



Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Barbara Jarząb
tel. (+48)(032) 278-93-01, fax. (+48)(032) 231-35-12

Gliwice, dnia 17 marca 2014

Recenzja pracy doktorskiej Agnieszki Malcher
pt.: „Identyfikacja genów krytycznych dla procesu spermatogenezy: próba określenia
molekularnych markerów azoospermii”

Celem rozprawy doktorskiej była identyfikacja nowych biomarkerów diagnostyczno-prognostycznych azoospermii nieobstrukcyjnej u mężczyzn. Cele szczegółowe pracy obejmowały identyfikację genów mogących warunkować występowanie niepłodności, mających znaczenie dla stopnia upośledzenia spermatogenezy oraz wpływających na proces leczenia azoospermii. Uważam te cele za ciekawe i płodne, rozwiązane nowoczesnymi metodami.

Analiza profilu ekspresji genów wykonana przez Doktorantkę w grupie mężczyzn z azoospermią nieobstrukcyjną pozwoliła na wytypowanie 6 genów, które jak dotąd, nie były badane w aspekcie niepłodności. Doktorantka walidowała te geny ilościową reakcją PCR, a także na niezależnym, ogólnie dostępnym zbiorze danych mikromacierzowych. W drugim etapie badań porównane zostały profile ekspresji genów w grupie mężczyzn z blokiem spermatogenezy w początkowym i na końcowym jej etapie. Wybranych zostało 7 transkryptów, które następnie poddane zostały walidacji w ilościowej reakcji PCR, a także na niezależnym, ogólnie dostępnym zbiorze danych mikromacierzowych. Następnie wybrane zostały 3 geny, z genów nie badanych jak dotąd w aspekcie płodności i spermatogenezy i poddano je walidacji na poziomie białka. Porównanie profilu ekspresji genów w grupie chorych poddanych terapii hormonalnej nie wykazało globalnych różnic. Z 5 genów wykazujących różnice w profilu ekspresji pomiędzy grupą, która pozytywnie odpowiedziała na terapię i grupą bez odpowiedzi, do dalszych badań wytypowany został gen HLA-DQB1.

Powyższe wyniki uważam za bardzo ciekawe i oryginalne. Wykonane analizy pozwoliły na wytypowanie genów, które wcześniej nie były analizowane w kontekście męskiej niepłodności. Co warto jest także podkreślenia, Doktorantka, po raz pierwszy

określiła profil ekspresji genów przed i po leczeniu hormonalnym, choć przyznać należy, że analiza dotyczyła materiału uzyskanego tylko od jednego pacjenta.

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest bardzo dobrze, z uwzględnieniem bardzo bogatego piśmiennictwa. Uwagę zwraca szczególnie bardzo starannie przedstawiona cała część laboratoryjna. Szczególnie cenię dociekliwość Doktorantki, która podjęła się weryfikacji uzyskanych wyników na poziomie białka poprzez wykonanie reakcji immunoblotowania typu Western oraz immunohistochemii dla określenia lokalizacji wytypowanych, mało znanych białek. Dociekliwość ta skłoniła zapewne Doktorantkę do określenia alleli genu HLA-DQB1, który, Jej zdaniem, może mieć znaczenie w odpowiedzi na leczenie hormonalne azoospermii. Ważną obserwacją poczynioną przez Doktorantkę jest rozbieżność klasyfikacji histopatologicznej i molekularnej analizowanych próbek.

Pomimo niezaprzeczalnych zalet pracy, Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów, które poniżej przedstawię:

Pierwsza uwaga dotyczy liczebności próbek wykorzystanych do oznaczenia, która to kwestia została w pracy przedstawiona mało precyzyjnie. W opisie materiału oraz w wynikach podana jest wyjściowa liczba próbek, które w trakcie kolejnych etapów uległy wykluczeniu, jednakże nigdzie później - ani w tekście, ani w tabelach z wynikami, czy na rycinach, nie jest podana ostateczna liczba próbek poddanych analizie (informacje dotyczące próbek znajdują się wprawdzie w tabelach uzupełniających, czy rycinach ilustrujących wyniki, jednakże wymaga to od czytelnika liczenia próbek). W znacznym stopniu utrudnia to ocenę wykonanych badań. Przykładowo, w przypadku klasteryzacji hierarchicznej próbek według profilu ekspresji genów z Ryc. 18 wynika, że ostatecznie, z wyjściowego materiału 36 próbek pochodzących od 19 pacjentów i 4 próbek kontrolnych, analizie poddano 27 próbek pochodzących od pacjentów i 4 próbki kontrolne. Porównanie profilu ekspresji genów dotyczyło 18 próbek (po jednej próbce od pacjenta), walidacja wyników uzyskanych w badaniach wykonanych techniką mikromacierzy wykonana z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR to tylko 11 próbek. Typowanie biomarkerów określających stopień upośledzenia spermatogenezy dotyczyło 9 próbek z blokiem spermatogenezy w początkowym stadium i 9 próbek z blokiem spermatogenezy na końcowym etapie. Immunoblotowaniu typu Western poddanych zostało 10 próbek, w tym jak podaje Doktorantka, głównie próbki pochodzące od pacjentów zakwalifikowanych do analizy ekspresji genów (jest to określenie nieprecyzyjne, i powinna być tu dokładnie podana liczba próbek, które poddane zostały wcześniejszym badaniom), przy czym kontrola zawierała tylko 1 próbkę. W przypadku badania ekspresji genów u mężczyzn poddanych terapii hormonalnej, Doktorantka poczyniła

bardzo ciekawą obserwację obecności homozygot genu HLA-DQB1 u osób, które nie odpowiedziały na terapię, jednakże analiza dotyczyła tylko 6 próbek (3 próbki pochodzące od pacjentów, którzy odpowiedzieli na terapię i 3 od pacjentów, u których terapia nie dała efektu). Porównanie profilu ekspresji przed i po leczeniu wykonano na tylko jednej próbce.

Zasadniczym zarzutem dotyczącym wykonanych badań jest mała liczebność analizowanych próbek. O ile typowanie potencjalnych markerów azoospermii i dotyczyło 18 próbek od osób chorych i 4 od osób zdrowych, to w kolejnych etapach badania, co wspomniano wyżej, liczby te były znacznie mniejsze: 11 versus 4, 9 versus 9, 10 versus 1, 3 versus 3, 1 versus 1. Zapewne z braku wystarczającej liczby próbek walidacja wyników uzyskanych w badaniach wykonanych techniką mikromacierzy wykonana została z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR na tej samej grupie. Wprawdzie wykonana została weryfikacja uzyskanych wyników otrzymanych techniką mikromacierzy na niezależnym, ogólnie dostępnym zbiorze danych, jednakże trzeba zaznaczyć wyraźnie, że brak jest w pracy niezbędnego elementu, czyli weryfikacji wyników niezależną techniką na niezależnym zbiorze danych.

Moje uwagi krytyczne dotyczą także analizy wyników. Kryteria zastosowane w pierwszym etapie badania do typowania genów warunkujących niepłodność nie zostały, moim zdaniem, zastosowane w sposób prawidłowy. W celu zmniejszenia ryzyka wyciągania przypadkowych wniosków, powinno zostać zastosowane kryterium FDR poniżej $<0,05$, lub zamiennie, kryterium dla wartości p powinno wynosić mniej niż 0,001 dla genów uważanych za znamienne, różniące się w poziomie ekspresji.

W drugim etapie badania Doktorantka analizowała geny różnicujące próbki z wczesnym i późnym etapem zahamowania spermatogenezy, wytypowane na podstawie klasteryzacji hierarchicznej, określone przez Doktorantkę jako odpowiednio grupa B i A. Doktorantka nie podała, czy klasteryzacja hierarchiczna na niezależnym zbiorze danych dotyczy wszystkich genów, czy też tylko 7 genów wytypowanych do dalszej walidacji. Podział na podgrupy z wczesnym i późnym blokiem spermatogenezy jest moim zdaniem raczej życzeniową interpretacją wyników analizy nienadzorowanej - grupy te nie zostały jasno zdefiniowane - próbki z blokadą na etapie mejozy znalazły się bowiem zarówno w grupie A, jak i B. W niezależnym zbiorze walidacyjnym grupy A i B nie są takie same, jak grupy wyodrębnione przez Doktorantkę w materiale własnym, gdyż wszystkie próbki z blokiem na etapie mejozy znalazły się w grupie B. Tak więc, walidacja wyników na zbiorze niezależnym dotyczyła inaczej zarysowanych grup, niż w materiale własnym.

Doktorantka nie podaje, czy geny wytypowane do walidacji jako różnicujące podgrupy A i B, były jedynymi genami spełniającymi podane kryteria (wartość p poniżej 0,0001, pięciokrotnie zmieniony poziom ekspresji, FDR, z wyjątkiem jednego genu, poniżej 0,05), czy też genów takich było więcej.

W badaniach profilu ekspresji wykonanych przez Doktorantkę, oprócz nowych genów, znalazły się również geny wcześniej zidentyfikowane przez inne zespoły badawcze, co świadczy, moim zdaniem, jedynie o zgodności uzyskanych wyników, a nie, jak twierdzi Doktorantka, o poprawności wykonanej przez Doktorantkę analizy.

Szkoda, że poziom ekspresji genów badany techniką mikromacierzy, czy ilościowej reakcji PCR, czyli najważniejsze wyniki pracy, przedstawione zostały w postaci tak małych rycin, przez co nieco utrudniona jest ich obserwacja. Na rysunkach brak jest legendy.

Nie wiadomo, czy na rysunkach przedstawione są średnie, czy mediany, a w związku z tym, czy prostokąty na wykresie skrzynkowym dotyczą odchylenia standardowego, czy też kwartyli. W tabelach wartości p powinny zostać przedstawione w postaci potęgi, co znacznie ułatwiłoby porównanie uzyskanych wyników. Warto byłoby zwrócić uwagę na próbki odstające: sprawdzić, które to są próbki, czy zawsze są to te same próbki. W przypadku wykresów ilustrujących ilość białka, również brak jest legendy.

Legenda dotycząca map termicznych jest mało czytelna. Nie wiadomo, czego dotyczy histogram (czy średnich wartości ekspresji, czy też wszystkich pomiarów). Zamiast słowa „wartość” powinno pojawić się określenie „poziom ekspresji”, natomiast nie jest oczywiste, czego dotyczy określenie „ilość”.

Wspomniane wyżej ograniczenia dotyczące liczebności badanych grup i wykonanych analiz mogą w dużej mierze warunkować interpretację otrzymanych wyników. Wnioski dotyczące ich potencjalnego wykorzystania diagnostycznego czy prognostycznego powinny więc być wyciągnięte z dużo większą ostrożnością. Z całą pewnością badania te wymagać będą potwierdzenia na znacznie większym materiale, którego to aspektu Doktoranta jednak w dyskusji nie poruszyła. W dyskusji zabrakło mi więc krytycznego podejścia do uzyskanych rezultatów własnych badań.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę prezentowanej pracy. Praca wykonana jest bardzo starannie. Doktorantka wykorzystwała wiele technik badawczych, które w przyszłości będzie mogła rozwijać do prowadzenia dalszych badań. Tak więc, mam zaszczyt wnioskować do Rady Naukowej Instytutu Genetyki

Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Oryginalne wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy zostały opublikowane, wnoszę więc również o wyróżnienie pracy.

Handwritten signature of Barbara Jarząb in black ink.

prof. dr hab. n med. Barbara Jarząb
Kierownik Zakładu Medycyny Nuklearnej
i Endokrynologii Onkologicznej