Dr hab. med. Marcin Matuszewski

Kierownik Katedry i Kliniki Urologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 21.08.2017

Ocena pracy doktorskiej lekarza medycyny Grzegorza Młynarczyka pt.: Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w raku nerki"

Rak nerki jest obecnie jednym z najważniejszych problemów onkologii urologicznej. Mimo pewnego postępu badań nad chemioterapią celowaną jest to nadal nowotwór, w którym jedyną szansą wyleczenia jest zabieg chirurgiczny. Oznacza to, że w przypadku gdy wycięcie guza jest niemożliwe, chorzy prawie nieuchronnie umierają. W innych nowotworach, o których wiemy więcej, mamy pacjentom do zaoferowania znacznie więcej. W związku z tym badania podstawowe, mające na celu poznanie różnych mechanizmów molekularnych wpływających na powstawanie i rozwój tego nowotworu są niezwykle potrzebne. Mamy nadzieje, że nowe dane uzyskane o raku nerki pozwolą nam na wprowadzenie nowych lepszych sposobów leczenia.

Przedstawiona mi do oceny praca lekarza medycyny Grzegorza Młynarczyka dotyczy aktywności metaloproteinaz: MMP-1 (kolagenazy 1), MMP-3 (stromalizyny 1), MMP-7 (matrylizyny 1), MMP-9 (żelatynazy B) i MMP-14 (metaloproteinazy błonowej), czyli enzymów metabolizujących elementy macierzy pozakomórkowej. Niektóre z nich są od dawna znane pod nazwą kolagenaz i uczestniczą np. w regulowaniu gojenia ran czy tworzeniu blizn. Doktorant skoncentrował się na badaniu obecności metaloproteinaz w tkance raka nerki jak i obecności mechanizmów wpływających na regulacje aktywności tych enzymów w tej tkance. Źródłem powstania koncepcji pracy były pojawiające się doniesienia, że metabolizm pozakomórkowej tkanki łącznej ma znaczenie w rozwoju nowotworów. Pierwsze obserwacje tego zjawiska poczynił już w 19-tym wieku urodzony w Świdwinie pionier patologii Rudolf Virchov, który wysnuł koncepcję, że rak jest podobny do nigdy nie gojącej się rany. Dziś wiemy, że znaczenie może mieć w tym procesie wymiana czynników stymulujących pomiędzy tkanką łączną, a nowotworem. Podobnie metabolizm macierzy pozakomórkowej ma znaczenie w lokalnej progresji i powstawaniu przerzutów. Takie zjawisko występuje także w raku nerki. Każdy urolog widział guz nerki o umiarkowanej złośliwości otoczony wyraźną torebką tkanki łącznej, jak i inny, agresywny, naciekający nowotwór pozbawiony takiej torebki. Podobnie wiemy, że uwolnienie przez guz komórek przerzutowych wiąże się z zaburzeniem łącznotkankowej, czyli

zbudowanej z pozakomórkowej macierzy, struktury podporowej. Powyższe zjawiska są powszechnie obserwowane, ale cały czas mało wiemy na temat procesów biologicznych, które je powodują. Nie wiemy w związku z tym jak wpływać na te mechanizmy walcząc z chorobą. Biorąc to pod uwagę myślę, że wybrany przez doktoranta temat jest bardzo ciekawy i wartościowy zarówno z punktu widzenia jego własnego rozwoju naukowego jak i poszerzenia zakresu wiedzy w tej dziedzinie.

Redakcyjny układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Najpierw zawiera wstęp, w którym autor w sposób staranny opisuje najnowsze podstawowe informacje na temat macierzy pozakomórkowej, metaloproteinaz, czyli enzymów uczestniczących w jej metabolizmie, oraz mechanizmów regulujących ten proces. Opisuje także dane z piśmiennictwa dotyczące możliwego wpływu przemian w macierzy na powstawanie i rozwój raka nerki w zakresie wystarczającym dla potrzeb pracy. Zawarty potem skrócony opis informacji na temat innych nowotworów dróg moczowych nie ma związku z pracą.

Następnie doktorant w pracy umieścił rozdział nazwany: „Cel pracy". Zawarł w nim luźno powiązaną serię informacji o tym co badał i dlaczego. Powinno to zostać skorygowane. Cele pracy muszą zawierać konkretne zamierzenia badawcze, które za pomocą analizy zebranych wyników staramy się zrealizować, co z kolei będzie prowadzić do wysnucia wniosków omówionych szerzej w dyskusji. Oczywiście czytając całą pracę możemy się domyślić co i dlaczego doktorant chciał badać i co z tego wynikło. Warsztat naukowy, który mamy oceniać wymaga jednak, żeby było to jakoś systematycznie określone, w korelacji do uzyskanych wniosków. Najlepiej w tym celu podać listę celów. Gdyby za taką przyjąć, podaną w tym rozdziale, jakby przy okazji, listę ocen i pomiarów jakie według doktoranta umożliwiły oznaczenia, z użyciem zymografii, elektroforezy itp., to trudno z kolei znaleźć ich korelacje z daleko idącymi sformułowaniami dotyczącymi zależności z biologią nowotworu zwartymi we wnioskach.

Badanie zrealizowano na podstawie analizy biochemicznej próbek tkanki uzyskanych z 20 nerek usuniętych z powodu raka. Oceniano 20 próbek guza i 20 normalnej tkanki jako kontrolę. Do analiz użyto tkanek z nowotworów podzielonych na dwie grupy G2 i G3 (po 10). Niestety nie określono precyzyjnie, czy to oznaczenie odnosi się do stopnia złośliwości, czy stadium zaawansowania, czy do „wzrostu raka nerki" jak we wniosku 3. Nie jest to oczywiście to samo. Powinno być to wyjaśnione i poprawione. Wydzielenie grupy G2 i G3 jest jednym z najważniejszych czynników warunkujących sens pracy i nie może budzić wątpliwości.

W dalszej części rozdziału o metodach doktorant szczegółowo opisuje metodykę badania, często używając formy pierwszej osoby, podkreślając osobiste zaangażowanie w prace laboratoryjną, co należy docenić.

Następnie w pracy przedstawione są wyniki. Mimo niewielkiej grupy badanej pokazują one, że stan macierzy pozakomórkowej w tkance nerki i tkance guza nerki różni się znacząco. Moją uwagę przykuł tylko pewien powtarzający się szczegół. Doktorant we wszystkich tabelach i wykresach używa sformułowań np. : „Zawartość MMP-3 w nerkach", lub „Aktywność MMP-4 w rakach". Tak naprawdę powinno to być „ Średnia zawartość MMP-3 w nerkach", lub „ Średnia aktywność MMP-4 w rakach", bo rozumiem, że podane wartości liczbowe zostały obliczone na podstawie średniej z oznaczeń wszystkich próbek.

Na podstawie analizy wyników doktorant sformułował 6 wniosków.

Wniosek 1. „W przebudowie nerki w raku jasnokomórkowym bierze udział MMP-1, MMP-3 , MMP-7 , MMP-9 i MMP-14."

Rozumiem, że wniosek jest realizacją ewentualnego celu badania: „Ocena, czy analizowane metaloproteinazy biorą udział w przebudowie nerki w raku jasnokomórkowym."

Z uzyskanych wyników widać, że rzeczywiście średnia zawartość, aktywność, czy aktywność właściwa wszystkich badanych metaloproteinaz jest statystycznie różna w tkance nowotworowej w porównaniu z tkanką prawidłową nerki. Trudno natomiast twierdzić, że praca udowodniła, że uczestniczą one w „przebudowie" nerki w raku. Taką hipotezę można co najwyżej zawrzeć w dyskusji i to też bardzo ostrożnie biorąc pod uwagę, że przebadano tylko 20 próbek tkanki guza.

Wniosek 2. „Badane metaloproteinazy występują przede wszystkim w wielkocząsteczkowych kompleksach."

Wniosek nie ma związku z jakimkolwiek celem pracy, ale faktycznie w przebiegu badań potwierdzono taką obserwację

Wniosek 3. „Zmniejszająca się zawartość kolagenu ułatwia wzrost raka nerki."

Doktorant wykazał, że ilość kolagenu w tkance nowotworu nerki jest mniejsza niż w normalnej tkance nerki. Nie wiadomo na jakiej podstawie wysnuł zależność ze wzrostem raka. To co można jedynie powiedzieć, to że ilość kolagenu w rakach G3 jest mniejsza niż w rakach G2. Oczywiście należy ustalić co to znaczy G2 i G3. Ewentualna hipoteza, że wzrost stopnia złośliwości raka koreluje ze zmniejszaniem się ilości kolagenu, co może mieć wpływ na łatwość rozprzestrzeniania się nowotworu może znaleźć się w dyskusji.

Wniosek 4. „Zróżnicowana zawartość i aktywność badanych enzymów może świadczyć o ich roli i znaczeniu na różnych etapach wzrostu raka nerki."

Trudno określić co doktorant ma na myśli w tym bardzo ogólnym wniosku.

Wniosek 5. „W stadium zaawansowania G2 dominują MMP-9, MMP-3, MMP-14, a w stadium G3 – MMP-1 i MMP-7."

Abstrahując od terminu G2 i G3 nie wiadomo, co oznacza dla doktoranta słowo „dominują". Nie jest jasne, czy wniosek ten pochodzi tylko z analizy zymografii, czy też z badań Western immunoblot i immunoenzynatycznych z wykresów których wynika, że np. średnio MMP-9 ma wyższą zawartość w rakach G3, a tylko niższą aktywność i aktywność właściwą niż w rakach G2. MMP-3 ma wyższe wszystkie trzy wartości w G2 niż w G3. MMP-14 nie wykazuje znamiennych różnic pomiędzy G2 i G3. MMP-1ma większą średnią zawartość w rakach G2, a niższą średnią aktywność i aktywność właściwą. MMP-7 ma większą średnią zawartość i średnią aktywność w G2, a większą średnią aktywność właściwą większa w G3. W poprawionej wersji trzeba też konsekwentnie stosować terminy" obecność, ekspresja, zawartość i aktywność.

Wniosek 6. Jest tylko rozwinięciem wniosku 5

Zastanawiający jest brak odniesienia się we wnioskach do oznaczeń inhibitorów TIMP-1 i TIMP-4.

Podsumowując, stwierdzam, że praca lekarza medycyny Grzegorza Młynarczyka pt.: „Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w raku nerki" wymaga dość istotnych poprawek, które powinny być dokonane w prezentacji i ocenione podczas publicznej obrony w kontekście spełniania wymogów stawianym rozprawom doktorskim. Pod tym warunkiem przedkładam Pani Dziekan i Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie wyżej wymienionego do kolejnego etapu przewodu doktorskiego.

Dr hab. med. Marcin Matuszewski

K I E R O W N I K
KATEDRY I KLINIKI UROLOGII
Gdański Uniwersytet Medyczny

dr hab. med. Marcin Matuszewski