

TÜBİTAK

PROJE ÖNERİSİ DEĞİŞİKLİK BİLDİRİM FORMU

PROJE NO	121S757
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Doç. Dr. GÖKMEN ZARARSIZ
PROJE BAŞLIĞI	Otozomal Dominant Polikistik Böbrek Hastalığının Progresyonunda Metabolomik Temelli Makine Öğrenimi Yaklaşımları İle Kişiyeye Özel Takip Raporunun Oluşturulması

Proje değerlendirme panelistlerinin, aşağıda belirtildiği üzere projenin çeşitli bölümlerine ilişkin eleştirileri olmuştur. Panelistlerin eleştirileri doğrultusunda projede gerçekleştirilen revizyonlar ve eleştirilere ilişkin yanıtlar aşağıda sunulmuştur (PG: Panelist Görüşü, R: Revizyon).

1. ÖZGÜN DEĞER

PG-1. Proje önerisinde otozomal dominant polikistik böbrek hastalığının (ODPBH) takibine yönelik bir makine öğrenmesi yazılımı tasarlanması planlanmaktadır. Bu kapsamda ODPBH hastalığının plazma örneklerinden tespit edilebilen biyokimyasal değişkenlere ek olarak metabolomik verileri toplanması, bu verilerin iyi gidişatlı ve renal kist oluşumu ve/veya böbrek yetmezliği geliştiren kötü gidişatlı hastalar arasındaki farklılıkların incelenmesi ve bu verilere dayalı makine öğrenmesi kullanan bir yazılım sistemi tasarlanıp hastalığın prognozunu öngörmeye yönelik kişiyeye özgü takip raporu üretilmesi planlanmıştır.

Aşağıdaki noktaların projenin özgün değerini kısıtladığı değerlendirilmektedir:

Daha önce benzer bir biyobelirteç keşif çalışmasının idrar örnekleri üzerinden yapıldığı literatürde görülmektedir. Benzer bir yaklaşım yerine invaziv bir yöntem olan kan plazmasına dayalı elde edilecek metabolomik verinin bu hastalığın prognozunda ne gibi avantajlar sağlayacağı yeterince açıklanmamıştır.

R-1. Metabolomik analizlerinde en sık kullanılan iki örnek tipi plazma ve idrardır. Her ne kadar idrar girişimsel olmayan toplama yöntemi ve böbreklerden süzülerek elde edilmesi sebebiyle böbrek hastalıkları göz önüne alındığında plazmaya göre avantaj sağlasa da hedef gözetmeyen (untargeted) metabolomik analizlerinde idrar numunesinin seçilmesinin önemli dezavantajları veya kısıtlamaları vardır. Bu dezavantaj veya kısıtlamalardan aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

- İdrar kanın glomerüler filtrasyona uğraması sonucunda oluşan bir vücut sıvısıdır. Bu sıvı oluşurken normalde plazmada bulunan birçok metabolit böbrek tübüllerinden geri emilmektedir. Bu nedenle idrarda tespit edilebilen toplam metabolit sayısı plazmaya göre son derece sınırlıdır. İnsan metabolom veri tabanı (<https://urinemetabolome.ca/>) verilerine göre idrarda tespit edilebilen metabolit sayısı yaklaşık 3100 iken bu sayı serum/plazma için 4600'dür (<https://serummetabolome.ca/>).
- İdrarda bulunan metabolitlerin önemli bir kısmı ilaç ve besinlerin metabolitleri veya son ürünlerdir. Ancak, plazma yukarıda bahsedilenlerin yanı sıra endojen metabolizma değişiklikleri sonucu oluşan metabolitleri idrarla kıyaslandığında daha iyi yansıtmaktadır.

Kaynaklar:

- Yin P., Lehmann R., Xu G. (2015). Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407:4879-92.
- Bouatra S., Aziat F., Mandal R., ve ark. (2013). The Human Urine Metabolome. PLoS ONE, 8(9): e73076.
- Psychogios N., Hau D. D., Peng J., ve ark. (2011). The Human Serum Metabolome. PLoS ONE 6(2): e16957.
- Numunelerin toplanması, ön işlenmesi ve saklanmasıdaki küçük değişiklikler bile metabolit stabilitesini önemli ölçüde etkileyebilir, analitik sonuçlarda farklılaşmaya neden olabilir ve araştırmanın güvenilirliğini azaltabilir. Her ne kadar idrar örneği toplaması son derece kolay bir numune türü olsa da, idrar örneğinin hastanın kendisi tarafından alınması, çok farklı örnek tipi olması (24 saatlik, 4 saatlik, rastlantısal örnek) ve örnek alım sırasında genital bölge temizliğine dikkat edilmemesi sonucunda oluşabilecek kontaminasyonlar nedeniyle örneklerin standardize edilmesi son derece zordur. Günlük su tüketimi de idrar yoğunluğu ve dolayısıyla metabolom konsantrasyonunu son derece önemli düzeyde etkilemektedir. Bu etki elde edilen intensity değerlerinin kreatinine oranlanması ile giderilebilir ancak bu durumda ise kreatinin ölçümünden gelen olası analitik hatalar sonuçları olumsuz yönde etkileyebilecektir. Özellikle, son derece düşük konsantrasyonlardaki metabolit bolluk (abundance) düzeylerini etkileyebilir ve bu nedenle çalışmanın güvenilirliği azalabilir.

Kaynaklar:

- Kirwan J. A., Brennan L., Broadhurst D., ve ark. (2018). Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for "Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group"-The Metabolomics Society Initiative). Clin Chem, 64(8):1158-82.
- Lee J. E., Kim Y. Y. (2017). Impact of Preanalytical Variations in Blood-Derived Biospecimens on Omics Studies: Toward Precision Biobanking? OMICS: A Journal of Integrative Biology, 21(9):499-508.
- Delanghe J. R., Speckaert M. M. (2016). Preanalytics in urinalysis. Clin Biochem, 49(18):1346-50.
- Zhang A., Sun H., Wu X., ve ark. (2012). Urine metabolomics. Clin Chim Acta, 24(414):65-9.

- Metabolomik analizinde önemli preanalitik faktörlerden biri de örnek toplama kapları ya da tüpleridir. Bu kaplar/tüpler ilgilenilen bileşikler bozmayan özellikte olmalıdır. Serum veya plazma tüplerinin aksine, idrar için kullanılan kaplar genellikle çıplak polipropilen kaplardır. Bu kaplar spesifik olmayan emilimi (adsorpsiyon) nedeniyle metabolit kayıplarına neden olabilmektedir.

Kaynaklar:

- Filzmoser P., Walczak B. (2014). What can go wrong at the data normalization step for identification of biomarkers? Journal of Chromatography A, 1362:194-205.
- İdrar hacmi ve akış hızı, gün boyunca bireyler arasında ve hatta birey içi büyük farklılıklar gösterir. Bunun nedeni, böbreklerin kan filtreleme ve salgılama işlevlerine ek olarak, idrar ile atılan su hacmini ve inorganik tuzların konsantrasyonlarını modüle ederek kanın hacmini ve pH'sını da ayarlamasıdır. Bu durum metabolomik çalışmalarında idrar örnekleri göz önüne alındığında önemli bir preanalitik faktör olarak karşımıza çıkmaktadır.
- Kandan süzülen ve/veya idrara salınan tuzlar ve metabolitler, kütle spektrometrisi ölçümlerini engelleyen bir iyon bastırma etkisine neden olabilir. Bu nedenle, idrar örnekleri genellikle ölçümden önce seyreltilir. Seyreltme oranı (genellikle 1:5 ile 1:20 arasındadır). Bu düzeyde gerçekleştirilen bir seyreltme optimizasyonu sağlanması son derece önemli bir problemidir.

Kaynaklar:

- Annesley T. M. (2003). Ion Suppression in Mass Spectrometry. Clinical Chemistry, 49(7):1041-4.
- Tanı amacıyla elbette girişimsel olmayan tekniklerin kullanılması arzu edilen bir durumdur. Ancak öncelik tanı aracının girişimsel olup olmadığından ziyade yüksek doğrulukla ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmektir. Bunun da en önemli şartlarından biri örnek stabilitesi ve preanalitik faktörlerin elimine edilmesidir. İdrar örneği göz önüne alındığında bu etkilerin ortadan kaldırılması plazmaya göre son derece zordur. Ayrıca plazma her organla ilişkilidir. Bu nedenle, sistem biyolojisini ve bütün bir sistemi açıklamamda en iyi yöntemdir. Ayrıca, tüm dünyadaki çalışmalar dikkate alındığında en fazla çalışılan örnek tipi plazma/serumdur. Kan alımı minimal girişimsel (invaziv) bir işlemdir. Elde edilen bilgi ve hastalığın önemi dikkate alındığında bütün bir sistemi açıklayıp genel bir yargıya varabilmek için olabildiğince fazla bilgi almak gerekir. Bu nedenlerle plazma ile çalışılması uygun görülmüştür.

Kaynaklar:

- Bujak R., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., ve ark. (2015). Metabolomics for laboratory diagnostics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 113:108-20.
- ODPBH hastalarına böbrek biyopsisi gibi girişimsel işlemlerin yapılması hem kanama açısından risklidir, hem de etik açıdan uygun değildir. Literatürde idrar örnekleri bu hastaların takibinde ve yeni patofizyolojik yolların açıklanmasında hücre ve materyal açısından yeterli olmadığı için çalışmalarda plazma kadar çok kullanılmamaktadır.

--

PG-2. Proje önerisinin özgün değer taşıdığı belirtilen yönleri olan hastalardan alınacak plazma örneklerinin kütle spektrometrisi ile analiz edilip, belirlenecek metabolitlerle yapılacak biyoinformatik analizlerle prognostik biyobelirteç belirleme çalışmaları literatürde hali hazırda bulunmaktadır (1-2). Ek olarak, ODPBH'ye özgü herhangi bir karar destek sisteminin bu zamana kadar geliştirilmediği belirtilmiş olmasına rağmen, buna yönelik yayın literatürde bulunmaktadır (3).

Kaynaklar:

- Baliga, M.M., Klawitter, J., Christians, U., Hopp, K., Chonchol, M., Gitomer, B.Y., Cadnapaphornchai, M.A., Klawitter, J. 2021. Metabolic profiling in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease, 11 (1), 6629.
- Kim, K., Trott, J.F., Gao, G., Chapman, A., Weiss, R.H. 2019. Plasma metabolites and lipids associate with kidney function and kidney volume in hypertensive ADPKD patients early in the disease course, BMC Nephrol, 20 (1), 66
- Abraham, A.G., Girardat-Rotar, L., Ziegler, S., Blum, M., Galletti, F., Puhon, M.A., Serra, A.L. 2018. A Clinical Patient Reporting Tool: Giving ADPKD Patients Back Their Data, Praxis (Bern 1994), 107 (8), 425-434.

R-2. Proje panelistlerinin görüşleri doğrultusunda, proje ile ilişkili olarak sunulan referans kaynaklar ile proje önerimiz arasındaki amaç, hedef ve metodolojik farklılıklar aşağıda belirtilmiştir:

(1) Baliga ve ark. (2021) çalışması ile proje önerimiz arasındaki farklılıklar:

- Baliga ve ark.**, 98 sağlıklı çocuk ve 78 ODPBH'li çocuk arasında farklılık gösteren belirteçleri ve yolları belirlemek ve bunların veya diğer belirteçlerin 3 yıl boyunca ODPBH'nin ilerlemesiyle ilişkili olup olmadığını belirlemek için çalışma yapmıştır. Bizim çalışmamızda hasta sayısı 250 olarak planlanmıştır ve ilgili çalışmaya kıyasla önemli ölçüde fazladır. Ayrıca, 7 yıl gibi uzun süreli takip yapılması planlanmaktadır. ODPBH yavaş seyirli bir hastalık olduğu için bu klinik çalışmaların takip süresi uzadıkça değer kazanmaktadır.
- Baliga ve ark.** çalışmasında hasta çeşitliliği kısıtlılık göstermektedir. Çalışmadaki tüm hastalara lisinopril (ACE inhibitörü) verilmiştir. Bu yüzden, iyi progresyon gösteren hastaların lisinopril kaynaklı mı hastalığın seyriyle mi alakalı olduğu belirlenememiştir. Bizim çalışmamızda ACE inhibitörü kullanan ve kullanmayan hasta grupları olacaktır.

- **Baliga ve ark.**'nın çalışmasındaki hastalarda PKD1 ve PKD2 gen mutasyonları çalışılmamıştır. Gen mutasyonları direk hastalık seyrini etkileyebilecek derecede önemli bir veridir. Bu yüzden metabolitlerin genetik mutasyonla olan ilişkisi incelenememiştir. Bizim çalışmamızda hastaların tamamının genetik mutasyon sonuçları bulunmaktadır. Bu sayede metabolitler ile PKD gen mutasyon ilişkisinin hastalık progresyonuna katkısı incelenebilecektir. Aynı zamanda HT (hipertansiyon), ht-TKV, proteinüri, yıllık GFR düşüşü gibi ODPBH progresyonunda kullanılan parametreler ile metabolitlerin hastalık progresyonuna olan etkisi makine öğrenimi yaklaşımları ile incelenecektir.
- İlgili çalışmada, analitik yöntem olarak QTRAP- tandem MS kullanılmıştır. Bu yöntem hedef gözetmen (targeted) metabolomik analizleri için kullanılabilir, fakat hedef gözetmeyen (untargeted) metabolomik analizi gerçekleştirememektedir. Hedef gözetmeyen metabolomik analizlerinde QTOF özelliği bulunan kromatografi sistemleri kullanılmalıdır. İlgili çalışmanın Yöntem bölümü incelendiğinde yazarların yaptıkları analizi hedef gözetmen metabolomik olarak adlandırdıkları görülecektir. Hedef gözetmen ve hedef gözetmeyen metabolomik çalışmaları birbirlerinden oldukça farklı iki analiz biçimidir. Projede yapacağımızı belirttiğimiz üzere hedef gözetmeyen metabolomik analizinde belli bir hedef olmadan mümkün olan en fazla sayıda metabolitin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Hedef gözetmen metabolomik analizlerinde ise ancak hedeflenen belli metabolitler tespit edilebilir. Bu durum olası tüm metabolomik etkilerin değerlendirilmesini engeller. Belirtilen çalışmada sadece 184 metabolit incelenmiştir. Hücre içinde en az 3000 farklı metabolitin olduğu düşünüldüğünde, ilgili çalışmada projemizle kıyasla son derece kısıtlı veriler elde edilmiştir. Bahsedilen nedenlerden dolayı, bu durumun projemizin özgün değerini kısıtlamayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar:

- Shulaev V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. Briefings in Bioinformatics, 7(2):128-39.
- Bujak R., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., ve ark. (2015). Metabolomics for laboratory diagnostics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 113:108-20.
- İlgili çalışmada hastalığın progresyonu ile ilişkili metabolitlerin tespit edilmesinde klinik çıktı olarak htTKV kullanılmıştır. Proje önerisinde ise hastalarda sonlanım noktası olarak glomerüler filtrasyon hızında düşüş (yıllık 5 ml/dak düşüş saptanması), hipertansiyon gelişimi (tansiyon değerlerinin 140/90 mmHg üzerinde seyretmesi), kardiyovasküler hastalık gelişimi (koroner arter hastalığı vb. gelişmesi), diyalize girmesi (son dönem böbrek yetmezliği gelişen evre 5 hastalar) ve sağkalım parametreleri değerlendirilecektir. Her bir klinik çıktı için ayrı ayrı değerlendirmeler yapılacaktır. Bu değerlendirmelerde kaynak gösterilen çalışmadan farklı olarak çok sayıda metabolitin her bir klinik çıktı üzerindeki etkisinin birlikte değerlendirilebileceği makine öğrenmesi yöntemleri kullanılacaktır. Makine öğrenmesi modelleri ile hastalığın prognozuyla ilişkin daha doğru kararların alınabilmesini sağlayacak ODPBH-Takip-Raporu geliştirilecektir. Dolayısıyla, önerilen projede kullanılan klinik çıktılar farklıdır, makine öğrenmesi yöntemleri kullanılmamıştır ve hastalığın takibine ilişkin bir rapor çıktısı bulunmamaktadır.

(2) Kim ve ark. (2019) çalışması ile proje önerimiz arasındaki farklılıklar:

- Kim ve ark., 277 normal böbrek fonksiyonu olan ODPBH hastalarında eGFR ve ht-TKV ile yüksek oranda korelasyon gösteren metabolitlerin ve lipidlerin varlığını gösteren bir çalışma yapmıştır. Bu metabolitlerin ve lipidlerin, hastalığın erken döneminde ortaya çıkan yeniden programlamanın yanı sıra metabolik düzensizliklerin ortaya çıkarılması için yararlı olabileceği düşünülmüştür. Anlık ölçümlerle değerlendirmenin bu çalışmanın kısıtlayıcı özelliği olduğunu düşünüyoruz. Şu anda hastalığın ilerleme oranını öngördüğü bilinen tek ölçüm olan ht-TKV'yi ölçmekten potansiyel olarak daha az maliyetli olan erken böbrek fonksiyon bozukluğunun ek belirleyicilerinin bulunması amaçlanmıştır. Biz de 250 ODPBH'li ile yapacağımız 7 yıllık takip sonucunda bireyselleştirilmiş eGFR, ht-TKV, proteinüri, PKD sonuçlarıyla metabolit seviyelerini inceleyerek hastalık progresyonunu takip etmek için yeni belirteçler bulmayı ve bunu yine bireyselleştirerek hasta bazlı takip karneleri oluşturmayı planlamaktayız.
- Söz konusu çalışmada GC-QTOF yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem, LC-QTOF-MS ile karşılaştırıldığında daha az sayıda metabolit tespit edebilmektedir. Ayrıca, volatil olmayan ve termal olarak stabil olmayan metabolitleri tespit edebilme gücü oldukça zayıftır. Çalışmada, bizim projemizde belirtilen yöntemden farklı bir ayırıştırma (seperasyon) tekniği kullanıldığından benzer bir çalışma olarak nitelendirilemeyeceği kanaatindeyiz.

Kaynaklar:

- Ren J. L., Zhang A. H., Kong L., ve ark. (2018). Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. RSC Advances, 40(8),22335-50.
- Büscher J. M., Czernik D., Ewald J. C., ve ark. (2009). Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. Anal Chem, 81(6), 2135-43.
- GC-TOF yöntemleri fazladan bir türevlendirme aşaması içermektedir. Bütün moleküllerin uçucu hale gelmesi mümkün olmadığından yukarıda verdiğimiz çalışmalar da dikkate alındığında yeterli ve geniş kapsamlı bir metabolom profili belirlemeye imkân tanımazlar. Özellikle molekül ağırlığı 500'den yüksek olan moleküllerin tespitinde sınırlı veri alınabilir. Buna karşın projemizde tercih edilen LC-TOF yöntemi ise 2000 Daltona kadar olan metabolitleri tespit edebilir. Bu yöntem, özellikle lipidlerde daha hassas ve tekrarlanabilir veriler elde edilmesini sağlar. LC-TOF yöntemi ile yapılan analizlerde HILIC kolon ile Ters faz kolonun birlikte kullanılması ile hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin önemli bir bölümünün tespit edilmesi ve geniş bir metabolom profilinin elde edilmesi mümkündür.
- İlgili çalışmada hastalığın progresyonu ile ilişkili metabolitlerin tespit edilmesinde klinik çıktı olarak htTKV ve eGFR kullanılmıştır. Bir önceki çalışmada da bahsedildiği üzere, önerilen projede kullanılan klinik çıktılar farklıdır, makine öğrenmesi yöntemleri kullanılmamıştır ve hastalığın takibine ilişkin bir rapor çıktısı bulunmamaktadır.

(3) Abraham ve ark. (2018) çalışması ile proje önerimiz arasındaki farklılıklar:

Proje önerisinde ODPBH'ye özgü herhangi bir karar destek sisteminin bu zamana kadar geliştirilmediği iddiası bulunmamaktadır. "ODPBH-Takip-Raporu"nın özgün tarafı metabolomik verilerine dayalı olarak kapsamlı makine öğrenmesi modellerine göre kestirim yapan, bu kestirim sonuçlarını raporlayan ve yorumlayan bir bireysel tıp proje ürünü olmasıdır. Abraham ve ark. (2018) çalışmasının projede amaçladığımız ODPBH'nin prognozuna yönelik geliştireceğimiz kişiye özel takip raporu ile herhangi bir benzerliği bulunmamaktadır. Bahsedilen çalışma kapsamında geliştirilen rapor, ODPBH'da hastalığın ilerleyişine yönelik metabolomik temelli oluşturulmuş bir takip raporu değildir. Ayrıca, 1.1. *Konunun Önemi, Projenin Özgün Değeri ve Araştırma Sorusu veya Hipotezi* kısmında *Projenin Özgün Değeri* alt başlığında da belirtildiği üzere bu rapor içerisinde herhangi bir makine öğrenmesi modeline ilişkin elde edilmiş kestirim bulguları yer almamaktadır.

--

PG-3. Bulunabilecek olası biyobelirteçlerin yer alacağı moleküler mekanizmaların araştırılmasına yönelik bilimsel kurguda kısıtlılıklar olduğu değerlendirilmiştir.

R-3. Projenin amaç ve hedefler kısmında belirtildiği üzere projede ana ulaşılmak istenen sonuç ODPBH hastalığının seyri (prognozuna) ile ilişkili metabolitlerin tespit edilmesidir. Günümüzde, hastalıkların patojenezinin veya projenin özet kısmında belirtildiği gibi kronik böbrek hastalık gelişimi ve moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında genomik, transkriptomik ve proteomik gibi daha öncül molekülün (DNA, RNA ve protein) tespitine olanak sağlayan "-omics" disiplinleri tercih edilmektedir. Bununla birlikte, prognoz ile ilişkili saptanabilecek potansiyel biyobelirteç(ler)in hangi metabolik süreçlerden geldiğinin bilinmesi diğer "-omics" bilimlerden elde edilen moleküler çalışmaları tamamlayıcı nitelikte olabilir. Sunmuş olduğumuz bu projenin ana amacı ODPBH hastalığına sebebiyet veren moleküler süreçlerin aydınlatılması olmadığı için,

4.1. *Projeden Elde Edilmesi Öngörülen Çıktılar* kısmında yazılmış olan "ile hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik bilimsel bulguların elde edilmesi hedeflenmektedir" ibaresi proje metninden çıkarılmıştır (bkz. Sayfa 22, Bilimsel çıktılar).

2. YÖNTEM

PG-1. *Projenin yöntemsel kurgusuna yönelik bir önceki panel raporundaki eleştirilerin yeterince ele alındığı ve düzeltmelerin yapıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte projenin yöntemlerine yönelik aşağıdaki eksiklikler belirlenmiştir:*

1- *Açık erişimli olmayan ticari bir ürün olan Ingenuity Pathway Analysis (IPA) yazılımının Bioconductor ağında bulunan hangi kütüphaneye nasıl analiz edilebileceği açıklanmamıştır.*

R-1. Panelistlerin belirtmiş olduğu Ingenuity Pathway Analysis (IPA) yazılımı QIAGEN IPA (QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis) ticari firmasına ait ücretli lisans içeren bir yazılımdır. Söz konusu yazılım R programlama dilinin BIOCONDUCTOR ağında bulunan herhangi bir kütüphaneye analizi mümkün olsa dahi, panel görüşünde belirtildiği gibi ücretli lisans gerektirmektedir. Bu durum, proje önerisinde belirtildiği üzere; (i) ODPBH hastalığının klinik çıktılarına yönelik kestirimler yapacak çok sayıda makine öğrenmesi ve derin öğrenme modelini içeren **açık kaynak kodlu MLMS R/BIOCONDUCTOR kütüphanesinin geliştirilmesi**, (ii) ayrıca, MLMS kütüphanesinin yanı sıra geliştirilecek web ara yüzünün **açık kaynak kodları** GitHub üzerinde ücretsiz olarak paylaşılması ve geliştirilmesi ifadesi ile ters düşmektedir. Bu nedenle, panelistlerin önerisi doğrultusunda ücretli lisans isteyen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) yazılımı içeren tüm ifadeler proje önerisinden çıkarılmıştır. Günümüzde açık kaynak kodlu metabolik yolak zenginleştirme yazılımı/araçları (örneğin MetaboAnalystR 3.0) olduğu için, IPA yazılımının projede herhangi bir eksiklik oluşturmayacağı düşünülmektedir.

--

PG-2. *2- Zenginleşme analizleri için neden sekiz farklı aracın birden kullanılması istendiği ve her bir aracın çıktılarının nasıl değerlendirileceği yöntem bölümünde açıklanmamıştır. Ayrıca metabolik yolakların aktifleşme skorlarının nasıl hesaplanacağı da belirsizdir.*

R-2. Bilindiği üzere, biyolojik verilerin analizi noktasında geliştirilen biyoinformatik araçların ve/veya yaklaşımların birbirlerine kıyasla üstünlükleri ve eksik yönleri bulunmaktadır. Söz konusu olumsuzluğu gidermek ve biyolojik açıdan anlamlı olan bir belirtecin kaçırılmasının engellemek için çoğunlukla çoklu yazılım birlikte kullanılmaktadır. Projenin "**Konunun Önemi, Araştırma Sorusu veya Hipotezi**" kısmında, metabolik yolak zenginleştirme analizleri ile ilişkili olarak 12 yöntem sıralanmıştır (3omics, BioCyc/HumanCyc, IMPALA, IPA [proje metninden çıkarılmıştır], MetaboAnalystR, MBRole, MetaBox, MetaCore, MetaMapp, MetExplore, MetScape, MPEA, PaPi). Projenin yöntem kısmı "**Ham metabolomik verilerinin elde edilmesi, verilerin kontrolü, biyoistatistiksel yöntemler ile analiz edilmesi, biyolojik yolaklar ile ilişkilendirilmesi ve potansiyel biyobelirteçlerin tespiti**" alt başlığında ise yolak zenginleşme analizi için IPA [proje metninden çıkarılmıştır], MetaboAnalystR, MBRole, MetaBox, MPEA, MetaCore ve PaPi yöntemleri olmak üzere 7 ayrı yöntemin kullanılacağı belirtilmiştir. Omics bilimlerinde özellikle transkriptomik ve metabolomik çalışmalarda transkriptin veya metabolitin yer aldığı metabolik yolağın, biyolojik sürecin veya moleküler işlevin önem sırasının belirlenmesinde Fisher exact veya Hipergeometrik gibi zenginleştirmeye yönelik istatistiksel test yöntemleri kullanılmaktadır. Metabolomik çalışmalarda yolak zenginleştirme analizlerinde "metabolite set zenginleştirme analizleri (MSEA)" ve "over representation analysis (ORA)" olmak üzere iki yaygın yaklaşım kullanılmaktadır. MSEA yaklaşımında, bireysel metabolitlere bağlı olmak yerine önceden belirlenmiş ve işlevsel olarak ilişkili metabolitlerin gruplar arasındaki değişimini analiz etmek için kantitatif veri seti kullanılmaktadır (Xia vd., 2010; Chagoyen vd.,

2011; Kankainen vd., 2011). ORA analizinde ise metabolik yolak zenginleştirme analizleri seçilen bir grup metabolitin bir grup metabolit ile istatistiksel olarak karşılaştırılmasına ve testine dayanmaktadır (Marco-Ramell vd., 2018). Bu doğrultuda, **Marco-Ramell vd. (2018)** metabolomik veri setinden hem yolak zenginleştirme analizi yapan biyoinformatik araçları hem de metabolik yolak ile ilişkili veri tabanlarını karşılaştıran kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmiştir (Marco-Ramell vd., 2018). Çalışmada, ORA analizleri gerçekleştiren araçlar (BioCyc/HumanCyc, ConsensusPathDB, IMPaLA, MBRole, MetaboAnalystR, Metabox, MetExplore, MPEA, PathVisio, Reactome ve KEGGREST) karşılaştırılmıştır ve kullanılan biyoinformatik araçlardan elde edilen sonuçların birbirleri ile benzer olduğu, esas fark yaratan kısmın seçilen veri tabanının ne kadar metabolit içerdiği ve hem biyoinformatik aracın hem de veri tabanının ne sıklıkla güncellendiğinin önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu doğrultuda hangi zenginleştirme aracının seçilmesi noktasında iki ana kriter bulunmaktadır; birincisi analizi gerçekleştiren aracın güncel veri tabanları ile uyum içinde çalışması ve analiz aracının sürekli geliştirilmesidir. Bu nedenle, MetaboAnalyst 5.0 (Pang vd., 2021; <https://www.metaboanalyst.ca/>) aracı ve açık kaynak kodlu R versiyonu olan MetaboAnalystR 3.0 kütüphanesi metabolik yolak zenginleştirme aracı olarak seçilmiştir. Şuan 5. versiyonu çıkan ve sürekli güncellenen zenginleştirme aracıdır ve MetaboAnalyst 5.0 içerisinde bulunan ve beş modülden birisi olan "Enrichment Analysis module" sürekli güncellenen HMDB, KEGG, PubChem, ChEBI, RefMet ve LIPID MAPS veri tabanları ile bütünleşik biçimde çalışabilmektedir. Bu doğrultuda, projede sunulan diğer zenginleştirme analiz araçları proje metninden çıkarılmıştır.

Kaynaklar:

- Chagoyen M, Pazos F. MBRole: enrichment analysis of metabolomic data. *Bioinformatics*. 2011;27(5):730–731.
- Kankainen M, Gopalacharyulu P, Holm L, et al. MPEA—metabolite pathway enrichment analysis. *Bioinformatics*. 2011;27(13):1878–1879.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., & Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic acids research*.
- Xia J, Wishart DS. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(suppl_2):W71–W77.

Yolak aktifleşme skorlarının hesaplanmasına ilişkin yöntemsel detaylar özet olarak Projenin Yöntem bölümüne eklenmiştir. Proje başvuru dosyasındaki sayfa limitinden dolayı yolak aktifleşme skorlarının hesaplanmasına yönelik detaylı yöntemsel açıklamalar kalıcı bağlantı olarak <https://avesis.erciyes.edu.tr/gokmenzararsiz/dokumanlar> adresine yüklenmiştir. Bu adreste "Yolak_aktifleşme_skorları.docx" dosyasından bu detaylara ulaşılabilir.

--

PG-3. Performans verilerinin değerlendirilmesinde kullanılacak ölçütler net olarak belirtilmemiştir.

R-3. Yöntem bölümünün *Kapsamlı geçerlilik çalışmaları ve performans değerlendirmesi* alt başlığında açıklanmıştır. Performans ölçütü olarak duyarlılık, seçicilik, dengeli doğruluk oranı, Matthew korelasyon katsayısı ve F1 skoru kriterleri kullanılacaktır. Sağkalım analizlerinde ise ölçüt olarak Harrell C endeksi kullanılacaktır. Panelistlerin önerileri doğrultusunda bu ölçütler Yöntem başlığı altında detaylandırılmıştır.

3. PROJE YÖNETİMİ

PG-1. a. Yönetim Düzeni ve Risk Yönetimi: Projenin amaç ve hedeflerine ulaşılabilmesi için iş paketlerinin kapsamı ve iş-zaman planlaması uygulanabilir ve yeterlidir. Başarı ölçütlerinin takip edilebilir verilmemesi bir eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Projenin başarısını tehdit edebilecek hipoteze yönelik risklere yer verilmemiştir.

b. Proje Ekibi: Proje ekibi bu alanda başarılı, uzman kişilerden oluşmaktadır.

c. Araştırma Olanakları: Kuruluşun altyapısı projenin gerçekleştirilmesi için uygundur.

R-1. Panelist görüşleri doğrultusunda takip edilebilir başarı ölçütleri eklenmiş ve proje başarısını tehdit edebilecek hipoteze yönelik riskler eklenmiştir.

4. YAYGIN ETKİ

PG-1. Proje önerisinin hedefleri kapsamında elde edilebilecek biyobelirteçler ve sonrasında geliştirilecek yazılımlar bilimsel makaleye dönüştürülebilir. Ancak, proje çıktılarının ekonomik katma değere dönüşme olasılığı zayıf olarak değerlendirilmiştir. Proje kapsamında genç bursiyer araştırmacıların yetiştirilmesi hedefi yaygın etkiye olumlu bir katkı sunmaktadır. Proje çıktılarının yayılımına yönelik planlanmış olan web sayfası oluşturulması ve bir toplantıya yönelik planlamalar olumlu karşılanmıştır.

R-1. Proje metninde ayrıntılı olarak açıklandığı gibi ODPBH hastalığının seyri (prognozuna) ile ilişkili metabolitlerin tespit edilmesi ve diğer klinik parametreler ile birlikte ODPBH hastalığının ilerleyişi sırasında tedaviyi yönlendirecek bilgiyi içeren raporun klinikte kullanılıyor olması öncelikli hastanın refahı açısından önem taşımaktadır. Özellikle ODPBH hastalığının kötü ilerleyişinin erken tespiti, tedaviyi yönlendireceği için hastanın diyalize ve renal transplantasyonun önüne erken geçilebilmesi başta halk sağlığı, hasta olması nedeniyle iş gücünden bireylerin çekilmesi, hastaların daha sık hastanelere gitmesinin önüne geçilmesi nedeniyle, proje önerisinin ekonomik açıdan potansiyel barındırdığı kanaatindeyiz.

PROJE İLE İLGİLİ DİĞER GÖRÜŞLER

PROJE SÜRESİNİN UYGUNLUĞUNA İLİŞKİN GÖRÜŞ VE ÖNERİLER

PROJENİN BÜTÇESİNİN UYGUNLUĞUNA İLİŞKİN GÖRÜŞ VE ÖNERİLER