnięciem naukowym jest zaproponowanie, opracowanie, przygotowanie i przetestowanie nowych modeli zarówno eksperymentalnych jak i nowatorskich podejść/ procedur eksperymentalno-analitycznych, wykorzystanych początkowo we własnych badaniach eksperymentalnych, zarówno u uśpionych jak i u czuwających zwierząt.

Prowadzenie tych badań w obszarze procesów i zjawisk nie do końca jeszcze poznanych, dotyczyło badania i opisanie/ wskazania mechanizmów i strategii wczesnej odpowiedzi oddechowej na różnorodne ekspozycje bodźców oddechowych, u podłoża których leży (neuro)plastyczność układu oddechowego. Obserwowano i analizowano ją na poziomie plastyczności mięśni oddechowych, w tym różnej wczesnej kompensacyjnej aktywności głównego mięśnia wdechowego przepony (w modelowym eksperymencie stopniowego wyłączania jej funkcji aż do całkowitego porażenia mięśnia) wraz z oceną aktywności nerwów przeponowych oraz analizą zmian wentylacji płucnej i parametrów wzorca oddechowego.

W ramach realizowanych badań eksperymentalnych i klinicznych zastosowano modelowe podejście oparte na nowoczesnych metodach z obszaru sztucznej inteligencji, między innymi na algorytmach ze statystycznej teorii rozpoznawania obrazów z klasyfikacją nadzorowaną z regułą decyzyjną k -NN, która należy do jednej z najefektywniejszych nieparametrycznych metod klasyfikacji. Włączono w tym analitycznym modelu/ podejściu również klasyczne metody klasyfikacji jak analiza krzywych ROC, która oparta jest na klasyfikatorze binarnym. W przypadku algorytmów rozpoznawania obrazów stosowano różnicowanie pomiędzy wieloma klasami oraz procedurę selekcji cech (w oparciu o przegląd wszystkich możliwych ich kombinacji), zgodnie ze sformułowanym/ zdefiniowanym zadaniem dla klasyfikatora/ klasyfikatorów, na podstawie konkretnego zagadnienia/ problemu badawczego/ klinicznego. System klasyfikacji oparty na takim modelu jest systemem uniwersalnym i skutecznym narzędziem badawczym zarówno w pracy eksperymentalnej jak i klinicznej, czego dowodzą również przedstawione jego wdrożenia/ aplikacje w prezentowanych pracach (oraz nie włączonych do prezentacji, a zamieszczonych w spisie prac).

Obecnie prowadzone są badania - we współpracy z klinicystami - w dwóch wiodących tematach: (1) „Ocena statystyczna i kliniczna wybranych typów schorzeń oraz podjętej rehabilitacji u pacjentów”, oraz (2) „Badania nad układem ruchowym z zastosowaniem rozszerzonej/ wspomaganej i wirtualnej rzeczywistości” (przykład systemu wirtualnej rzeczywistości mającego zastosowanie w (tele) (neuro) rehabilitacji przedstawiono na Rysunku 17).



Rysunek 17. Przykład hybrydowego systemu do (tele) (neuro)rehabilitacji NEUROFORMY z wirtualną rzeczywistością firmy Titanis. Podobna wersja systemu została uruchomiona w PB IMDiK PAN).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje zainteresowania zawodowe od początku pracy naukowej, jako studentki-stażystki w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego PAN, koncentrują się na modelowaniu rzeczywistości materii żywej, poprzez tworzenie różnorodnych modeli/podejść. Modelowanie owe jest przydatne w badaniach doświadczalnych (typu „*in vivo*”, „*in vitro*”, czy „*in silico*”) oraz w badaniach klinicznych, w których zawarty jest element niepewności. Tym samym znajdują one zastosowanie w obszarach biologii medycznej, (bio)medycyny klinicznej i bioinformatyki medycznej. Potwierdzają to stosowane przeze mnie metody z obszaru bioinformatyki oraz statystycznych systemów uczących. Badania te dodatkowo ukierunkowane są na możliwie szeroki zakres potencjalnych zastosowań. Włączyłam się bowiem w badania interdyscyplinarne, zarówno eksperymentalne jak i kliniczne oraz informatyczno-komputerowe. Podjęte badania w 2015 na stanowisku adiunkta w Pracowni Bioinformatyki IMDiK PAN pozwoliły na kontynuację dotychczasowych prac, ale i poszerzenie obszaru moich zainteresowań i zakresu umiejętności o nowoczesne i innowacyjne techniki oraz metody obrazowania, symulacji i modelowania w wirtualnej rzeczywistości 3D i telemedycyny. Wyniki tych nowych wyzwań badawczych realizowanych w oparciu o najnowsze technologie już są publikowane lub recenzowane oraz prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach/ kongresach (co jest udokumentowane w spisie prac).

Dotychczas podjęłam i/lub uczestniczyłam w realizacji następujących zagadnień/ problemów badawczych (samodzielne i/lub we współpracy z różnymi grupami badawczymi):

- 1) Poszukiwanie, badanie i ocena (bio)markerów w klinice chorób nerwowo-mięśniowych, dotyczące nieuleczalnych rzadkich schorzeń, jak stwardnienie boczne zanikowe (*ALS*), dystrofia mięśniowa typu Emery’ego-Dreifussa (*EDMD*);
- 2) Opracowanie nowych podejść algorytmicznych dla systemów komputerowych dotyczące monitorowania, rejestracji, analizy i oceny: (a) danych/ sygnałów elektrofizjologicznych i pletyzmograficznych (np. w badaniu aktywności nerwowo-mięśniowej i wentylacji płucnej w modelach zwierzęcych), oraz (b) danych/ trajektorii posturograficznych i chodu (mogących mieć potencjalne zastosowanie np. w diagnostyce i/lub leczeniu/ rehabilitacji chorych z wodogłowiem normotensyjnym, ataksją lub zanikiem mózgu, czy chorób reumatycznych, a które mają wpływ na funkcjonowanie narządu ruchu);
- 3) W ramach badań podstawowych, eksperymentalne modelowanie schorzeń występujących w klinice, z zastosowaniem m.in. modeli zwierzęcych, bakteryjnych i hodowli komórkowych.

Szczegółowe zestawienie ważniejszych zrealizowanych zagadnień/ problemów i zadań w ramach współpracy z badaczami i instytucjami (udokumentowane wspólnymi publikacjami i doniesieniami konferencyjnymi o zasięgu zarówno krajowym i międzynarodowym):

- Udział w badaniach klinicznych związanych z analizą i oceną równowagi u pacjentów z chorobami reumatycznymi oraz efektów ich rehabilitacji, we współpracy z dr Teresą Sadurą-Sieklucką i prof. Krystyną Książopolską-Orłowską (NIGRiR w Warszawie) oraz mgr Martą Hallay-Suszek (ICM UW);
- Udział w badaniach klinicznych związanych z analizą i oceną równowagi i chodu u chorych z wodogłowiem normotensyjnym, ataksją i zanikiem mózgu, oraz diagnostycznego obrazowania i różnicowania pacjentów z wodogłowiem normotensyjnym i zanikiem mózgu; we współpracy z dr Leszkiem Czerwoszem, dr hab. Ewą Szczepek, prof. Zbigniewem Czernickim i prof. Jerzym Jurkiewiczem (IMDiK PAN i/lub Szpital Bielański im. J.

Popiełuszki w Warszawie), oraz dr Anną Sobecką (Instytut Neurologii i Psychiatrii w Warszawie);

- Udział w badaniach klinicznych dotyczących oceny różnych markerów w chorobach nerwowo-mięśniowych, m.in. w *ALS* i w *EDMD*, prowadzonych pod kierunkiem (senior) prof. IMDiK Ireny Niebrój-Dobosz w Zespole Nerwowo-Mięśniowym IMDiK PAN - kierowanym wówczas przez prof. Irenę Hausmanową-Petrusewicz, a obecnie przez prof. Andrzeja Kochańskiego; zaś w zakresie oceny, testowania i zastosowań algorytmów rozpoznawania obrazów w rozpoznawaniu/ diagnostyce/ prognostyce klinicznej realizowanych także we współpracy z prof. Adamem Józwikiem;
- Udział i podjęcie badań nad poznaniem mechanizmów naprawy egzocyklicznych adduktów zasad *DNA*, przez białka odpowiedzi adaptacyjnej w modelu bakterii *E.coli*, w Pracowni Chemicznych Podstaw Mutagenyzy i Reperacji Adduktów Egzocyklicznych w Zakładzie Biologii Molekularnej – wówczas pod kierownictwem prof. Jarosława Kuśmierka i we współpracy z dr. hab. Agnieszką Maciejewską. Aktualnie podjęto te badania w zakresie modelowania statystyczno-molekularnego (w tym dynamiki molekularnej);
- Uczestniczenie w badaniach doświadczalno-klinicznych, w tym przygotowanie i prowadzenie analiz matematyczno-statystycznych dotyczących m.in. analizy oksydacyjnych uszkodzeń *DNA* u pacjentów z nowotworami płuc, poznania mechanizmów naprawy uszkodzeń *DNA* m.in. w modelach zwierzęcych oraz bakterii *E.coli* i faga *M13*, realizowane w Pracowni Oksydacyjnych Uszkodzeń DNA Zakładu Biologii Molekularnej (ZBM) IBB PAN; także prowadzenie warsztatów statystycznych dla studentów i młodych pracowników naukowych; odbycie tutaj również stażu podoktorskiego. Następnie podjęcie pracy naukowo-badawczej w Pracowni Chemicznych Podstaw Mutagenyzy i Reperacji Adduktów Egzocyklicznych ZBM;
- Badania w dziedzinie eksperymentalnego modelowania fizjopatologii układu oddechowego. Badania koncentrowały się na poznaniu mechanizmów i strategii wczesnej kompensacji oddechowej w warunkach dysfunkcji mięśni oddechowych oraz wczesnej odpowiedzi oddechowej na ekspozycję oddechowych bodźców chemicznych w modelach zwierzęcych, u podłoża których jest (neuro)plastyczność układu oddechowego; ponadto aplikacja/ wdrożenie algorytmów i metod rozpoznawania obrazów na utworzonym komputerowym stanowisku laboratoryjnym do monitorowania/ rejestracji/ analizy sygnałów biologicznych.

Bibliografia

1. Jain KK (Ed.). The Handbook of Biomarkers. Springer Science+Business Media LLC 2017.
2. Jenkins M, Flynn A, Smart T i wsp. PHARM STAT. 2011; 10: 494.
3. Verber NS, Shepheard SR, Sassani M i wsp. FRONT NEUROL. 2019; 10: 291.
4. Scotton C, Passarelli C, Neri M i wsp. EXP CELL RES. 2014; 325(1): 44.
5. Straus SE, Glasziou P, Richardson WS i wsp. How to Practice and Teach EBM. Elsevier Publisher, Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St. Louis Sydney 2019.
6. Mayer D. Essential Evidence-Based Medicine. Cambridge University Press 2010.
7. Jain AK, Duin RPW, Mao J. IEEE TRANS PATTERN ANAL MACH INTELL 2000; 22(1): 4.
8. Józwik A, Sokołowska B, Niebroj-Dobosz I i wsp. INT J BIOMETRICS 2011; 3(1): 85.
9. Sokołowska B, Józwik A, Niebroj-Dobosz I i wsp. J PHYSIOL PHARMACOL 2009; 60(Suppl 5): 117.

10. Józwick A. PATTERN RECOGNIT LETT 1983; 1: 287.
11. Sokołowska B, Józwick A, Pokorski M. JPN J PHYSIOL 2003; 53(4): 301.
12. Devijver PA i Kittler J. Pattern Recognition: A Statistical Approach. Prentice-Hall, London 1982.
13. Sokołowska B, Józwick A. J PHYSIOL PHARMACOL 2003; 54(Suppl.1): 42.
14. Niebroj-Dobosz I, Sokołowska B, Madej-Pilarczyk A i wsp. INT J CARDIOL. 2014; 173(2): 324.
15. Sokołowska B. W: Maciąg M i Danielewska A (Red.), Problematyka z zakresu Medycyny i Nauk Pokrewnych – Przegląd i Badania. Tom 1, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2019, str. 198.
16. Sokołowska B. W: Maciąg M i Talarek K (Red.), Przegląd Zagadnień z Fizjoterapii i Sportu. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2020, str. 123.
17. Fix E, Hodges JL. Discriminatory Analysis: Small Sample Performance. Technical Report Randolph Field, TX. USAF School of Aviation Medicine 1952.
18. Bezdek JC, Chuah SK, Leep D. FUZZY SET SYST 1986; 18: 237.
19. Carpenter GA, Grossberg S. W: Chen CH (Ed.), Fuzzy Logic and Neural Network Handbook, NY McGraw-Hill 1996, str. 1.3.
20. Lasko TA, Bhagwat JG, Zou KH i wsp. J BIOMED INFORM 2005; 38: 404.
21. Kumar R i Indrayan A. INDIAN PEDIATRICS 2011; 48: 277.
22. Niebrój-Dobosz I, Janik P, Sokołowska B i wsp. EUR J NEUROL 2010; 17: 226.
23. Sokołowska B, Józwick A. W: Kurzyński M, Puchała E, Woźniak M i wsp. (Eds.) Computer Recognition Systems 2. Advances in Intelligent and Soft Computing 2007; 45: 778. Springer-Verlag Berlin, Heiderberg.
24. Sokołowska B, Józwick A. J PHYSIOL PHARMACOL 2004; 55(Suppl.3): 121.
25. Czerwosz L, Szczepiek E, Błaszczuk J i wsp. EUR J MED RES 2009; 14(Suppl. 4): 53.
26. Czerwosz L, Szczepiek E, Sokołowska B i wsp. W: Dr Sadip (Ed.) Hydrocephalus, InTech Publisher 2012; 12: 189.
27. Czerwosz L, Szczepiek E, Sokołowska B i wsp. ADV EXP MED BIOL 2013; 755: 311.
28. Szczepiek E, Sokołowska B, Czerwosz L i wsp. POST NAUK MED 2015; XXVIII(8): 617.
29. Czerwosz L, Szczepiek E, Nowiński K i wsp. ADV EXP MED BIOL. 2018; 1039: 83.
30. Niebroj-Dobosz I, Sokołowska B, Madej-Pilarczyk A i wsp. FOLIA NEUROPATHOL 2017; 55(3): 193.
31. Sokołowska B, Józwick A, Niebrój-Dobosz I i wsp. JMIT2009; 13: 147.
32. Sokołowska B, Józwick A, Niebroj-Dobosz I i wsp. JMIT 2014; 23: 165.
33. Mateika JH, Narwani G. EXP PHYSIOL. 2009; 94(3): 279.
34. Serebrovska TV, Serebrovska ZO, Egorov E. FIZIOL ZH. 2016; 62(3): 78-91.
35. Mateika JH, Panza G, Alex R i wsp. RESPIR PHYSIOL NEUROBIOL. 2018; 256:58.

dr n. med.
BEATA SOKOŁOWSKA
Beata Sokołowska