

بررسی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش دیده توموری به عنوان نشانگر زیستی برای پیش آگهی و تشخیص سرطان

Expression profile of tumor educated platelets as biomarkers for diagnosis and early detection of cancer

ساجده باهنر، فهیمه پالیزبان، حسام منتظری*

Sajdeh Bahonar, Fahimeh Palizban, Hesam Montazeri*

گروه بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، ایران

Department of Bioinformatics, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of
Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email:

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hesam.montazeri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۱)

چکیده

واژه‌های کلیدی

به این دلیل که بیوپسی مایع نسبت به بیوپسی بافتی ایمن تر و کم‌تهاجمی‌تر است، در سال‌های گذشته بررسی زیست‌نشانگرهای موجود در آن برای پیش‌آگهی و تشخیص زودهنگام سرطان حائز اهمیت شده‌است. بررسی تغییر پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری موجود در بیوپسی مایع می‌تواند به عنوان یکی از زیست‌نشانگرها مورد استفاده قرارگیرد. استفاده از مدل‌های یادگیری ماشین دسته‌بندی با توجه به فضای ویژگی برگرفته از داده‌های بیانی این پلاکت‌ها، توانایی پیش‌آگهی و تشخیص زودهنگام سرطان را به ما داده است. در این پژوهش میزان صحت و خطای هفت مدل دسته‌بندی در دو حالت دودسته برای تشخیص نمونه‌های سالم و سرطانی و چنددسته برای تشخیص نمونه‌های سالم و انواع سرطان‌ها از یکدیگر مورد ارزیابی قرارگرفتند. این مدل‌ها روی پروفایل بیانی ۲۰۰۰ ژن پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری مربوط به بیمارانی با سرطان‌های سینه، کبد، روده، مغز، پانکراس و ریه و همینطور پروفایل بیانی این ژن‌ها در ۵۵ فرد سالم بررسی شدند. داده‌های مورد استفاده سری GSE68086 هستند که از پایگاه داده GEO دانلود شدند. همچنین روی این ژن‌ها با روش preranked GSEA تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر صورت گرفت. نتایج نشان داد مدل ماشین بردارهای پشتیبان با کرنل خطی و غیر خطی از بین مدل‌های دودسته با میانگین خطای ۰/۰۵ و مدل ماشین بردارهای پشتیبان خطی از بین مدل‌های چنددسته با میانگین خطای ۰/۳۳ نرخ خطای کمتری دارند. به طور کلی نتایج حاصل دسته‌بندی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری و تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر نشان‌دهنده این است که پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری را می‌توان به عنوان کاندید نشانگر زیستی در نظر گرفت.

پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری،
پیش‌آگهی و تشخیص سرطان،
دسته‌بندی تغییرهای پروفایل بیانی،
مدل‌های یادگیری ماشین،
نشانگر زیستی

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 1, 2022

Abstract

Since liquid biopsy is less invasive than tissue biopsy, studies on liquid biopsy biomarkers for the early detection of cancer and diagnosis are taken into consideration. Expression profiles of tumor-educated platelets (TEP) in liquid biopsy can be used as one of the biomarkers. The use of classification machine learning models, according to the features space derived from the expression data of TEPs, has given us the ability to predict cancer. In this study, we evaluate different types of classification models namely SVM, LDA, logistic regression, boosting, classification tree, and random forest, on the expression profile of TEPs in 230 patients with breast, liver, colorectal, brain, pancreatic, and lung cancers, as well as the expression profile of these genes in 55 healthy individuals. These models were examined on the expression profile of 2000 high variance selected genes. Also, pathway enrichment analysis was performed on these genes by the GSEA preranked method. The results showed that linear SVM and polynomial SVM models have lower error rates than two-class models and linear SVM models have lower error rates than multi-class models. In general, the results of TEP expression profile classification and pathway enrichment analysis indicate that the expression profile of TEPs can be considered as candidate biomarkers.

Keywords: Tumor educated platelets, cancer diagnosis and early detection, expression profile classification, machine learning models, biomarkers

مقدمه

سیتوپلاسمی منشا گرفته‌اند. به عبارت دیگر پلاکت‌ها قطعه‌های سلولی بدون هسته هستند. نقش اصلی پلاکت‌ها شرکت در فرآیند انعقاد خون است. اما دو مشاهده مهم توسط پژوهشگران در سال‌های ۱۸۶۸ (Trousseau A. 1868) و ۱۸۷۸ (Billroth T. 1878) به عنوان نقطه عطفی برای دنبال کردن نقش پلاکت‌ها و ارتباط آن‌ها با تومور شناخته می‌شود. مشاهده اول وجود خون منعقد شده به صورت خودبخودی در بیماران سرطانی و مشاهده بعدی وجود سلول‌های سرطانی در لخته‌های خون ایجاد شده در این بیماران بود (In T Veld and Wurdinger. 2019). در مطالعه‌هایی که در سال‌های بعد از آن به صورت دقیق‌تر و مولکولی انجام شد مشخص شد که سلول‌های توموری مولکول‌های زیستی مختلفی را با ارتباط مستقیم یا با ویکول‌ها به پلاکت‌ها منتقل می‌کنند تا آن‌ها را تحت آموزش خود دریاورند و با این روش سبب تغییر در پروفایل بیانی پلاکت‌ها می‌شوند (Schlesinger. 2018). بنابراین بررسی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری در بیوپسی مایع بیماران سرطانی در مقایسه با افراد سالم می‌تواند نشانگر زیستی خوبی برای تشخیص و دنبال کردن روند

یکی از راه‌های تشخیص سرطان بررسی نشانگرهای زیستی موجود در بیوپسی مایع است. امروزه تشخیص سرطان به‌طور معمول با علایم بالینی، رادیولوژی یا تست‌های غربالگری صورت می‌گیرد که همراه شدن بیوپسی بافتی با آن‌ها می‌تواند تشخیص دقیق‌تری را به دست دهد. از آنجایی که بیوپسی مایع نسبت به بیوپسی بافتی ایمن‌تر و کم‌تهاجمی‌تر است، بررسی نشانگرهای زیستی موجود در آن برای تشخیص زودهنگام سرطان و دنبال کردن فرآیند پاسخگویی به دارو در بیماران دارای اهمیت بالایی است (Best et al. 2018). تاکنون چهار دسته نشانگر زیستی شامل اگزوزوم‌ها، سلول‌های تومور در گردش، cell-free nucleotides و پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری، در بیوپسی مایع مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Joosse et al. 2015).

امروزه در بیوپسی مایع پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری (TEP) به عنوان یکی از کاندیدهای نشانگر زیستی مورد توجه قرار گرفته است. آن‌ها پلاکت‌هایی هستند که از مگاکاریوسیت‌های موجود در مغز استخوان (Noetzli et al. 2019)، ریه‌ها (Lefrançois et al. 2017) یا طحال با فرایند اندوسیتوز و تغییرهای

درمان سرطان باشد (Varkey and Nicolaides 2021; Sun et al. 2021).

در دهه‌های گذشته یادگیری ماشین به خاطر توانایی ساخت مدل با استفاده از فضای ویژگی برگرفته از داده‌های آموزشی موجود و سپس پیش‌بینی پاسخ داده‌های آزمایشی در شاخه‌های علوم مختلف از جمله زیست‌شناسی و پزشکی مورد اهمیت قرار گرفته است (Larrañaga et al. 2006). به عنوان نمونه در سال‌های اخیر از یادگیری ماشین برای حل مسئله‌های محاسبه‌ای داده‌های ژنتیکی (Abbasi et al. 2020) از جمله سرطان (Khandezamin et al. 2020; Kourou et al. 2015; Tababaei et al. 2020) استفاده شده است. به عنوان یک مثال دقیق تر از مسئله‌های محاسبه‌ای برای سرطان، می‌توان به بررسی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری برای پیش‌بینی اینکه یک پروفایل بیانی مربوط به یک داده آزمایشی در دسته سرطانی یا سالم قرار می‌گیرد، اشاره کرد. در این راستا می‌توان یک مدل دسته‌بندی را با استفاده از یک مجموعه داده آموزشی تشکیل‌شده از نمونه‌های سالم و سرطانی آموزش داد. در پژوهشی در سال ۲۰۱۵، بست و همکاران با استفاده از پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری و مدل دسته‌بندی ماشین بردار پشتیبان برای پیش‌بینی دسته داده‌های آزمایشی استفاده کردند (Best et al. 2015). همچنین در پژوهش دیگری از روش دسته‌بندی هوش ازدحامی (SIEC) که در واقع ترکیبی از روش بهینه سازی ازدحام ذرات و ماشین بردار پشتیبان (SVM) است برای دسته‌بندی داده‌های بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری استفاده کردند. در پژوهش مذکور دستورالعمل جدید و مجزایی برای توالی یابی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری به نام thromboSeq ارائه شده است (Best et al. 2019). این پژوهشگران ایده پژوهش ذکر شده را روی نمونه‌های پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری مربوط به بیماران سرطان ریه و گلیوبلاستوما نیز مورد ارزیابی قرار داده‌اند (Best et al. 2017; Sol et al. 2020). همچنین در مطالعه دیگری از روش رگرسیون برازش چندگانه با تصمیم بیز برای دسته‌بندی داده‌های بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری (Huang et al. 2017) و در پژوهش دیگری نیز از روش imPlatelet که روشی بر پایه تبدیل پروفایل بیانی پلاکت‌های

آموزش‌دیده توموری به تصویر است برای دسته‌بندی نمونه‌ها استفاده شده است (Pastuszak et al. 2021).

تاکنون مدل‌های مختلفی برای دسته‌بندی داده‌ها از جمله مدل ماشین بردار پشتیبان خطی و غیرخطی، رگرسیون لجستیک و مدل‌های مبتنی بر درخت پیشنهاد شده است. در این پژوهش هدف بررسی عملکرد مدل‌های دسته‌بندی درختی، ماشین بردار پشتیبان خطی، ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای، رگرسیون لجستیک لاسو، بوستینگ، جنگل تصادفی و تحلیل تشخیصی خطی در دسته‌بندی پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری مربوط به نمونه‌های سالم و سرطانی به عنوان یک نشانگر زیستی است. همچنین هدف بررسی مجموعه ژن‌هایی است که در تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر در نمونه‌های بیمار نسبت به سالم غنی می‌شوند.

مواد و روش‌ها

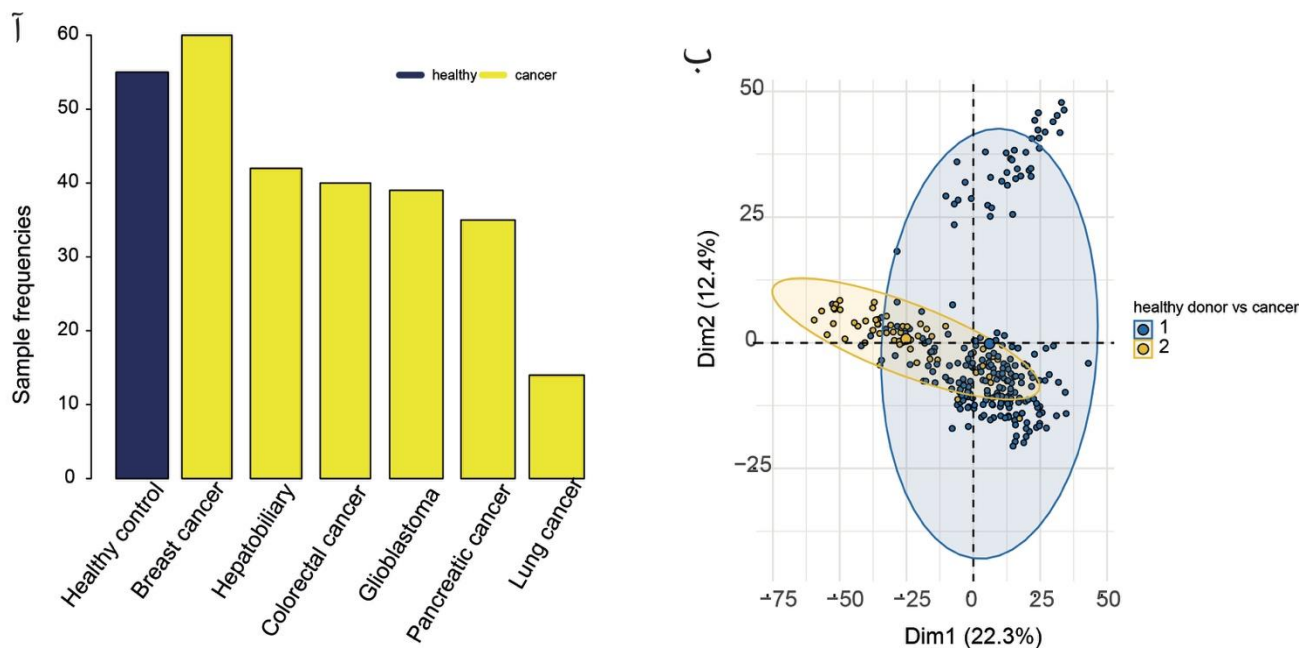
در این پروژه پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری مربوط به ۲۳۰ بیمار سرطانی (شامل ۶۰ نمونه سرطان سینه، ۴۲ نمونه سرطان کبد، ۴۰ نمونه سرطان روده، ۳۹ نمونه گلیوبلاستوما، ۳۵ نمونه سرطان پانکراس، ۱۱ نمونه سرطان ریه) در کنار پروفایل بیانی ۵۵ نمونه بیوپسی مایع از افراد سالم مورد بررسی قرار گرفتند (۱۹ درصد نمونه سالم و ۸۱ درصد نمونه سرطانی). این داده‌ها از پایگاه داده GEO (GSE68086) دانلود شدند. در شکل ۱- (آ) فراوانی این داده‌ها نشان داده شده است. سپس داده‌ها با استفاده از بسته edgeR و تابع cpm در R (Robinson et al. 2010) نرمال‌سازی شدند و ماتریس بیان ژن به ابعاد ۵۷۷۳۶×۲۸۵ به دست آمد. به دلیل بالابودن ابعاد فضای ویژگی نسبت به نمونه‌های موجود (۷~ برابر) ۲۰۰۰ ژن با بیشترین واریانس انتخاب شد و به این ترتیب فضای ویژگی جدیدی از بیان ژن‌ها در نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی شکل‌گرفت. در شکل ۱- (ب) دو ژن با بیشترین واریانس (PC1, PC2) انتخاب و پراکنش نمونه‌ها بعد از انتخاب ویژگی نشان داده شده است.

با ترکیب‌شدن با روشی مثل بوت استرپ (bootstrapping) عملکرد بهتری پیدا می‌کنند. برای این مدل‌ها نیز به ترتیب از بسته‌های (Ripley, 2016) tree، (Liaw and randomForest) Wiener. (2002) و (Alfaro et al. 2013) adabag در R استفاده شد.

همهٔ مدل‌های ذکرشده به جز مدل ماشین بردار پشتیبان قابلیت دسته‌بندی چنددسته را دارند. بنابراین از همان مدل‌های بوس‌تینگ، جنگل تصادفی، تحلیل تشخیصی خطی و بسته‌های نامبرده در R استفاده شد. به جای مدل رگرسیون لجستیک نیز مدل رگرسیون بیشینه هموار با استفاده از بستهٔ nnet (Venables and Ripley, 2002) در R پیاده‌سازی شد. در واقع رگرسیون بیشینه هموار یک رگرسیون لجستیک چند جمله‌ای است. برای ماشین بردار پشتیبان خطی و چند جمله‌ای نیز که قادر به تفکیک چنددسته نیستند، دو رویکرد یکی در برابر یکی یا یکی در مقابل یکی (one-versus-one) یا OVO و یکی در برابر همه یا یکی در مقابل همه (ove-versus-all یا OVA) پیشنهاد شده‌است. در هر دو راهکار مسئلهٔ دسته‌بندی چنددسته را به چند مسئلهٔ دسته‌بندی دودسته تبدیل می‌کند. در روش یکی در مقابل یکی هر دسته را با یکی از دسته‌های دیگر به عنوان یک دسته‌بندی دودسته در نظر می‌گیرد و این کار برای همهٔ دسته‌های دوتایی ممکن تکرار می‌شود. اگر چهار دسته ۱ و ۲ و ۳ و ۴ داشته باشیم در روش یکی در مقابل یکی حالت‌های 1,2-3,4 و 1,4-2,3-3,4 امکان‌پذیر است. به این ترتیب می‌توان با اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار مدل‌ها را برای هر مجموعهٔ دودسته آموزش داده و پس از آن روی دادهٔ آزمایشی، دسته‌ای که در مجموع بین همهٔ مدل‌ها با بیشترین احتمال پیش‌بینی شده‌است به عنوان دسته آن داده در نظر گرفته می‌شود. راهکار یکی در مقابل همه نیز شبیه یکی در مقابل یکی عمل می‌کند با این تفاوت که هر دسته را در برابر سایر دسته‌های باقیمانده به عنوان یک مسئلهٔ دودسته در نظر می‌گیرد و به عنوان مثال برای چهار دسته حالت‌های 1,rest-2,rest و 3,rest-4,rest در نظر گرفته می‌شود. بنابراین از این دو راهکار برای آموزش مدل‌های برپایهٔ ماشین بردار پشتیبان جهت تفکیک چنددسته استفاده شد. در حالت دسته‌بندی چنددسته صحت همهٔ مدل‌ها با اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار به دست آمد.

برای دسته‌بندی نمونه‌ها و پیش‌بینی دسته داده‌های آزمایشی در این پژوهش از هفت مدل دسته‌بندی مختلف برای یادگیری ماشین با نظارت استفاده شد. به طور کلی در این فرآیند داده‌ها به دو بخش داده‌های آموزشی و داده‌های آزمایشی تقسیم‌بندی شده و از داده‌های آموزشی برای آموزش مدل و تخمین پارامترها استفاده و سپس با استفاده از مدل آموزش‌دیده، دسته داده‌های آزمایشی تخمین زده می‌شود. در این راستا هفت مدل دسته‌بندی مختلف در اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار آموزش داده‌شده و صحت و عملکرد آن‌ها در پیش‌بینی دسته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر تکرار ۸۰ درصد داده‌ها به عنوان دادهٔ آموزشی و ۲۰ درصد داده‌ها به عنوان دادهٔ آزمایشی در نظر گرفته شدند. از آنجایی که داده‌ها شامل شش دسته مختلف سرطانی و یک دسته سالم است دو روش مختلف دودسته و چنددسته مورد بررسی قرار گرفت. در حالت دودسته تمایز نمونه‌های سالم از سرطانی و در حالت چنددسته، دسته‌بندی نمونه‌های سالم و شش نوع سرطان صورت گرفت.

مدل‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل رگرسیون لجستیک لاسو، بوس‌تینگ، دسته‌بندی درختی، ماشین بردار پشتیبان خطی، جنگل تصادفی، ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای و تحلیل تشخیصی خطی است و در جدول ۱ معادل انگلیسی هر کدام از این مدل‌ها به همراه منبع آن ذکر شده است. این مدل‌ها همگی از دستهٔ مدل‌های پارامتریک هستند که از داده‌های آموزشی برای تخمین پارامترهای آن‌ها استفاده شده و سپس مدل آموزش‌دیده، با پارامترهای تخمین‌زده‌شده می‌تواند دسته داده‌های دیده‌نشده و آزمایشی را تخمین بزند. در بین این مدل‌های دسته‌بندی، مدل‌های تحلیل تشخیصی خطی، ماشین بردار پشتیبان و رگرسیون لجستیک لاسو جزء مدل‌های خطی تعمیم‌یافته هستند و از بین آن‌ها، مدل تحلیل تشخیصی خطی از مدل‌های مولد است که با احتمال پنین کار می‌کند. برای این سه مدل به ترتیب از بسته‌های MASS glmnet, (Friedman et al. 2010) (Venables and Ripley. 2002) و e1071 (Dimitriadou et al. 2009) در R استفاده شد. مدل‌های دسته‌بندی درختی، جنگل تصادفی و بوس‌تینگ گروه دیگری از مدل‌های دسته‌بندی هستند که در این پژوهش استفاده شد و در دستهٔ مدل‌های دسته‌بندی مبتنی بر درخت قرار می‌گیرند. این مدل‌ها به طور معمول ساده هستند و عملکرد قوی‌ای ندارند بنابراین



شکل ۱- (آ) شکل نمودار میله‌ای فراوانی نمونه‌ها در داده GSE68086 را نشان می‌دهد. به‌طورکلی ۱۹ درصد از کل داده‌ها به نمونه‌های سالم و ۸۱ درصد از آن‌ها به نمونه‌های سرطانی اختصاص دارد. در بین انواع نمونه‌های سرطانی نمونه‌های سرطان سینه (۲۱ درصد) بیشترین فراوانی و نمونه‌های سرطان ریه (۵/۲ درصد) کمترین فراوانی را دارند. **(ب)** این شکل نمودار PCA را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده پراکنش نمونه‌های سالم و سرطانی در دو بعد با بیشترین واریانس بعد از انتخاب ویژگی ۲۰۰۰ ژن است. واریانس در بعد اول ۲۲/۳ درصد و در بعد دوم ۱۲/۴ درصد است.

Figure 1. (A) The bar graph shows the sample frequencies in the GSE68086 data. Overall, 19% of the total data is healthy specimens and 81% of them is cancer specimens. Among the types of cancer samples, breast cancer samples (21%) are the most common and lung cancer samples (5.2%) are the least common. (B) This figure shows the PCA diagram. The PCA plot displays the distribution of health and cancer samples in two dimensions with the most variation after selecting the 2000 gene features. The variance in the first dimension is 22.3 %, and the variance in the second dimension is 12.4 %.

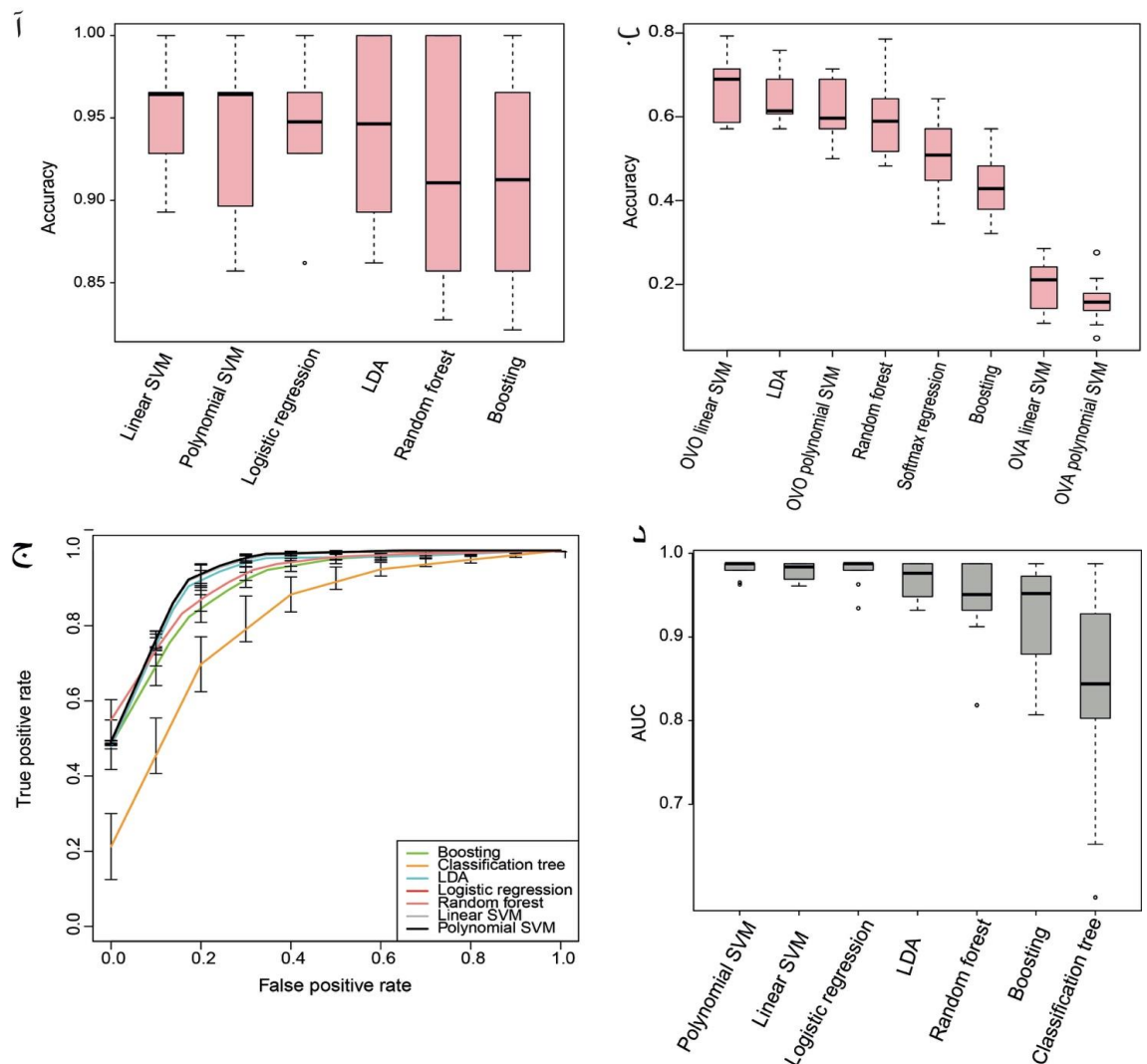
نتایج

در این پژوهش صحت شش مدل دسته‌بندی مختلف با استفاده از اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار سنجیده شد. این سنجش در دو حالت تفکیک دودسته دسته‌های سالم و سرطانی و تفکیک چنددسته شش نوع سرطان مختلف و دسته سالم صورت‌گرفت. نتایج نشان داد که در دسته‌بندی دودسته مدل ماشین بردار پشتیبان خطی با میانگین صحت ۰/۹۵ و بعد از آن مدل ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای با میانگین صحت ۰/۹۴ بهترین کارایی را در دسته‌بندی نمونه‌های سرطانی و سالم دارند. شکل ۲ - (آ) نمودار جعبه‌ای میزان صحت همه مدل‌ها در تفکیک دو دسته با اعتبارسنجی ۱۰ تکرار را نشان می‌دهد. برای تفکیک چند دسته

در جهت فهم اینکه ۲۰۰۰ ژن انتخاب‌شده در چه مسیرهای زیستی نقش دارند تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر با استفاده از روش preranked GSEA صورت‌گرفت. به این منظور ۲۰۰۰ ژن از نظر میزان اهمیت در دسته‌بندی با مدل ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای رتبه‌بندی شدند. همچنین مجموعه ژن‌های مربوط به سه ماژول پایگاه داده MsigDB شامل H, C6, C7 دانلود شده و جهت غنی‌سازی مسیر مورد استفاده قرار گرفتند که به ترتیب شامل مجموعه ژن‌های آنکوژنیک، نشان و ایمونولوژیک هستند. پس از آن با استفاده از بسته fgsea (Sergushichev. 2016) در R تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر صورت‌گرفت. در این پروژه همه تجزیه و تحلیل‌ها در R ورژن 4.1.0 انجام شد.

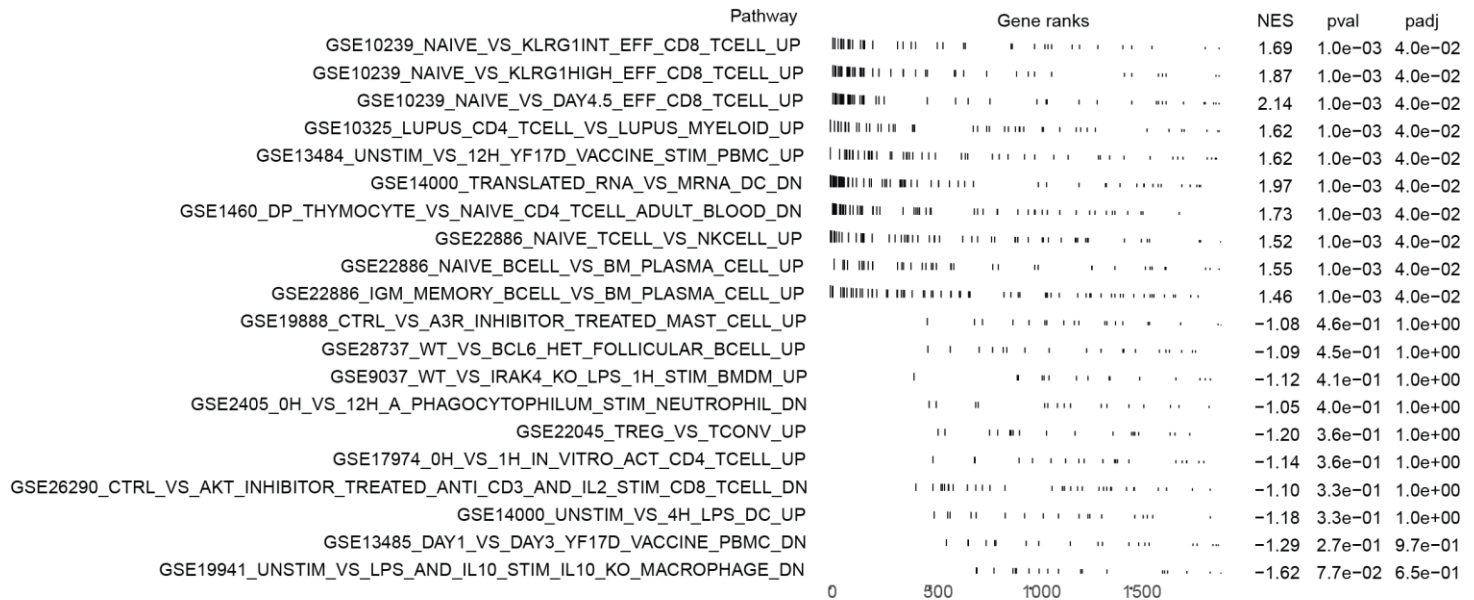
میانگین صحت ۰/۶۷ بهترین عملکرد را در تفکیک نمونه های شش نوع سرطان مختلف و نمونه های سالم دارد. بعد از آن مدل تحلیل تشخیصی خطی با میانگین صحت ۰/۶۴ در درجه دوم و مدل یکی در مقابل یکی ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای با میانگین صحت ۰/۶۲ در درجه سوم قرار دارد. شکل ۲- (ب) نشان‌دهنده صحت مدل‌های مختلف برای دسته‌بندی چنددسته روی داده مورد بررسی است.

مدل‌های جنگل تصادفی، تحلیل تشخیصی خطی و بوستینگ قابلیت انجام این دسته‌بندی را دارند. همچنین مدل رگرسیون بیشینه هموار گسترش یافته مدل رگرسیون لجستیک برای تفکیک چند دسته است، اما مدل‌های ماشین بردار پشتیبان خطی و چند جمله‌ای قادر به تفکیک چند دسته نیستند. به این منظور از دو راهکار یکی در مقابل یکی و یکی در مقابل همه استفاده شد که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده‌است. نتایج حاصل نشان داد که مدل ماشین بردار پشتیبان خطی یکی در مقابل یکی با



شکل ۲- (آ) نمودار جعبه ای صحت 6 مدل دودسته که با اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار به‌دست آمده‌است. در این نمودار مدل ماشین بردار پشتیبان خطی با میانگین ~ 0.95 و میان 0.96 ~ بهترین عملکرد را در دسته‌بندی دودسته نشان می‌دهد. (ب) مانند قسمت آ نمودار جعبه‌ای صحت مدل‌ها را نشان می‌دهد با این تفاوت که این نمودار برای تفکیک چنددسته مدل‌ها ترسیم شده‌است. در دسته‌بندی چنددسته مدل یکی در مقابل یکی ماشین بردار پشتیبان خطی با میانگین صحت 0.67 ~ و میان 0.69 ~ بهترین عملکرد را دارد. (ج) منحنی راک برای سنجش حساسیت و اختصاصیت مدل‌ها در دسته‌بندی دودسته مورد استفاده قرار گرفت. مدل ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای با بیشترین سطح زیر منحنی بهترین عملکرد را دارد. (د) نمودار جعبه‌ای برای سطح زیر نمودار (AUC) مدل‌های مختلف را نشان می‌دهد که همانطور که در قسمت ج توضیح داده‌شد ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای با AUC حدود ۰/۹۹۴ بهترین عملکرد را دارد.

Figure 2. (A) The accuracy of six two-class classification models acquired by cross-validation of ten replicates is depicted in a box plot. Linear SVM model with mean ~ 0.95 and median ~ 0.96 shows high-performance results in two-class classification. (B) Similar to part A, the boxplot shows the accuracy of the model, but this plot is drawn for multiclass classification. The OVO linear SVM model performs best with mean accuracy ~ 0.67 and median ~ 0.69 . (C) Roc curves were used to measure the sensitivity and specificity of the two-class classification models. The polynomial SVM model with the largest area under the curve provides the best performance. (D) Box plot of AUC of different two class classification models shows that the polynomial SVM model has the best performance with AUC ~ 0.994 .



شکل ۳- در این شکل نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر به روش preranked GSEA نشان داده شده است. همانطور که مشخص است ۱۰ مسیر با adjusted pvalue کمتر از ۰/۰۵ به طور معناداری در نمونه‌های سرطانی نسبت به سالم غنی شده‌اند. این ۱۰ مسیر، مسیرهای مختلف زیستی دخیل در فرآیندهای ایمونولوژیک هستند.

Figure 3. In this figure, the results of pathway enrichment analysis by preranked GSEA method are shown. As can be seen, 10 pathways with adjusted pvalue less than 0.05 were significantly enriched in cancer samples compared to healthy ones. These 10 pathways are various biological pathways involved in immunological processes.

در این پژوهش برای مقایسه مدل‌های دسته‌بندی دودسته منحنی راک ترسیم شد و نتایج نشان داد که مدل ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای با میانگین $AUC \sim 0.994$ بهترین عملکرد را دارد. بعد از آن مدل ماشین بردار پشتیبان خطی با میانگین $AUC \sim 0.992$ در درجه دوم از لحاظ عملکرد قرار دارد. منحنی راک مدل‌ها در شکل ۲- (ج) نشان داده شده است. این منحنی با اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار روی نمونه‌های مورد بررسی به دست آمد و شکل ۲- (د) نشان‌دهنده نمودار جعبه‌ای برای AUC مدل‌ها است.

در ادامه، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر روی نمونه‌های پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری انجام شد. در این راستا ابتدا ۲۰۰۰ ژن با مدل ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای رتبه‌بندی شده و سپس با روش preranked GSEA تجزیه و تحلیل

برای سنجش حساسیت و اختصاصیت مدل‌های دسته‌بندی دودسته می‌توان از منحنی مشخصه عملکرد (ROC curve) استفاده کرد. در این منحنی حساسیت مدل‌ها روی محور عمودی با نرخ مثبت صحیح نشان داده می‌شود. حساسیت نشان‌دهنده نسبت نمونه‌هایی است که دسته آن‌ها توسط مدل به درستی سرطانی تشخیص داده شده‌اند به مجموعه نمونه‌هایی که دسته آن‌ها به طور کاذب سالم تشخیص داده شده است. همچنین محور افقی نشان‌دهنده نرخ مثبت کاذب است. نرخ مثبت کاذب درصد نمونه‌هایی است که به طور کاذب بیمار تشخیص داده شده‌اند و از فرمول $1 - specificity$ به دست می‌آید. بنابراین منحنی مشخصه عملکرد مقایسه‌ای بین نرخ مثبت کاذب و نرخ مثبت صحیح مدل انجام می‌دهد و هرچه سطح زیر منحنی (AUC) به یک نزدیک‌تر باشد به این معناست که مدل عملکرد بهتری دارد چون حساسیت و اختصاصیت بیشتری دارد.

از یادگیری ماشین با نظارت صورت نگرفته است بنابراین در این پروژه هدف اصلی آموزش مدل‌های مختلف دسته‌بندی با استفاده از ۲۳۰ نمونه pan-cancer و ۵۵ نمونه سالم برگرفته از پایگاه داده GEO (GSE68086) بود. در ابتدا ۲۰۰۰ ژن، با بیشترین واریانس بیان در بین نمونه‌ها، انتخاب شدند و بنابراین ابعاد ماتریس بیان ژن دانلود شده از ابعاد ۵۷۷۳۶×۲۸۵ به ۲۰۰۰×۲۸۵ کاهش یافت. پس از آن مدل‌های دسته‌بندی مورد بررسی شامل مدل‌های جنگل تصادفی، رگرسیون لجستیک لاسو، ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای، ماشین بردار پشتیبان خطی، بوستینگ، دسته‌بندی درختی و تحلیل تشخیصی خطی با استفاده از ماتریس بیان ژن با ویژگی‌های انتخاب‌شده آموزش داده شدند و صحت و عملکرد آن‌ها با اعتبارسنجی متقابل ۱۰ تکرار سنجیده شد.

نتایج حاصل نشان داد که مدل‌های ماشین بردار پشتیبان خطی و چند جمله‌ای از سایر مدل‌های دسته‌بندی هم در حالت دودسته و هم در حالت چنددسته بالاترین میزان صحت و بالاترین میزان AUC را دارند. میانگین AUC به دست آمده برای ماشین بردار پشتیبان چند جمله‌ای ۰/۹۹۴ و برای مدل ماشین بردار پشتیبان با کرنل خطی ۰/۹۹۲ به دست آمد. در پژوهشی که بست و همکاران (Best et al. 2015) انجام دادند میانگین AUC برای مدل ماشین بردار پشتیبان حدود ۰/۹۸۶ به دست آمده است که در مقایسه با نتایج به دست آمده در اینجا، مدل ماشین بردار پشتیبان آموزش داده شده در این پژوهش عملکرد بهتری دارد. این تفاوت می‌تواند به دلیل متفاوت بودن روش انتخاب ویژگی در این پژوهش که انتخاب ژن‌هایی با بیشترین واریانس است، باشد. آموزش مدل ماشین بردار پشتیبان در پژوهش مذکور نیز با استفاده از داده‌های GSE68086 صورت گرفته است. با مقایسه دو مدل دسته‌بندی ذکر شده با بهترین عملکرد در حالت دودسته نسبت به چنددسته عملکرد خیلی بهتری دارند و علت این نتیجه می‌تواند مربوط به تعداد نمونه‌های کم موجود در هر دسته سرطانی باشد به عنوان مثال فقط ۱۵ نمونه (۵ درصد) از نمونه‌ها مربوط به سرطان کبد است. در واقع تعداد کم نمونه‌های موجود در هر دسته سرطانی ممکن است نتواند دانسته‌های جامعی از جامعه آماری بدهد بنابراین سبب بیش‌برازش مدل‌های مورد بررسی می‌شود. از بین مدل‌های مورد بررسی مدل تحلیل تشخیصی خطی در حالت تفکیک چنددسته بعد از مدل

صورت‌گرفت. نتایج حاصل نشان داد که از بین سه مجموعه ژن‌های آنکوژنیک، نشان و ایمونولوژیک منتخب از پایگاه داده MsigDB، ۱۰ مجموعه ژن ایمونولوژیک با $p_{adj} < 0.05$ به طور معناداری در نمونه‌های سرطانی نسبت به سالم در داده‌های پروفایل بیانی مورد بررسی غنی شده‌اند. نتایج تجزیه و تحلیل به دست آمده در شکل ۳ قابل مشاهده است.

بحث

در دهه‌های گذشته مشاهده‌های جالب توجهی درباره پلاکت‌های بیماران مبتلا به سرطان به دست آمده است. از جمله این مشاهده‌ها می‌توان به وجود خون منعقد شده خودبخودی در بیماران سرطانی و همچنین وجود سلول‌های سرطانی در لخته‌های خون ایجاد شده اشاره کرد (In 'T Veld and Wurdinger. 2019). پژوهش‌های بعدی نشان داد که سلول‌های سرطانی با ارتباط مستقیم یا به وسیله وژیکول‌ها، پلاکت‌ها را تحت آموزش خود درآورده و سبب تغییر در پروفایل بیانی پلاکت‌ها می‌شوند. از این رو به آن‌ها پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری گفته می‌شود (Schlesinger. 2018). تا کنون در چندین پژوهش سعی بر آموزش مدل‌های دسته‌بندی به روش یادگیری ماشین با نظارت و سپس استفاده از آن مدل‌ها برای پیش‌بینی دسته داده‌های آزمایشی داشته‌اند. در این دسته‌بندی تفکیک دسته‌های سالم و سرطانی یا تفکیک بین انواع سرطان‌ها و حالت سالم صورت گرفته است. بست و همکاران از مدل ماشین بردار پشتیبان (Best et al. 2015) و در پژوهش دیگری از مدل دسته‌بندی هوش ازدحامی که روشی مشابه مدل ماشین بردار پشتیبان است (Best et al. 2019) برای دسته‌بندی داده‌های پلاکت-های آموزش‌دیده توموری استفاده کردند. همچنین در پژوهش‌های دیگر هانگ و همکاران از روش رگرسیون برازش چندگانه با تصمیم بیز (Huang et al. 2017) و پاستوزاک و همکاران از روشی بر پایه تبدیل پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری به تصویر برای دسته‌بندی نمونه‌های سالم و سرطانی استفاده کردند (Pastuszak et al. 2021).

بر مبنای بررسی‌هایی که روی مقاله‌های موجود در زمینه دسته‌بندی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری انجام دادیم، در پژوهش‌های پیشین مقایسه‌ای بین آموزش مدل‌های مختلف دسته‌بندی با استفاده

کرد. همچنین علاوه بر تشخیص pan-cancer می‌توان با آموزش مدل‌های دسته‌بندی به صورت چنددسته نوع سرطان را نیز برای یک نمونه با دسته نامشخص پیش‌بینی کرد که در این پژوهش به بررسی این موارد پرداخته‌شد. همچنین با دسته‌بندی ساب‌تایپ‌های سرطانی، از پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری می‌توان برای تشخیص بهتر و بررسی روند درمان به عنوان نشانگر زیستی استفاده کرد و مشابه روند این پژوهش با استفاده از داده‌هایی که دسته ساب‌تایپ‌های سرطانی آن مشخص است مدل‌های دسته‌بندی را آموزش داده و برای پیش‌بینی دسته داده‌های آزمایشی از آن استفاده کرد.

یکی در مقابل یکی ماشین بردار پشتیبان خطی صحت خوبی نسبت به سایر مدل‌ها نشان داد درحالی که در دسته‌بندی دودسته در درجه چهارم صحت دسته‌بندی قرار داشت. از بین روش‌های مبتنی بر درخت روش جنگل تصادفی در هر دو حالت چنددسته و دودسته عملکرد و صحت بهتری داشت که علت آن این است که این روش سعی در کم کردن همبستگی بین درخت‌ها دارد.

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که پروفایل بیانی پلاکت-های آموزش‌دیده توموری موجود در بیوپسی مایع می‌تواند نشانگر زیستی خوبی برای تشخیص سرطان باشد. با آموزش مدل‌های دسته‌بندی روی داده‌های موجود می‌توان دسته سالم یا بیمار یک نمونه پروفایل بیانی پلاکت‌های آموزش‌دیده توموری را پیش‌بینی

جدول ۱- مدل‌های دسته‌بندی مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. The classification models used in this research

نام فارسی مدل	نام انگلیسی مدل	منبع
جنگل تصادفی	Random forest	Breiman. 2001
رگرسیون لجستیک لاسو	LASSO logistic regression	DeMaris. 1995
ماشین بردار پشتیبان خطی	Linear support vector machine (SVM)	Saunders et al. 1998
بوستینگ	Boosting	Freund. 1995
دسته‌بندی درختی	Classification tree	Breiman et al. 2017
تحلیل تشخیصی خطی	Linear discriminant analysis (LDA)	Keinosuke Fukunaga. 2013

منابع

- Abbasi K, Masoudi-Nejad A. 2020. Design of a bioinformatics model to predict drug compound properties and its application in inhibition of HIV replication and BACE-1. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 9(2): 181-193 (In Farsi with English abstract).
- Alfaro E, Gáamez M, and García N. 2013. adabag: An R Package for Classification with Boosting and Bagging. Journal of Statistical Software 54: 1-35.
- Best MG, In 't Veld SGJG, Sol N, and Wurdinger T. 2019. RNA sequencing and swarm intelligence-enhanced classification algorithm development for blood-based disease diagnostics using spliced blood platelet RNA. 14(4): 1206-1234.
- Best MG, Sol N, In 't Veld SGJG, Vancura A, Muller M, Niemeijer ALN, et al. and Wurdinger T. 2017. Swarm Intelligence-Enhanced Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer Using Tumor-Educated Platelets. Cancer Cell 32(2): 238-252.e9.
- Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, et al., and Wurdinger T. 2015. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. Cancer Cell 28(5): 666-676.
- Best MG, Wesseling P, and Wurdinger T. 2018. Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. Cancer research 78(13): 3407-3412.
- Billroth T. 1878. Lectures on surgical pathology and therapeutics. New Sydenham society. v 2.
- Breiman L. 2001. Random Forests. Machine Learning 45(1): 5-32.
- Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, and Stone CJ. 1984. Classification and regression trees. 1st edition.

- Champon & Hall. New York. USA. 1-368.
- DeMaris A. 1995.** A Tutorial in Logistic Regression. Journal of Marriage and the Family 956-968.
- Dimitriadou E, Hornik K, Leisch F, Meyer D, and Maintainer AW. 2009.** The e1071 Package. Misc Functions of Department of Statistics (e1071), TU Wien R package 1: 5-24.
- Freund Y. 1995.** Boosting a Weak Learning Algorithm by Majority. Information and Computation 121(2): 256-285.
- Friedman J, Hastie T, and Tibshirani R. 2010.** Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. Journal of statistical software 33(1): 1-22.
- Huang G, Yuan M, Chen M, Li L, You W, Li H, Cai JJ, and Ji G. 2017.** Integrating multiple fitting regression and Bayes decision for cancer diagnosis with transcriptomic data from tumor-educated blood platelets. Analyst 142(19): 3588-3597.
- In 't Veld SGJG, and Wurdinger T. 2019.** Tumor-educated platelets. Blood 133(22): 2359-2364.
- Joose SA, Pantel K, SA J, and K P. 2015.** Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. Cancer cell 28(5): 552-554.
- Keinosuke Fukunaga. 2013.** Introduction to Statistical Pattern Recognition. 2nd edition. Elsevier.
- Khandezamin Z, Naderan Tahan M, Rashti MJ. 2020.** Intelligent detection of breast cancer with feature selection based on logistic regression and support vector machine Classification. Journal of Soft Computing and Information Technology 9(2): 115-123 (In Farsi with English abstract).
- Kourou K, Exarchos TP, Exarchos KP, Karamouzis MV, Fotiadis DI. 2015.** Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. Computational and structural biotechnology journal, 13: 8-17.
- Larrañaga P, Calvo B, Santana R, Bielza C, Galdiano J, Inza I, Lozano JA, Armañanzas R, Santafé G, Pérez A, and Robles V. 2006.** Machine learning in bioinformatics. Briefings in Bioinformatics 7(1): 86-112. (In Farsi with English abstract).
- Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passequé E, and Looney MR. 2017.** The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature 544(7648): 105-109.
- Liaw A, and Wiener M. 2002.** Classification and Regression by randomForest. R news 2(3): 18-22.
- Noetzli LJ, French SL, and Machlus KR. 2019.** New insights into the differentiation of megakaryocytes from hematopoietic progenitors. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 39(7): 1288-1300.
- Pastuszek K, Supernat A, Best MG, In 't Veld SGJG, Łapińska-Szumczyk S, Łojkowska A, Różański R, Żaczek AJ, Jassem J, Würdinger T, and Stokowy T. 2021.** imPlatelet classifier: image-converted RNA biomarker profiles enable blood-based cancer diagnostics. Molecular oncology 15(10): 2688-2701.
- Ripley B, Ripley M B. 2016.** tree: Classification and Regression Trees. R Packag version 1.0: 37.
- Robinson MD, McCarthy DJ, and Smyth GK. 2010.** edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26(1): 139-140.
- Saunders C, Stitson MO, Weston J, Bottou L, Schölkopf B, and Smola A. 1998.** Support Vector Machine Reference Manual, 1-26.
- Schlesinger M. 2018.** Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. Journal of Hematology & Oncology 11(1): 1-15.
- Sergushichev AA. 2016.** An algorithm for fast preranked gene set enrichment analysis using cumulative statistic calculation. bioRxiv 060012: 1-9.
- Sol N, In 't Veld GJG, Vancura A, Tjerkstra M, Leurs C, Rustenburg FO, et al., and Wurdinger T. 2020.** Tumor-Educated Platelet RNA for the Detection and (Pseudo)progression Monitoring of Glioblastoma. Cell Reports Medicine 1(7): 100101.
- Sun K, Wang H, Xu X, Wei X, Su J, Zhu K, Fan J, Calin G, and Grignani F. 2021.** Tumor-Educated Platelet miR-18a-3p as a Novel Liquid-Biopsy Biomarker for Early Diagnosis and Chemotherapy Efficacy Monitoring in Nasopharyngeal Carcinoma. Frontiers in Oncology 11 : 4066.
- Tababaei A, Derhami V, Sheikhpour R, Pajoohan M. 2020.** Feature selection based on information theory to select effective genes for diagnosis of cancer subtypes using microarray data. Iranian Journal Of Biomedical engineering. 13(4): 351-362 (In Farsi with English abstract).
- Trousseau A. trans by Bazire P. V. 1868.** Lectures on Clinical Medicine. London. New Sydenham Society.
- Varkey J, and Nicolaides T. 2021.** Tumor-Educated Platelets: A Review of Current and Potential Applications in Solid Tumors. Cureus 13(11): e19189.
- Venables WN, and Ripley BD. 2002.** Modern Applied Statistics with S. 4th edition. Springer. New York. USA. 251-266.