WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego

Warszawa 21.08.2017r.

Ocena

rozprawy doktorskiej **lek. Grzegorza Młynarczyka**

pt. *„Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w raku nerki"*,

wykonanej w Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) to liczna i zróżnicowana grupa enzymów proteolitycznych. Działając jako endopeptydazy, zapoczątkowują degradację wielu białek pozakomórkowych. Rozkładają kolageny tworzące włókna, kolageny błon podstawnych, co sprzyja np. migracji komórek nowotworowych, a także elastynę, glikoproteiny strukturalne, rdzenie białkowe proteoglikanów oraz liczne białka adhezyjne. Ich działanie doprowadza do uwalniania wielu czynników wzrostowych, co w efekcie umożliwia przebudowę macierzy pozakomórkowej. Wydzielane są z komórek w formie proenzymów, których aktywacja może być odwracalna (zmiana konformacji żelatynaz na skutek rozerwania wiązania atomu Zn z grupą -SH cysteiny), lub nieodwracalna (na drodze ograniczonej proteolizy). Aktywność ich może być hamowana przez endogenne, białkowe inhibitory tkankowe (TIMP-1, 2, 3, 4), co zapobiega nadmiernej degradacji macierzy pozakomórkowej. Poza komórkami prawidłowymi (głównie tkanki łącznej), metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej syntetyzowane są także przez komórki nowotworowe. Powodowane przez te enzymy zmiany strukturalne macierzy pozakomórkowej stanowią kluczowy element kancerogenezy. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę na wszystkich etapach procesu nowotworzenia, od powstania nacieku pierwotnego do wytworzenia odległych przerzutów.

Rak nerki występuje stosunkowo rzadko, jednak liczba zachorowań na ten nowotwór z każdym rokiem rośnie. Ze względu na długi, bezobjawowy przebieg, jego rozpoznanie często jest późne i przypadkowe.

Dlatego **CEL** rozprawy doktorskiej lek. Grzegorza Młynarczyka, którym jest zbadanie zawartości i aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w raku jasnokomórkowym nerki, w dwóch fazach złośliwości morfologicznej, oraz ocena ich roli w tym najczęściej występującym nowotworze tego narządu, jest w pełni uzasadniony.

We **WSTĘPIE** Autor w sposób zwięzły, przejrzysty i klarowny opisał budowę i znaczenie macierzy pozakomórkowej. Następnie przeszedł do charakterystyki metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMP), przedstawił podział tej bardzo licznej grupy enzymów, ich syntezę i regulację, ze szczególnym uwzględnieniem tkankowych inhibitorów (TIMP). Pokrótce omówił także udział metaloproteinaz w procesie nowotworzenia. W kolejnej części, poświęconej układowi

moczowemu, opisał najczęściej występujące nowotwory tego układu którymi są raki nerki i pęcherza moczowego. Wśród raków nerki ponad 90% stanowi rak nerkowokomórkowy, a najczęstszym typem histopatologicznym tego nowotworu jest badany przez Doktoranta jest rak jasnokomórkowy (ccRCC).

MATERIAŁ badawczy stanowiły tkanki pochodzące od 20 chorych poddanych radykalnej nefrektomii, pobierane przez Doktoranta podczas jego asysty przy zabiegu operacyjnym. Pobrane tkanki nowotworowe były kwalifikowane do badań po uprzedniej ocenie histopatologicznej, na podstawie której wyodrębniono 10 przypadków raka ccRCC o mniejszej i 10 o większej złośliwości (odpowiednio, G2 i G3). Grupę kontrolną stanowiły fragmenty nerki bez zmian nowotworowych. Należy zaznaczyć, że cały materiał badawczy był bardzo starannie dobrany, a tkanka kontrolna dla każdego guza pochodziła z przeciwległego bieguna tej samej nerki. Przedmiotem badań było pięć metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, MMP-1, -3, -7, -9 i -14, będących przedstawicielami każdej z pięciu grup tych enzymów oraz dwa tkankowe inhibitory, TIMP-1 i TIMP-4.

W swoich badaniach Doktorant zastosował klasyczne **METODY** pomiaru zawartości kolagenu, DNA i białka. Aktywność kolagenolityczną i proteolityczną badanych metaloproteinaz badał metodą zymografii stosując odpowiednio, żelatynę i karboksymetylotransferynę jako substraty. Metodą fluorymetryczną oznaczał aktywność aktualną, wyrażaną w katalach/kg białka całkowitego oraz aktywność właściwą, wyrażaną w katalach/kg badanego enzymu. Poziom białka metaloproteinaz oraz ich inhibitorów badał metodą Western blottingu, a zawartość metaloproteinaz przy pomocy ELISY.

Uzyskane **WYNIKI** opisał jasno i przedstawił w formie jednej tabeli i 24 klarownych rycin. Wykazał, że stężenie kolagenu, białka rozkładanego przez badane w pracy enzymy, jest istotnie obniżone w raku nerki w porównaniu do tkanki prawidłowej oraz spada wraz z zaawansowaniem nowotworu. Oznaczając poziom DNA stwierdził, że jego zawartość zwiększa się w guzach i koreluje ze spadkiem kolagenu, co wskazuje na przebudowę macierzy pozakomórkowej. Ze względu na mnogość form w jakich występują metaloproteinazy *in vivo* (aktywnej, nieaktywnej, wolnej, związanej z inhibitorem) oznaczył ogólną aktywność kolagenolityczną i proteolityczną w ekstraktach tkankach, a następnie poziom białka i aktywność poszczególnych enzymów. Wykazał, że wszystkie badane metaloproteinazy występują w raku nerki głównie w wielocząsteczkowych kompleksach, a ich zawartość i aktywność zmienia się w zależności od stadium zaawansowania nowotworu i jest inna niż tkance prawidłowej. W tkance prawidłowej zdecydowanie najwięcej jest MMP-1, która wykazuje najmniejszą aktywność właściwą, a najmniej MMP-3, która wykazuje najwyższą aktywność właściwą. Tylko zawartość MMP-9 rośnie w raku, w szczególności w stadium G3, jednak jej aktywność w tym stadium, w porównaniu do G2 jest niska. Badania i porównanie aktywności aktualnej i właściwej wykazały, że właśnie te trzy metaloproteinazy, MMP-1 (kolagenoza 1), MMP-3 (stromelizyna 1) i MMP-9 (żelatynaza B) odgrywają największą rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej w raku nerki. Ich znaczenie w tym procesie zależy od stopnia zaawansowania guza i tak: MMP-1 dominuje w stadium G3, a dwie pozostałe w stadium G2.

DYSKUSJA jest dość obszerna, merytoryczna, napisana bardzo poprawnym językiem i co nie jest częste, czyta się ją z dużym zainteresowaniem. Autor omawia, analizuje i właściwie interpretuje uzyskane wyniki oraz porównuje je z badaniami innych badaczy. Na zakończenie wyciąga sześć **WNIOSKÓW** wypływających z przeprowadzonych badań, z który nr 4 jest dość ogólny i wg mnie mógł by być pominięty, a nr 5 połączony z pierwszym. We wniosku nr 6 brakuje uściślenia na czym polega udział trzech najważniejszych metaloproteinaz w przebudowie macierzy pozakomórkowej.

Rozprawa napisana jest bardzo starannie, w sposób jasny i przejrzysty, a jej strona graficzna jest na dobrym poziomie. Znaczna liczba (155) cytowanych prac, głównie z piśmiennictwa anglojęzycznego, w tym wielu z ostatnich lat, świadczy o szerokim zainteresowaniu i znajomości Doktoranta omawianą tematyką. W konsekwentnie zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach Autor osiągnął postawiony cel.

Rozprawa lek. Grzegorza Młynarczyka pt. *„Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej w raku nerki"* odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim. Bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Doktoranta z biochemii, znajomość nowoczesnych metod badawczych oraz umiejętność prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników upoważniają mnie do przedstawienia Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim w Białymstoku wniosku o dopuszczenie lek. Grzegorza Młynarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Anna Barańczyk – Kuźma
Kierownik Katedry i Zakładu Biochemii WUM