MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ

Łódź, 27.07.2021

Prof. dr hab. Wojciech Fendler
Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej
I Katedra Pediatrii, Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ocena
Rozprawy doktorskiej lek. Anny Krentowskiej
Pt.: „Ocena ekspresji wybranych mikroRNA we krwi pacjentek z różnmi fenotypami zespołu policystycznych jajników oraz ich związku z zaburzeniami metabolicznymi"

Zespół policystycznych jajników (PCOS) jest wiodącą przyczyną niepowodzeń rozrodu i istotnym problemem społecznym. Zróżnicowanie fenotypowe choroby i związane z tym trudności diagnostyczne skutkują opóźnieniem lub w ogóle brakiem leczenia wielu cierpiących na tę przypadłość kobiet. Próby lepszego zcharakteryzowania zespołu, poznania jego patofizjologii lub też wytworzenia narzędzi ułatwiających jego rozpoznanie lub przewidywanie przebiegu klinicznego są ze wszech miar potrzebne i naukowo uzasadnione.
W przedstawionej mi do oceny pracy lek. Anna Krentowska przedstawia dużą, dobrze scharakteryzowaną grupę pacjentów z PCOS oraz grupę kontrolną o zbliżonej liczebności, za pomocą których dąży do zrealizowania ambitnych celów badawczych. Zgromadzony w ramach pracy materiał kliniczny jest obszerny, uwzględnia liczne metaboliczne aspekty PCOS oraz chorób czy też zaburzeń z nim współistniejących. Dodatkowym, nowatorskim aspektem pracy jest ocena wolno krążących mikroRNA za pomocą techniki real-time PCR. Ta relatywnie nowa grupa krótkich, niekodujących kwasów nukleinowych zdobywa uznanie jako potencjalne biomakrery chorób człowieka ze względu na liczne cechy predysponujące je do tej roli, takie jak: stabilność, powtarzalność pomiaru, dobry zakres dynamiczny zmian, łatwość oznaczania ilościowego i potencjalne powiązanie funkcjonalne z patofizjologią wewnątrzkomórkową. Próba zbadania mikroRNA i ich związku z występowaniem oraz fenotypem PCOS jest działaniem innowacyjnym i poszerzającym aktualną wiedzę medyczną na temat tej choroby oraz mikroRNA.
Oceniana praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ: treściwe wprowadzenie, jasno wyartykułowane cele szczegółowe pracy, dokładny opis metodyki badawczej, omówienie wyników oraz ich bardzo dojrzałą dyskusję.

Department of Biostatistics
& Translational Medicine
92-215 Lodz, 15 Mazowiecka st.
e-mail:btm @umed.lodz.pl
tel. (042) 272 53 85
www.biostat.umed.pl
BTM

Główny tekst pracy stanowi 98 stron maszynopisu,13 tabel i 15 rycin oraz 265 pozycji piśmiennictwa, w przytłaczającej większości opublikowanych na przestrzeni ostatnich 10 lat w wiodących periodykach naukowych.

Nawigowanie w tak obszernym materiale molekularnym i klinicznym nie jest łatwe i ze względu na mnogość możliwych asocjacji oraz zakres stawianych pytań niemożliwe jest wyznaczenie jednego „poprawnego" protokołu analizy danych. Trudno o konkretne wytyczne i określenie najlepszej formy analizy, zwłaszcza w dziedzinie nowej jaką jest mierzenie ekspresji zewnątrzkomórkowych kwasów nukleinowych w płynach ustrojowych. Niemniej, z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka wątpliwości, jakie nasunęły mi się co do sposobu realizacji badania i wybranej formy narracji kolejnych porównań oraz wizualizacji wyników.

1. Kryteria selekcji pacjentów do grup nie zostały do końca sprecyzowane. Z uwagi na przekrojowy charakter projektu kluczowym aspektem jest reprezentatywność grupy badanej i kontrolnej. Brak informacji z jak licznej grupy pochodziły pacjentki z PCOS oraz osoby zdrowe utrudnia ocenę możliwości przeniesienia wyników na resztę populacji. Czy Autorka posiada informacje na temat tego jak struktura cech klinicznych obu grup ma się do populacji zdrowej zbliżonej pod względem wieku oraz do ogólnego obrazu chorych na PCOS?
2. W rozdziale „analiza statystyczna" nie zidentyfikowałem sekcji dotyczącej planowania liczebności grupy. Jeśli zrekrutowane grupy były wynikiem kompleksowej procedury rekrutacji wszystkich możliwych do zbadania osób wyrażających chęć uczestnictwa w projekcie to taka analiza byłaby bezprzedmiotowa. Skoro jednak pojawia się grupa kontrolna o okreslonej liczebności a w związku z planowaną analizą w podgrup pomiędzy różnymi typami obrazu klinicznego PCOS zasadne byłoby poddanie choćby *post factum* analizie możliwej do wykrycia wielkości w wykrywalnych różnic. Czy Autorka posiada lub rozważała takie oszacowanie?
3. Metody oceny parametrów klinicznych, metabolicznych i laboratoryjnych nie budzą wątpliwości,co zrozumiałe wobec rangi i jakości jednostki macierzystej doktorantki. Co do oznaczenia ekspresji mikroRNA pojawia się jednak watpliwość co do niekanonicznej metody normalizacji. Wynikiem analizy ekspresji jest osiągnięcie przez reakcję amplifikacji fazy wykładniczego wzrostu produktu. Liczba cykli kiedy to

Department of Biostatistics
& Translational Medicine
92-215 Lodz, 15 Mazowiecka st.
e-mail:btm @umed.lodz.pl
tel. (042) 272 53 85
www.biostat.umed.pl

następuje oznaczana jest jako „Ct”. Wartość ta jest zależna od szeregu czynników klinicznych, laboratoryjnych i przedlaboratoryjnych w związku z tym istotne jest znalezienie „wspólnego mianownika” umożliwiającego porównanie próbek między sobą. Jeśli niektóre z nich charakteryzuje wyższe stężenie miRNA, co może być pochodną odwodnienia, wyższego stężenia HDL lub faktycznego biologicznego powiązania z procesem patologicznym to wartość Ct miRNA może być niższa. Nie sposób jednak w oparciu o same wartości Ct odgadnąć czy obserwowana różnica między próbkami jest efektem prawdziwie biologicznym czy zależnym od jakości próbki. W tym celu obliczana jest wartość „dCt” czyli różnica liczby cykli miRNA „zainteresowania” oraz jakiegoś kalibratora. W badaniu ekspresji wewnątrzkomórkowej istnieje szereg znanych i powszechnie stosowanych kalibratorów o powtarzalnych biologicznie cechach. Dla płynów ustrojowych takich uniwersalnych standardów jak dotąd niestety nie ma. W efekcie można wykorzystać inny mikroRNA o znanej ekspresji, relatywnie stałej u osób bez względu na procesy patologiczne lub syntetycznie dodawanych RNA. W niniejszej pracy do próbek pobranych od pacjentów dodawane było miRNA nicienia caenorhabditis elegans (cel-miR-39) w znanej liczbie kopii i wyniki Ct miRNA pacjentów były normalizowane do tej wartości. Jest to jedna ze strategii normalizacji, jednak jej wadą względem normalizacji do miRNA (lub innego krótkiego RNA) natywnego dla próbki pacjenta, jest brak korekty na jakość próbki i oryginalną zawartość miRNA. Jeśli więc istniał systemowy problem z częstszym wykorzystywaniem próbek grupy badanej niż kontrolnej do kolejnych oznaczeń który wiązałby się z większą liczbą cykli mrożenia-rozmrażania lub też próbki różniłyby się stężeniami RNA albo wydajnością oczyszczania, taki efekt przenosiłby się na wartości dCt w takim samym stoniu co na Ct miRNA znaczących - Ct dla cel-miR-39 jest bowiem stałe i zależne tylko od wydajności reakcji qPCR. Czy Autorka rozważała to ryzyko czy też obciążenie wyników możliwym błędem technicznym i jakie mechanizmy kontroli jakości były wprowadzone by się przed taką ewentualnością uchronić?

4. Analiza porównawcza cech klinicznych, metabolicznych i mikroRNA pomiędzy 4 typami obrazu klinicznego PCOS nakłada się w pewnym zakresie na obraz porównania PCOS+zespół metaboliczny vs bez PCOS. Jest to scenariusz, w którym(w opinii

recenzenta) powinno się rozważyć np korektę na wielokrotne porównania – bowiem te same próbki są wykorzystywane do porównań w których zmieniają przynależność do grup. Rozwiązaniem purystycznym statystycznie byłoby dołączenie grupy kontrolnej do porównania z wszystkimi 4 typami PCOS i ich analiza ANOVĄ lub testem K-W. To drugie rozwiązanie byłoby wskazane głównie ze względu na ewidentny brak różnic typu IV z grupą kontrolną oraz odstawanie pozostałych typów PCOS od siebie. Niemniej, skoro Autorka zdecydowała się na układ porównań sekwecyjnych – wpierw grupa kontrolna vs PCOS a następnie podtypy PCOS, zasadnym byłoby wkomponowanie obecności zespołu metabolicznego do porównań za pomocą modelu wieloczynnikowego (PCOS vs kontrola * zespół metaboliczny lub typ PCOS * zespół metaboliczny). Czy Autorka rozprawy rozważała zastosowanie takiego wariantu analizy i jeśli tak, to co ją od tego odwiodło?

5. Zaprezentowane na rycinach 12 i 16 krzywe ROC są, w rozumieniu recenzenta, efektywnością diagnostyczną modeli regresji logistycznej opartej o konkretne miRNA lub też model wieloczynnikowy z nich złożony (wg opisów w legendzie panelu ryc. 12a-d). Nie jest to klasyczna forma podawania wyników regresji logistycznej. Regresja logistyczna jest równaniem, którego przedstawienie formalnie obejmuje wizualizację współczynników regresji lub ich przekształcenia do wartości OR dla jednostki zmiany zmiennych wchodzących w skład modelu o 1 oraz stosownych przedziałów ufności lub innej miary istotności. O ile część tego zapisu jest w tekście (OR przy miRNA), trudno jest wywynioskować czy dotyczą one wielu modeli, jednego czy też jakiejś ich kombinacji. W mojej opinii praca wiele by zyskała gdyby znalazła się w niej tabelka z wynikami zbudownaych modeli klasyfikacyjnych pozwalających na różnicowanie kontroli od PCOS lub obecności konkretnych dodatkowych patologii w obrębie grupy PCOS., Skoro podawane są krzywe ROC trudno nie spytać o optymalizację punktu odcięcia. Regresja logistyczna szacuje prawdopodobieństwo przynależności do klasy i jeśli jest ono wyższe niż 0,5 taką klasę przydziela. Jeśli tworzone są krzywe ROC możliwa jest optymalizacja punktu odcięcia dla konkretnych scenariuszy. W oparciu o zoptymalizowane punkty odcięcia wyznaczana jest czułość i swoistość. Takiej informacji w pracy zabrakło. O ile wyniki wskazują na związek ekpresji miRNA z konkretnymi stanami chorobowymi trudno jest określić na jakim etapie diagnostyki oraz

Department of Biostatistics
& Translational Medicine
92-215 Lodz, 15 Mazowiecka st.
e-mail:btm @umed.lodz.pl
tel. (042) 272 53 85
www.biostat.umed.pl

z jaką skutecznością by one działaly. Czy Autorka rozprawy może wyjaśnić jaka była efektywność diagnostyczna modeli klasyfikacyjnych opartych o mikroRNA (lub ich kombinacje z cechami klinicznymi) i na którym etapie diagnostyki byłyby one najbardziej użyteczne w świetle obecnej praktyki klinicznej?

Mniej istotne uwagi merytoryczne i edytorskie to:

1. Podanie sposobu liczenia dCt. Ze względu na sposób działania qPCR niższe Ct oznacza wyższą ekspresję i odwrotnie. dCt obliczone jako Ct(normalizator)-Ct(miR zainteresowania) odwraca tą zależność i niższe dCt oznacza niższą ekspresję Klasycznie jednak dCt było obliczane jako Ct(miR zainteresowania)-Ct(normalizator) po to by w kolejnym etapie obliczyć 2^(-dCt) uzyskując wskaźnik względnej ekspresji. Oba systemy funkcjonują w piśmiennictwie, przy czym dla krążących miRNA typowo stosuje się wariant pierwszy. Wyjaśnienie które wartości oznaczają wyższe a które niższe ekspresje miRNA ułatwiłoby lekturę dyskusji.
2. Ponieważ mikroRNA klasycznie wiązane jest z regulacją genów poprzez ich wyciszenie, wyższa ekspresja miRNA powinna przekładać się na obniżenie aktywności genów-celów i osłabienie efektorowych funkcji molekularnych. W dyskusji nagminnie pojawia się stwierdzenie „zmieniona ekspresja miRNA". To jest dość duży poziom ogólności i utrudnia on określenie czy wyniki uzyskane w pracy są zgodne czy też przeciwne względem niektórych pozycji piśmiennictwa.
3. Określenie „poziom" jest kalką językową z Angielskiego level, również nieprecyzyjnego względem tego co faktycznie oznaczamy poprzez ocenę ekspresji real-time qPCR. Gorąco namawiam do określania tych wyników mianem ekspresji, żmudnie „liczba cykli" lub żargonem dCt.

Przytoczone powyżej drobne uwagi, natury bardziej redakcyjnej niż merytorycznej, nie umniejszają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o tej wyróżniającej się pracy lek. Anny Krentowskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że ta bardzo wartościowa rozprawa jest świadectwem, iż Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera bez wątpienia wybitne elementy

nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktorantkę zostały zrealizowane nawet z nadwyżką. Praca stanowi dowód, iż Autorka w kompetentny sposób zgromadziła wyniki swoich obserwacji oraz w dojrzały sposób je zweryfikowała.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i duże znaczenie praktyczne dociekań naukowych z prawdziwą przyjemnością przedkładam Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lek Anny Krentowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na nowatorskie idee i koncepcje badawcze, leżące u źródeł ocenianej pracy, w tym udokumentowanie roli roli mikroRNA w kształtowaniu obrazu klinicznego PCOS wnioskuję o wyróżnienie pracy według zasad obowiązujących na UM w Białymstoku.

Department of Biostatistics
& Translational Medicine

92-215 Lodz, 15 Mazowiecka st.
e-mail:btm @umed.lodz.pl
tel. (042) 272 53 85
www.biostat.umed.pl