



Българска академия на науките

Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей

Автореферат

за придобиване на ОНС „доктор“ по „Морфология“ (01.06.26),
Професионално направление 4.3 „Биологически науки“

(Проект)

Тема:

„Проучвания върху маркерната роля на Аминопептидаза А при рак на млечна жлеза чрез нови субстрати и инхибитори“

Весела Симеонова Петрова

Научен ръководител: проф. Маша Димитрова, дб

Научни консултанти: доц. Ивайло Иванов, дб

доц. д-р Веселина Ценова, дм

2019, София

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам своите най-сърдечни благодарности на научния си ръководител проф. Маша Димитрова за доверието в мен, непрекъснатата подкрепа и ценни съвети, без които настоящата дисертация не би могла да се осъществи.

Изказвам благодарности и на моите научни консултанти доц. Ивайло Иванов и доц. д-р Веселина Ценова за помощта, препоръките и напътствията.

Благодаря най-искрено и на доц. Иван Илиев, гл. ас. Величка Павлова и лаборант Яна Гочева за оказаното съдействие и подкрепа.

Изказвам благодарност и към ръководството на ИЕМПАМ за предоставената възможност и съдействие при реализирането на настоящата работа.

Благодаря и на проектите по ОП „Развитие на човешките ресурси“ (договор BG 051PO001-3.3.06-0048/04.10.2012 г.) и ОП „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020 г. (договор BG05M2OP001-2.009 -0019-C01/02.06.2017 г) за предоставените материали.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения.....	1
Увод.....	3
I. Цел и задачи.....	4
II. Материали и методи.....	5
II.A. Материали.....	5
II.B. Методи.....	6
II.B.1. Молекулно моделиране.....	6
II.B.2. Определяне на кинетичните параметри на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC.....	6
II.B.3. Определяне типа на инхибиране на АРА от GH и инхибиторната константа K_i	6
II.B.4. Определяне на максималната скорост и константата на Михаелис на Glu-AMAC в хомогенати от клетъчни линии в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони.....	7
II.B.5. Определяне скоростта на ензимна хидролиза на Glu-pNA в хомогенати от клетъчни линии в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони.....	7
II.B.6. Експерименти <i>in vivo</i> върху модел на карцином на млечна жлеза при мишки – асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих.....	7
II.B.7. Ензимна хистохимия.....	8
II.B.8. Ензимна цитохимия.....	8
II.B.9. Получаване на клетъчни хомогенати и хомогенати от солидна форма на тумор на Ерлих.....	9
II.B.10. Клетъчно култивиране.....	9
II.B.11. Определяне на клетъчна жизненост.....	10
II.B.12. Метод за определяне на клетъчна пролиферация.....	10
II.B.13. Определяне въздействието на инхибитора GH, оксалиплатина и комбинация от инхибитор и оксалиплатина върху пролиферативната активност на клетки.....	10
II.B.14. Получаване на препарати, оцветени с акридин оранж / пропидиев йодид..	11
II.B.15. Определяне на ензимната активност на фибробласт активиращ протеин α (FAP) в хомогенати от клетъчната линия MCF-10A.....	11
II.B.16. Определяне на нивото на апоптоза чрез активността на каспаза-3.....	11
III. Резултати и дискусия.....	12
III.1. Флуорогенен субстрат за цито- и хистохимично локализиране на АРА Glu-HHNI.....	12
III.2. Флуоресцентен субстрат за биохимично изследване на АРА Glu-AMAC.....	15

III.3. Специфичен инхибитор за АРА.....	18
III.4. Експерименти <i>in vivo</i> върху модел на карцином на млечна жлеза при мишки – асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих.....	21
III.5. Активност на АРА при нормални и туморни фибробласти от мишка.....	25
III.6. Изследване на активността на АРА в моделна система от три човешки клетъчни линии.....	26
III.7. Действие на специфичен инхибитор на АРА GH върху човешки клетъчни линии.....	31
III.8. Изследване на локализацията и активността на АРА в криостатни срези от оперативни биопсии при тумори на млечна жлеза.....	35
IV. Изводи.....	37
V. Приноси.....	38
VI. Литература.....	40
VII. Списък на публикации и участия, свързани с дисертационния труд.....	48

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ :

Списък на използваните съкращения на кирилица:

ДНК - Дезоксирибонуклеиновата киселина

Списък на използваните съкращения на латиница:

ACE - Ангиотензин-конвертиращия ензим

Ang II – Ангиотензин II

Ang III –Ангиотензин III

AngIV - АнгиотензинIV

APA – Аминопептидаза А

AT - рецептори – Ангиотензинови рецептори

BRAC – Breast Cancer gene

ССК-8 - Холецистокенин-8

CCRCC - Clear cell renal cell carcinoma

CEA - Карциноембрионален антиген

ChRCC - Chromophobe renal cell carcinoma

DCIS - Дуктален карцином *in situ*

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Диметил сулфоксид

DSR - Dahl salt-resistant rats

DSS - Dahl salt-sensitive rats

E33 - 3-амино-4-тиобутил сулфонат

EAC – Erlich's Ascites Carcinoma

EDTA - Етилендиамин тетраоцетна киселина

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

EMT - Епително-мезенхимен преход

ER - Естрогенен рецептор

FAP - Фибробласт активиращ протеин

FBS - Фетален телешки серум

GH - α -глутамил хидроксамат

Glu-AMAC - α -глутамил-2-акридониламид

Glu-HHNI - α -(глутамилхидразида)-N-хексил-1,8-нафталимид

Glu-MCA - α -глутамил-4-метилкумарил-7-амид

Glu-pNA - α -глутамил-4-нитроанилид
hCG - Човешки хорион-гонадотропин
HER2 - Рецептор за епидермален растежен фактор 2
IC₅₀ – Концентрация на полу-инхибиране
IDC - Инфилтриращ (инвазивен) дуктален карцином
ILC - Инфилтриращ (инвазивен) лобуларен карцином
K_i - Инхибиторна константа
K_M - Константа на Михаелис
LCIS - Лобуларен карцином *in situ*
MCF-7 - Клетъчна линия от рак на млечна жлеза при човек – луминален тип A
MCF-10A - Епителни клетки от рак млечната жлеза при човек – тройно негативен
MDA-MB-231 - Клетъчна линия от рак на млечната жлеза
MNU - N-метил-нитрозоуреа
OD - Оптичната плътност
PAI-1 - Плазминоген активиращ инхибитор 1
PBS - Phosphate-buffered saline
PR - Прогестеронов рецептор
PRCC - Papillary renal cell carcinoma
RAS – Ренин-ангиотензинова система
SK-MES-1 – Сквамозен карцином на бял дроб при човек
TGF- β – Трансформиращ растежен фактор β
TNF α - Тумор некрозис фактор α
tRASs - Тъканни ренин-ангиотензинови системи
uPA - Урокиназен плазминогенен активатор
VEGF - Васкуларен ендотелен растежен фактор
V_{max} - Максималната скорост

УВОД

Ракът на гърдата е едно от най-често срещаните онкологични заболявания и е водеща причина за смъртност при жените. Съвременната диагностика се основава на клинична картина, хистопатологични изменения и на наличието или отсъствието на биомаркери, които се идентифицират чрез молекулярно-генетични изследвания. Независимо от това, диагностицирането и прогнозирането са затруднени, което налага не само по-детайлно охарактеризиране на процесите на туморна прогресия, но и подобряване на точността на прогностичните маркери. Епителните клетки на млечната жлеза и ендотелът на кръвоносните съдове експресират компоненти на ренин-ангиотензиновата система, като тази експресия се променя при развитието на онкологични заболявания. Тези компоненти са потенциални биологични маркери за подобряване на диагностиката и прогнозирането на този тип тумори.

Аминопептидазата А (глутамил аминопептидаза, АРА, ЕС 3.4.11.7) е мембранно-свързана металопептидаза от фамилия М1. АРА е важен компонент на локалната RAS в млечната жлеза, който катализира превръщането на AngII в AngIII. Голям брой изследвания са насочени към изясняване ролята на АРА в контрола на кръвното налягане, но по-малко са посветени на участието на ензима в развитието на туморни заболявания. Редица изследвания показват ролята на ензима като потенциален биомаркер при туморни заболявания. Ролята ѝ при туморните заболявания обаче, е сравнително слабо проучена. Известно е, че при някои видове солидни тумори АРА се локализира в инвазивния фронт, където вероятно участва в освобождаването на пространства за растеж на тумора. Призната е и нейната ключова роля при неоваскуларизацията. Така, този ензим може бъде туморен промотор. Независимо от тези данни, ролята на АРА при рак на гърдата е слабо проучена.

Настоящият труд е посветен на изследване ролята на АРА при рака на гърдата с оглед на потенциалното ѝ включване като спомагателен биологичен маркер за определяне на инвазивния потенциал на туморните клетки и за прогностични цели. Изпълнението на тази цел изисква разработване на подобрен „инструментариум“ за изследване на локализацията и активността на ензима, т.е. въвеждане на нови специфични субстрати и инхибитори.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.

Целта на настоящия труд е в експериментални моделни системи да се проучи потенциалната маркерна роля на аминокептидазата А при карцином на млечна жлеза като се използват предимствата на флуоресцентните ензимни анализи.

За изпълнението на тази цел, ние си поставихме следните **ЗАДАЧИ:**

- 1.** На базата на новосинтезирани субстрати да се разработят методи за цито- и хистохимично локализиране на АРА и биохимично определяне на активността на АРА. Да се тестира приложението на новосинтезиран специфичен инхибитор на ензима.
- 2.** Да се проучат локализацията и нивата на активност на АРА в експериментален модел на рак на млечна жлеза при мишка (солидна и асцитна форма на тумор на Ерлих) в сравнение с млечна жлеза при здрава полово зряла мишка.
- 3.** Да се проучат локализацията и нивата на активност на АРА в присъствие на различни активатори на ензима в нормални ембрионални и туморни фибробласти.
- 4.** Да се проучат локализацията и нивата на активност на АРА в присъствие на различни активатори в култивирани човешки клетки от карцином на млечна жлеза с различна степен на инвазивност в сравнение с трайни нормални клетки от млечна жлеза.
- 5.** Да се изследват промените в нормални клетки от млечна жлеза, култивирани в присъствието на специфичен инхибитор на ензима (преживяемост, пролиферативна активност, апоптотичен потенциал).
- 6.** Да се изследват локализацията и нивата на активност на АРА в оперативни биопсии.
- 7.** Резултатите да се интерпретират от гледна точка на различия между нормални и туморни тъкани/клетки и степен на инвазивност на карцинома и да се направят изводи относно маркерната роля на АРА при рак на млечна жлеза.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

II.A. МАТЕРИАЛИ

Съединенията:

- α -(глутамилхидразидо)-N-хексил-1,8-нафталимид (Glu-HHNI) - субстрат за цито- и хистохимично локализиране на АРА;
- α -глутамил-2-акридониламид (Glu-АМАС) - субстрат за биохимично определяне на активността на АРА;
- α -глутамил хидроксамат (GH) – специфичен инхибитор на АРА и
- β -Ala-D-Ala-Pro-pNA – специфичен биохимичен субстрат за определяне на активността на фибробласт активирания протеин α

са синтезирани, пречистени и спектрално охарактеризирани от колектив от МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия с ръководител доц. Ивайло Иванов, доктор и колектив от Факултета по химия и фармация на СУ „Св. Климент Охридски“ с ръководител доц. Донка Ташева, доктор.

Хромогенният биохимичен субстрат на АРА α -глутамил-4-нитроанилид (Glu-pNA) и флуорогенният биохимичен субстрат Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC за каспаза-3 бяха закупени от Bachem (Швейцария).

За целите на молекулярното моделиране беше използвана кристалната структура на човешка аминокиселиназа А в комплекс с глутамат (Protein Data Bank code 4KXD), програмата DS ViewerPro 6.0 (Discovery Studio, Accelrys Software Company) и силово поле на Драйдинг (61) за оптимизация на химичните структури.

За изследванията *in vitro* бяха използвани следните клетъчни линии:

- MCF-10A – спонтанно имортиализирани епителни клетки от човешка млечна жлеза;
- MCF-7 - луминален аденокарцином на млечна жлеза тип А при човек (ER+, PR+, HER2-);
- MDA-MB-231 - тройно негативен карцином на млечна жлеза при човек (ER-, PR-, HER2-);
- BALB/3T3 clone A31 – нормални ембрионални фибробласти от мишка;
- Meth A sarcoma - туморни фибробласти от фибросаркома при мишка.

За изследванията *in vivo* бяха използвани бели лабораторни мишки и клетки от линията ЕАС (тумор на Ерлих).

При култивирането *in vitro* на перманентните клетъчни линии е използвана среда за клетъчно култивиране Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM) (Sigma Aldrich, Germany), фетален телешки серум (FBS) (Gibco, Austria), антибиотици (10,000 U/ml пеницилин, 10 mg/ml стрептомицин, LONZA), трипсин EDTA (Версен 200 mg/l, трипсин 170,000 U/l, LONZA).

При МТТ тест за антипролиферативна активност е използван 3-(4,5-диметилтиазол-2-yl)-2,5-дифенил тетразолиев бромид (Thiazolyl blue, 98%), диметил сулфооксид (DMSO) и етанол 100% (Sigma Aldrich, Германия).

Ядрените багрила акридин оранж, пропидиев йодид и Хъохст 33342 бяха закупени от Sigma Aldrich (Германия).

II.B. МЕТОДИ

II.B.1. Молекулно моделиране.

Моделирането на ензим-субстратния комплекс на АРА с Glu-HHNI, ензим-субстратния комплекс на АРА с Glu-AMAC и ензим-инхибиторния комплекс на GH с АРА беше извършено с използване на човешка аминопептидаза А в комплекс с глутамат (PDB) чрез програмата DS ViewerPro 6.0 и силово поле на Драйдинг (61) за оптимизация на химичните структури.

II.B.2. Определяне на кинетичните параметри на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC

Определянето на максималната скорост ($V_{\max}$) и константата на Михаелис (K_M) на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC при използване на хомогенат от бъбреци на половозряла мишка, бе проведена в 0.1 М какодилатен буфер с рН 7.4, съдържащ 1 mM CaCl_2 при 37°C. Към 40 μl от хомогената бяха добавени 200 μl разтвор на субстрата с различни концентрации (20, 40, 60, 80, 100 и 200 μM), получени след разреждане с буфер на сток разтвора на субстрата в диметилсулфоксид с концентрация 20 mM. Реакцията беше проведена в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence, като хидролизата на субстрата Glu-AMAC бе проследена чрез намаляването на флуоресценцията при 456 nm, с възбуждане при 290 nm и отчитане на всеки 2 минути. Кинетичните константи бяха изчислени на базата на измерените начални скорости по уравнението на Михаелис-Ментен чрез нелинеен регресионен анализ, при използване програмата EnzFitter V2.

II.B.3. Определяне типа на инхибиране на АРА от GH и инхибиторната константа K_i .

Ензимната активност на аминопептидаза А в хомогенат от бъбреци на половозряла мишка, при използване на Glu-pNA като субстрат, в отсъствие или присъствие на GH беше измервана в 0.1 М какодилатен буфер с рН 7.4, съдържащ 1 mM CaCl_2 при 37°C. Към 40 μL от хомогената бяха добавяни 100 μl буфер или разтвор на инхибитора в буфер с различни концентрации (0.04, 0.2, 1.2 и 2.0 mM). Пробите бяха инкубирани 20 минути при 37°C след което бяха добавяни 100 μl разтвор на субстрата с различни концентрации (0.4, 0.8, 1.0 mM). Реакцията беше проследена в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence, при 410 nm и отчитане на всеки 2 минути. Кинетичните константи бяха изчислени на базата на измерените начални скорости при

различни концентрации от инхибитора, по уравнението на Михаелис-Ментен и нелинеен регресионен анализ с използване на програмата EnzFitter V2.

III.B.4. Определяне на максималната скорост и константата на Михаелис на Glu-AMAC в хомогенати от клетъчни линии в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони.

Определянето на максималната скорост и константата на Михаелис на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC при използване на хомогенати от три човешки клетъчни линии (MCF-10A, MCF-7 MDA-MB-231) в присъствие на различни йони на алкалоземни метали в концентрация 1 mM, бе проведена в 0.1 M какодилатен буфер с pH 7.4 при 37°C. Към 120 μl от всеки от хомогенатите бяха добавяни различни аликвоти от буфера съдържащ 2 mM от съответните йони (0, 60, 90, 100 и 110 μl) и различни обеми (120, 60, 30, 20 и 10 μl) от разтвора на субстрата с концентрация 80 μM в буфер, съдържащ 2 mM от съответните йони. Реакцията беше проведена в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence, като хидролизата на субстрата Glu-AMAC бе проследена чрез намаляването на флуоресценцията при 456 nm, с възбуждане при 290 nm и отчитане на всеки 2 минути. Кинетичните константи (константата на Михаелис K_M , максималната скорост $V_{\max}$ и константата на ефективност $V_{\max}/K_M$) бяха изчислени на базата на измерените начални скорости по уравнението на Михаелис-Ментен чрез нелинеен регресионен анализ и използване на програма EnzFitter V2.

III.B.5. Определяне скоростта на ензимна хидролиза на Glu-pNA в хомогенати от клетъчни линии в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони.

Към 400 μl от всеки от хомогенатите бяха добавяни разтвори на CaCl_2 , $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ или $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 0.1 M какодилатен буфер с pH 7.4, така че крайната концентрация на Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+} да бъде 1 mM. Съдържанието на белтък в пробите беше определено чрез измерване на абсорбцията при 260 and 280 nm на спектрофотометър Spekol 1500 (Analytik, Jena) и изчисления по Dawson et al. (1991). След това, към пробите беше добавен разтвор на субстрата Glu-pNA в същия буфер до крайна концентрация 0.5 mM. Инкубацията беше провеждана при 37°C, като на всеки 30 минути се отбираше аликвота от 150 μl , в която реакцията беше стопирана с 20 mM разтвор на EDTA. Абсорбцията на пробите беше измерена спектрофотометрично при 405 nm срещу контрола, в която реакцията беше стопирана непосредствено след добавянето на субстрата. Резултатите бяха обработени статистически с регресионен анализ и построяване на криви, показващи зависимостта на абсорбцията при 405 nm от времето с помощта на програмата Sigma Plot 9.0. В случаите на нелинейна корелация, ензимната активност беше определяна от началната скорост на реакцията. За единица ензимна активност беше прието количеството ензим, което отделя 1 nmol продукт (pNA) за минута на 1 mg белтък при 37°C.

III.B.6. Експерименти *in vivo* върху модел на карцином на млечна жлеза при мишки – асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих.

Туморната клетъчна линия ЕАС беше поддържана *in vivo* в мишки албино (на възраст 5 до 7 седмици, тегло 25-30 грама) чрез ежеседмични пасажии (интраперитонеално инокулиране на 1×10^6 живи клетки, суспендирани в 0.2 мл PBS).

За експериментите бяха използвани женски мишки на същата възраст, най-малко 10 дни след лактация. Мишките бяха инокулирани за отделните опити интраперитонеално или подкожно в областта на абдоминалните и торакалните млечни жлези с клетъчна суспензия (1×10^6 живи клетки, суспендирани в 0.2 мл PBS).

Като контроли бяха използвани животни, инжектирани само с PBS.

Мишките бяха убивани чрез цервикална дислокация 7 дни след инокулацията. Клетките от коремната кухина (асцитна форма на тумор на Ерлих) бяха събирани с помощта на спринцовка, заедно с асцитната течност, и от тях бяха приготвени натривки върху желатинирани предметни стъкла.

Туморните образувания в областта на абдоминалните и торакалните млечни жлези (солидна форма на тумор на Ерлих), както и абдоминални и торакални млечни жлези от контролните животни бяха отделени и замразени в течен азот. От тях бяха нарязани криостатни срези с дебелина 10 μm на криотом Reichert-Jung (Германия) при -26°C , които бяха монтирани на желатинирани предметни стъкла.

Всички препарати бяха изсушени на въздуха и фиксирани на параформалдехидни пари за 4 минути на стайна температура. Част от тях бяха оцветени с хематоксилин-еозин по класическия хистологичен метод. Останалите препарати бяха покрити с 0.5% колодион в амил ацетат (Sigma-Aldrich), разреден до нужната концентрация със смесен разтворител ацетон : диетилов етер : абсолютен етанол (4:3:3) посредством потапяне за 1 минута на стайна температура. Тези препарати бяха използвани за хистохимично визуализиране на АРА.

II.B.7. Ензимна хистохимия.

За локализиране на АРА в криостатни срези, обработени както е описано по-горе, те бяха инкубирани в разтвор на 1 mM субстрат ($\alpha\text{-Glu-NHNI}$) и 1 mg/ml пиперонал в 0.1 M какодилатен буфер с pH 7.4, съдържащ 1 mM CaCl_2 в продължение на 2 часа на 37°C . След това, срезите бяха промивани с вода и пост-фиксирани в 4% формалин за 15 минути на стайна температура. Те бяха допълнително оцветени с хематоксилин и включени в глицерол/желатина 1:1 (Lojda et al., 1979). Ензимната реакция беше наблюдавана под светлинен микроскоп или флуоресцентен микроскоп Leica DM 5000 B, при използване на филтърна комбинация Y3 (BP 545/30, BP 610/75).

II.B.8. Ензимна цитохимия.

Клетки, култивирани на покривни стъкла бяха промити с PBS, изсушени на въздух и фиксирани на параформалдехидни пари за 5 минути на стайна температура. След изсушаване на вентилатор, те бяха покривани с 0,5% колодион за 30 секунди на стайна

температура. Инкубацията се провеждаше в разтвор, съдържащ 0,5 mM субстрат (Glu-HHNI) и 0.5 mg/ml пиперонал в 0.1 M какодилатен буфер с pH 7.4, съдържащ 1 mM CaCl_2 , $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ или $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Инкубацията се извършваше за 3.5 часа на 37°C. След инкубацията, препаратите бяха промивани с вода и пост-фиксираны в 4% формалин за 15 минути на стайна температура. За оцветяване на ядрата беше използван 5-6 капки алкохолен разтвор на Hoechst 33342 (Sigma) с концентрация 1 mg/ml, разреден с дест. вода до 10 ml. След 30 минути на престояване в разтвора на ядреното багрило на тъмно на ст. температура, клетките бяха включвани върху предметни стъкла в глицерол/желатина 1:1. Ензимната реакция беше проучвана под флуоресцентен микроскоп Leica DM 5000 B, при използване на филтърна комбинация D (BP 355-425, LP 470) за наблюдаване на флуоресценцията в ядрата и Y3 (BP 545/30, BP 610/75) за ензимната реакция.

По същия начин бяха обработени и натривки на предметно стъкло от суспензионни култури от клетъчна линия Meth A sarcoma, както и натривки от клетки от перитонеума на мишки с асцитна форма на тумор на Ерлих. Натривките бяха оцветявани и с хематоксилин и еозин по стандартна хистологична процедура за изследване морфологията на клетките.

II.B.9. Получаване на клетъчни хомогенати и хомогенати от солидна форма на тумор на Ерлих.

Култивираните клетки бяха промивани няколко пъти с какодилатен буфер с pH 7.4. След това, те бяха събирани с помощта на стъклена пръчка с гумен крайник и хомогенизирани за 15 минути в 5 ml какодилатен буфер, pH 7.4 на хомогенизатор AMPS (Англия). Хомогенатът беше центрофугиран на 4°C и 3000 об./мин за 20 минути, след което супернатантата беше използвана за различни анализи.

Аспирираните клетки от асцитна форма на тумор на Ерлих бяха промити 2 пъти с PBS, като след всяко промиване бяха центрофугирани на 1500 об./мин за 10 минути и супернатантата беше отстранявана. След това, хомогенизацията се провеждаше както по-горе.

Подкожните туморни образувания от солидната форма на тумор на Ерлих бяха обработвани с ръчен хомогенизатор в същия буфер, след което бяха хомогенизирани и третираны както клетките. По същия начин бяха подготвяни и хомогенати от бъбреци на здрави полово зрели мишки, използвани при биохимичните експерименти за определяне на IC_{50} и K_i на специфичния инхибитор на APA GH и кинетичните параметри на субстрата Glu-AMAC.

II.B.10. Клетъчно култивиране.

Перманентните клетъчни линии бяха култивирани в среда DMEM (4,5 g/l глюкоза), 10% фетален телешки серум, 100 U/ml пеницилин и 0.1 mg/ml стрептомицин в пластмасови съдове за клетъчно култивиране с площ 25 cm² и 75 cm². При култивирането на MCF-7 и MCF-10A към културалната среда бяха добавени съответните растежни фактори съгласно указанията на клетъчната банка (ATCC). Туморните фибробласти от линията Meth A sarcoma се култивират в суспензия и при всяка смяна на средата се налага

центрофугиране. Клетките бяха поддържани в логаритмична фаза на растеж при 37°C и атмосфера с 5% съдържание на CO₂. За провеждане на опити *in vitro*, клетките в експоненциална фаза на растеж, след трипсинизация, бяха доведени до необходимата концентрация и бяха посяти в 96-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) за клетъчно култивиране (1×10³ клетки / ямка). След 24 часа култивиране при описаните условия, клетките бяха третираны съгласно опитната постановка.

За целите на ензимната цитохимия клетките бяха култивирани върху покривни стъкла. От суспендираните в PBS клетки от линията Meth A sarcoma се подготвяха натривки върху покривни стъкла.

II.B.11. Определяне на клетъчна жизненост.

За определяне на клетъчната жизненост беше използван метода на изключване с Trypan blue. Методът се основава на факта, че живите клетки с интактна мембрана не пропускат синьото багрило и остават неочветени, докато мъртвите клетки поемат багрило и се оцветяват в синьо (88).

II.B.12. Метод за определяне на клетъчна пролиферация.

Ефектът на изследваните вещества (оксалиплатина, инхибитор и комбинацията между тях) върху пролиферативната активност на изследваните клетъчни линии беше измерена с помощта на MTT тест, по метода на Mossmann (1983).

Процентът на клетъчна пролиферация (преживяемост) беше изчислен, по следната формула:

$$\text{Клетъчна преживяемост (\%)} = \text{OD}_{570} (\text{проба}) / \text{OD}_{570} (\text{негативна контрола}) \times 100,$$

където OD е оптичната плътност (екстинкцията) съответно на пробата и контролата при 570 nm.

II.B.13. Определяне въздействието на инхибитора GH, оксалиплатина и комбинация от инхибитор и оксалиплатина върху пролиферативната активност на клетки.

За оценка ефекта на инхибитора на APA GH, клетки от трите човешки линии (MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231) бяха култивирани, както е описано по-горе за 24 часа, след което средата беше заменена с нова, съдържаща от 10 до 0.02 mg/ml инхибитор, получена чрез последователни двукратни разреждания. След 72 часа инкубация, средата беше отлята, добавена беше свежа среда, съдържаща 10% FBS и ефектът на GH беше отчетен чрез MTT-тест.

За оценка на ефекта на стандартния цитостатик оксалиплатина, към културалната среда на клетките от линията MCF-10A беше добавян цитостатик чрез двукратно падащи разреждания (от 10 mg/ml до 0.075 mg/ml). Инкубацията продължаваше 72 ч на 37°C. След това, хранителната среда, съдържаща цитостатик, беше аспирирана и се добавяше свежа

среда, съдържаща 10% FBS. Следваше отчитане на антипролиферативния ефект, чрез МТТ–теста.

За оценка на комбинирания ефект на инхибитора GH и оксалиплатината, клетки от линията MCF-10A бяха подложени на действието на GH в концентрация 0.25 mg/ml в продължение на 2 часа, след което беше добавена оксалиплатина в концентрация 2 μ M. След 72 часа инкубация, клетките бяха третираны както по-горе.

Резултатите са средни стойности от три независими експеримента. Определена е концентрацията на полу-инхибиране (IC_{50}) или съответно концентрацията, при която се наблюдава 50% активиране (EC_{50}) на клетките, чрез нелинеен регресионен анализ (софтуер OriginPro8). При сравняване на получените стойности, доверителния интервал беше определян чрез one-way ANOVA – Bonferroni's post hoc test (софтуер GraphPad Prism5).

II.B.14. Получаване на препарати, оцветени с акридин оранж / пропидиев йодид.

Клетки от трите човешки клетъчни линии бяха култивирани върху покривни стъкла. Прилагането на различни инкубационни среди съответства напълно на това в точка III.B.13. Бяха приготвени 1 mM сток-разтвори на АО и PI в PBS, които бяха смесвани в съотношение 1:1 непосредствено преди оцветяването. Смесеният разтвор беше накапван върху препаратите. След 1-2 минути той беше отливан, препаратите бяха промивани с дест. вода и включвани в глицерол/желатина 1:1. Препаратите бяха проучени под флуоресцентен микроскоп Leica DM 5000 B, при използване на филтърна комбинация I3 (BP 450-490, LP 515).

II.B.15. Определяне на ензимната активност на фибробласт активиращ протеин α (FAP) в хомогенати от клетъчната линия MCF-10A.

Ензимната активност в клетъчните хомогенати от линията MCF-10A (нетретираны клетки, клетки, третирани само с оксалиплатина и клетки, последователно третирани с инхибитор на АРА и оксалиплатина) беше измервана в 0.1 М фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 М NaCl и 1 mM EDTA при използване на селективния за FAP хромогенен субстрат β -Ala-D-Ala-Pro-pNA с концентрация 1 mM при 37°C. Към 140 μ l от всеки от хомогенатите бяха добавени 60 μ l от разтвора на субстрата. Ензимните реакции бяха проведени в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscан Fluorescence при 410 nm и отчитане на всеки 4 минути за два часа. Ензимната активност беше определена от началните скорости на реакциите. За обработка на данни беше използвана софтуерната програма EnzFitter V2.

II.B.16. Определяне на нивото на апоптоза чрез активността на каспаза-3.

Ензимната активност в клетъчните хомогенати от линията MCF-10A (нетретираны клетки, клетки, третирани само с оксалиплатина и клетки, последователно третирани с инхибитор на АРА и оксалиплатина) беше измервана в каспазен буфер (20 mM HEPES с

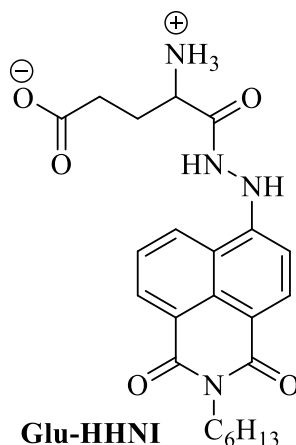
pH 7.4, съдържащ 2 mM EDTA, 0.1% CHAPS и 5 mM дитиотреитол) при използване на флуорогенния субстрат Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC при 37°C. Работния разтвор на субстрата беше приготвен като 7 µl от изходния разтвор на субстрата с концентрация 4 mM в диметилсулфоксид бяха добавени към 700 µl буфер. От него бяха взети 60 µl и добавени към 60 µl от всеки от хомогенатите. Ензимните реакции бяха проведени в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence при 360 nm възбуждане и 460 nm емисия и отчитане на всеки 4 минути за 1.5 часа. Ензимната активност беше определена от началните скорости на реакциите. За обработка на данни беше използвана софтуерната програма EnzFitter V2.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

III.1. Флуорогенен субстрат за цито- и хистохимично локализиране на ARA Glu-HHNI.

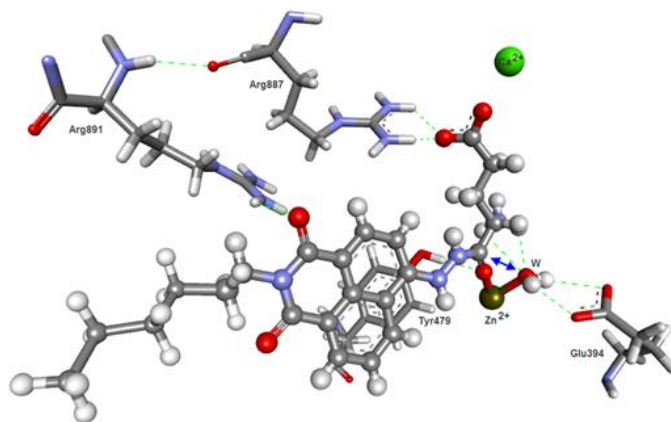
Проучванията върху участието на ARA в механизмите на туморогенезата и туморната прогресия изисква прилагане на високо специфични и чувствителни методи за визуализация на ензима *in situ* (в препарати от култивирани клетки, оперативни биопсии и експериментални модели на туморни заболявания). Досега не е разработен флуорогенен хистохимичен субстрат за ARA, което е несъмнен недостатък по отношение изследването на ARA при патологични процеси, защото флуоресцентната визуализация дава по-добри възможности: 1/ по-висока чувствителност, което позволява визуализиране на области с ниска ензимна активност; 2/ възможност за използване на конфокална микроскопия; 3/ възможност за прилагане на съвременен софтуер за количествена оценка в зависимост от силата на флуоресцентния сигнал; 4/ възможност за доказване на ко-локализация с други молекули чрез различни по цвят флуорохроми.

За изследване на ензимната активност на ARA досега са използвани синтетични субстрати, които са амиди на глутамовата киселина с 4-нитроанилин, 2-нафтиламин и 7-амино-4-метилкумарин. Новосинтезираният хистохимичен субстрат за ARA Glu-HHNI, има различна структура на напускащата група и е хидразид на глутамовата киселина. Нафталимидният остатък, включващ и хексилната верига, е значително по-обемист от напускащите групи на използваните досега изкуствени субстрати (Фиг. 1).



Фигура 1. Структура на субстрата за цито- и хистохимично локализиране на APA Glu-HHNI.

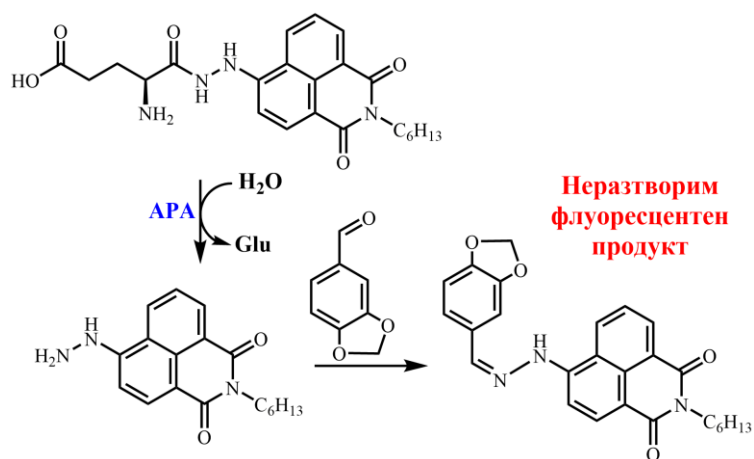
Това е причината предварително да моделираме ензим-субстратния комплекс, като използваме кристалната структура на човешка аминокептидаза А в комплекс с глутамат (Protein Data Bank code 4KXD) с помощта на програмата DS ViewerPro 6.0 и силово поле на Драйддинг (61) за оптимизация (Фиг. 2).



Фигура 2. Молекулен модел на свързване на субстрата Glu-HHNI в активния център на човешка аминокептидаза А. Аминокиселинните остатъци от активния център на ензима са представени чрез пръчков модел, а субстратът – с пръчки и точки.

Молекулният модел на комплекса показва, че γ -карбоксилатният остатък на Glu комплексообразува с Ca^{2+} и формира водородна връзка с гуанидино групата на Arg887. От друга страна, протонираната α -аминогрупа на глутамовата киселина от субстрата образува водородни връзки с Glu223, Glu360 и Glu416 (не е показано тук). Водната молекула в координационната сфера на Zn^{2+} , която изпълнява ролята на нуклеофил, образува водородни връзки с Glu394 и е на разстояние 2.9 Å от карбонилния въглероден атом на субстрата, благоприятно разположена за нуклеофилна атака. Нафталимидният остатък и хексилната верига са разположени в големия по обем и приличащ на пещера подцентър, свързващ напускащата група. Един от карбонилните кислородни атоми от нафталимида формира водородна връзка с Arg891. От този модел се вижда, че са налице всички условия Glu-HHNI да бъде добър субстрат за аминокептидаза А.

На фигура 3 е показан принципа на действие на новосинтезирания флуорогенен хистохимичен субстрат Glu-HHNI. Ензимът хидролизира хидразидната връзка при α -карбоксилната група на субстрата, при което се отделя N-хексил-нафталимид. Той взаимодейства бързо с присъстващ в средата ароматен алдехид – пиперонал. При това се получава неразтворим флуоресцентен продукт – хидразон, който се отлага на местата с ензимна активност и ги маркира с ярка оранжево-червена до червена флуоресценция при облъчване със зелена светлина (с дължина на вълната 520-580 nm). Получените препарати могат да се наблюдават и на светлинен микроскоп, където крайният продукт на реакцията е жълто-оранжев до червен на цвят в зависимост от неговото количество.

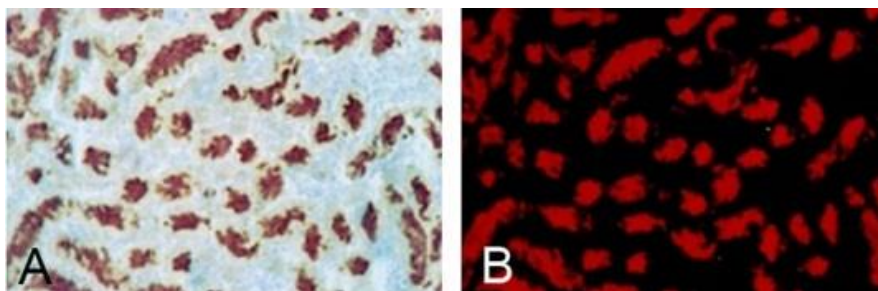


Фигура 3. Принцип на хистохимично действие на субстрата Glu-HHNI.

Този субстрат беше тестиран за приложение в криостатни срези и препарати от култивирани клетки за локализиране на активността на APA.

Бяха тествирани различни начини за предварителна обработка на тъканите като фиксация или директно замразяване в течен азот, покриване на препаратите с различни концентрации разтвор на колодион за предотвратяване на делокализацията на крайния реакционен продукт (т. е. на хидразона). Също така, бяха тествирани различни видове буферни разтвори с pH 7.4, което е оптимално за ензима, различни концентрации на субстрата и спомагателния реактив (алдехида пиперонал) и на активиращите калциеви йони, както и времето на инкубация. Така бяха подбрани най-подходящите условия за провеждане на хистохимичната локализация на APA, които са дадени в точка II.B.7.

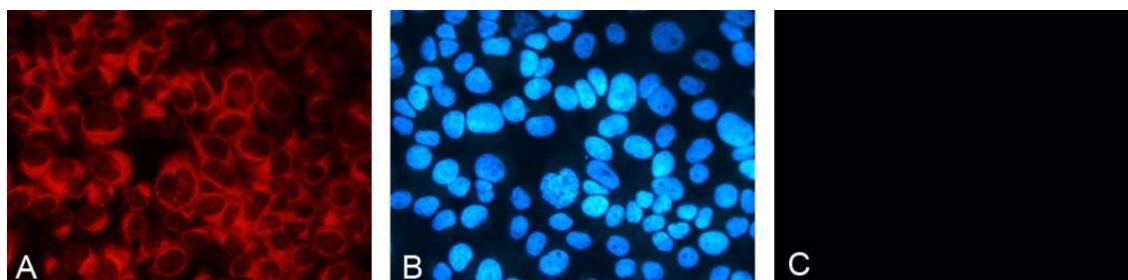
На Фигура 4 е показан резултат за хистохимично доказване на APA със субстрата Glu-HHNI в бъбрек на лабораторни мишки, който съответства на локализацията, получена със стандартните хромогенни субстрати на базата на 1- и 2-нафтиламин (56).



Фигура 4. Активност на APA в епитела на извитите каналчета на бъбречна кора от мишка със субстрат Glu-HHNI. А-светлинна микроскопия, В-флуоресцентна микроскопия. X200

По описания по-горе начин беше проведена и оптимизация на условията за цитохимично визуализиране на APA в препарати от култивирани клетки, които са дадени в точка II.B.8. Резултати за локализацията на ензима в препарати от клетки от линията

SK-MES-1 (сквамозен карцином на бял дроб при човек), култивирани върху предметни стъкла са показани на Фигура 5. При предварително инкубиране на препаратите с 0.1 mM от специфичния инхибитор на АРА GH за 45 минути на стайна температура, реакцията на ензимна хидролиза беше напълно потисната (Фиг. 5С).



Фигура 5. Визуализация на активността на АРА в клетки от линията SK-MES-1 (сквамозен карцином на бял дроб при човек). А-флуоресцентна ензимна реакция; В-оцветяване на ядрата на клетките с Hoechst 33342; С – отсъствие на ензимна реакция при предварително инкубиране с инхибитора на АРА GH. X400

Субстратът Glu-HHNI е първият флуорогенен субстрат, използван за визуализация на ензимната активност на АРА. Хидразонът е цветен и флуоресциращ продукт, което дава възможност визуализацията на ензимната активност да става и чрез светлинна и чрез флуоресцентна микроскопия. Той е стабилно вещество, много малко разтворимо във водна среда и формира микрокристални отлагания, което е причина за получените ясни и трайни изображения. Друго съществено достоинство на този метод е, че хидразонът флуоресцира в червената област на видимия спектър, където не се наблюдава автофлуоресценцията на тъканите.

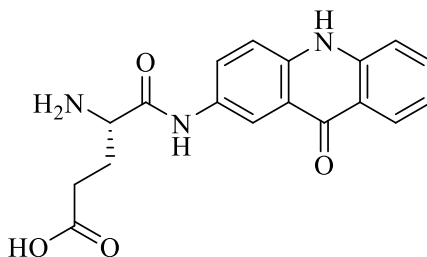
III.2. Флуоресцентен субстрат за биохимично изследване на АРА Glu-AMAC.

За целите на настоящия труд беше синтезиран и флуоресцентен биохимичен субстрат α -глутамил-2-акридониламид (Glu-AMAC).

Хромогенните и флуорогенните субстрати се използват широко за биомедицински изследвания. Причини за това са тяхната достъпност, високата чувствителност на методите с тяхно участие и лесен инструментален контрол. Използването на специфични синтетични субстрати дава възможност ефективно да се изучават редица биохимични процеси. Те са приложими и при диагностиката на различни заболявания. Хромогенните и флуорогенните субстрати включват съответно хромофор или флуорофор, които се освобождават в резултат на ензимната реакция и генерират сигнал, използван за измерване на ензимната активност. Стандартни търговски субстрати за определяне на активността на АРА са хромогенния Glu-pNA (pNA - пара-нитроанилин) и флуорогенния Glu-AMC (AMC - 7-амино-4-метилкумарин).

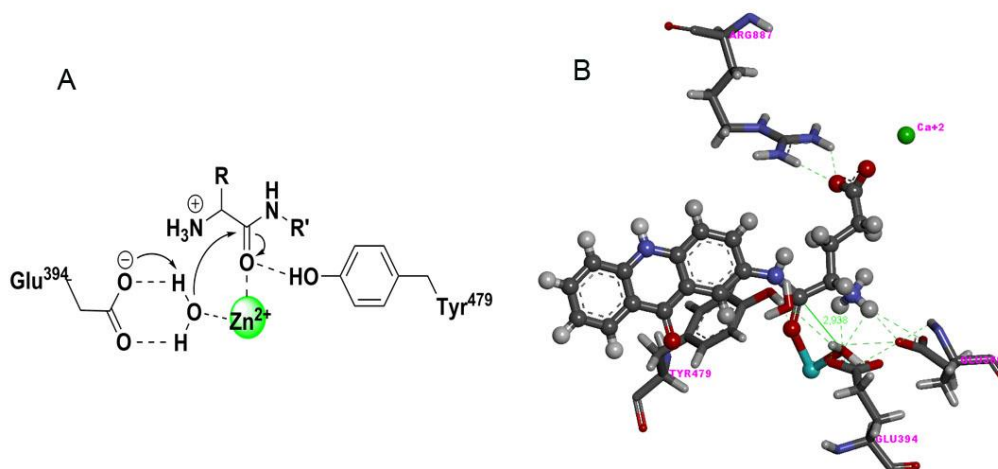
Ацилираните производни на 2-аминоакридоната имат интензивна флуоресценция. При протичане на ензимна реакция се хидролизира връзката между ацилния остатък и 2-аминоакридоната, което води до намаляване интензивността на флуоресценцията. Това дава възможност за реализирането на подход за измерване на ензимната активност, базиран на понижаването на флуоресценцията в резултат на изчерпването на субстрата (58, 77).

Химичната структура на флуоресцентния субстрат за АРА α -L-глутамил N-(2-акридонил)амид (Glu-AMAC) е представена на фигура 6.



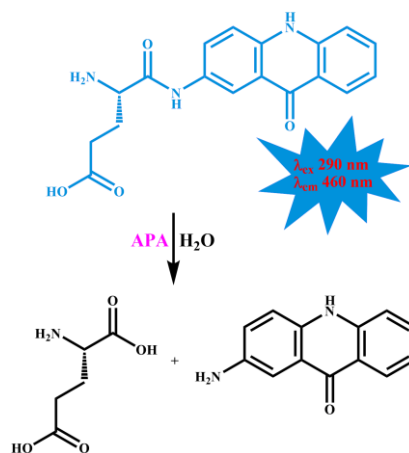
Фигура 6. Химическа структура на флуоресцентен субстрат за АРА Glu-AMAC.

На фигура 7 е показан начина на свързване на този субстрат в активния център на АРА. Вижда се, че карбонилната група на субстрата влиза в координационната сфера на каталитичния цинк заедно с една молекула вода, свързана с Glu394. Същевременно, субстратът образува водородна връзка с хидроксилната група на Tyr479, което спомага за правилното му ориентиране в активния център на ензима.



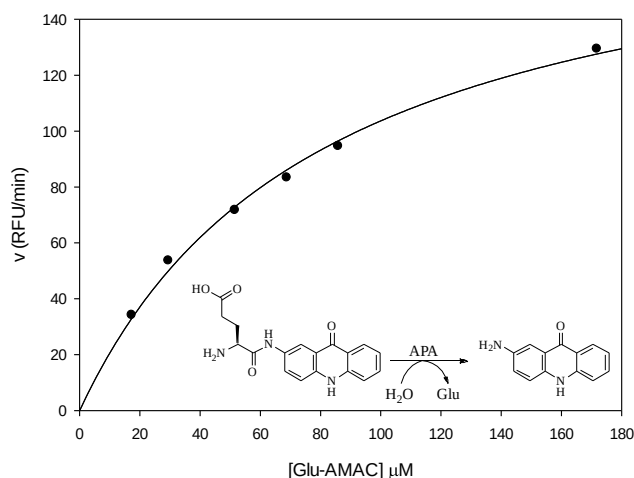
Фигура 7. Принцип на свързване на Glu-AMAC в активния център на АРА. А – кислородът от водната молекула, координирана от Glu394 и Zn^{2+} осъществява нуклеофилната атака при карбонилния кислород на субстрата. За правилната ориентация на субстрата спомага и Tyr479. В - същите структури, визуализирани в молекулния модел.

На фигура 8 е показан принципа на действие на бихомичния субстрат Glu-AMAC. Разтворите на този субстрат флуоресцират ярко в синята област. При ензимната хидролиза се отделя 2-аминоакридон, който има значително по-слаба флуоресценция от субстрата и тя е в друга област на видимия спектър. Така, по намаляването на флуоресценцията на разтвора може да се определи степента на ензимна хидролиза и оттам – активността на ензима.



Фигура 8. Принцип на действие на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC.

Кинетичните константи на Glu-AMAC бяха определени в хомогенат от бъбрек на мишка. Реакцията бе проведена в 0.1 М какодилатен буфер с pH 7.4, съдържащ 1 mM CaCl₂. Хидролизата на субстрата във времето бе проследена спектрофлуориметрично по намаляването на флуоресценцията ($\lambda_{em} = 456$ nm, $\lambda_{ex} = 290$ nm). Кинетичните константи са изчислени на базата на измерените начални скорости на ензимната реакция при различни концентрации на субстрата. Построена бе зависимостта на началните скорости от концентрацията на субстрата (Фиг. 9). От получената зависимост бяха определени стойностите на V_{max} и K_m на база уравнението на Михаелис и Ментен чрез нелинеен регресионен анализ. Всички кинетични изчисления са осъществени на база трикратни измервания, като скоростите, съответстващи на всяка субстратна концентрация, също са определени посредством трикратни повторения. Изчислените кинетичните константи на реакцията на хидролиза на Glu-AMAC катализирана от APA са: $K_m = 0.1 \pm 0.01$ mM и $V_{max} = 14.9 \pm 0.7$ nmol/min/mg.



Фигура 9. Зависимост на началните скорости на реакцията на хидролиза на Glu-AMAC катализирана от APA, като функция на концентрацията на субстрата.

Този метод е много по-чувствителен от хромогенните биохимични методи и има редица предимства пред флуорогенните по следните причини:

- Glu-AMAC е химически по-стабилен от известните флуорогенни субстрати;
- гасенето на флуоресценцията от тъканни компоненти се отчита още в началото на измерването и така резултатите не се влияят от природни гасители на флуоресценцията;
- Glu-AMAC има по-високо сродство към ензима от другите субстрати, което се вижда от константата на Михаелис в таблица 1;
- Glu-AMAC има висок квантов добив, което позволява да се измерват и ниски активности на АРА.

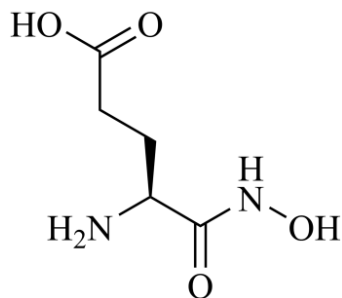
Субстрат	K_m [M]
Glu-pNA	$9 \cdot 10^{-4}$
Glu-MCA	$5 \cdot 10^{-4}$
Glu-AMAC	$2 \cdot 10^{-5}$

Таблица 1. Сравнение между константите на Михаелис на хромогенния субстрат Glu-pNA, флуорогенния субстрат α -глутамил-метилкумариламид (Glu-MCA) и новия флуоресцентен субстрат Glu-AMAC.

III.3. Специфичен инхибитор за АРА

Специфичните инхибитори на АРА са интересни не само от биохимична гледна точка, но те са потенциални антихипертензивни средства (11, 12) и потенциални антитуморни агенти за потискане на васкуларизацията при солидни тумори (59). Предложени са ефективни специфични инхибитори за ензима, представляващи аминотиоли, най-известен от които е ЕЗЗ (11, 12). Многоетапните синтези на тези съединения и високата им цена, ограничават широкото им използване. От друга страна, за изследването на маркерната роля на АРА при различни заболявания е необходим и специфичен инхибитор. Това определя интереса към търсенето на нови ефективни и специфични инхибитори за АРА.

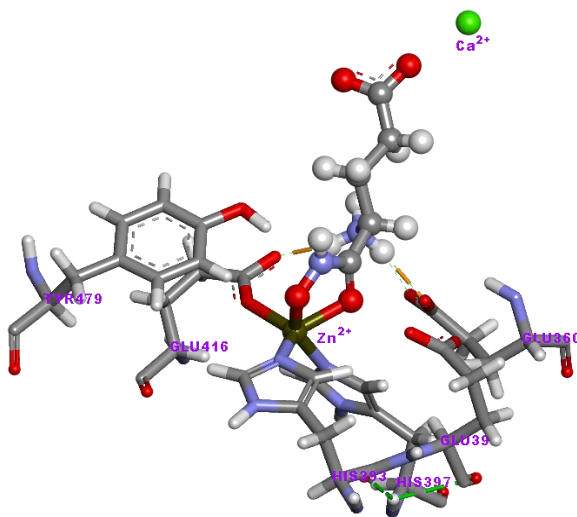
Ние се насочихме към друг тип съединения - N-хидроксиамидите (хидроксамови киселини). Справката показва, че до този момент не е предложен инхибитор за АРА от групата на хидроксаматите, въпреки, че те са известни инхибитори на металопротеинази. Съгласно специфичността на ензима, такъв потенциален инхибитор е α -L-глутамил-N-хидроксиамид (GH; Фиг. 10).



Glu-NHOH

Фигура 10. Химична структура на α -глутамил хидроксамат (GH).

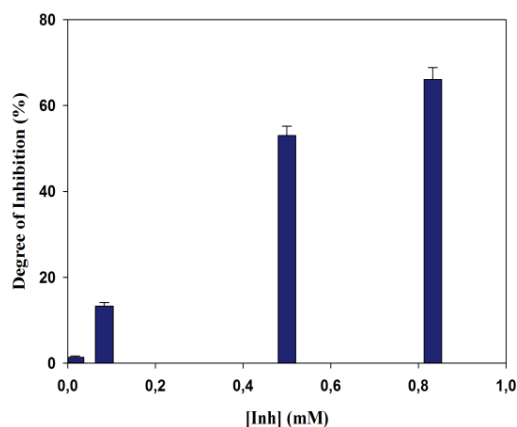
Ние моделирахме ензим-инхибиторния комплекс, като използвахме кристалната структура на човешка аминокиселиназа А в комплекс с глутамат и съответните програми. Молекулният модел на комплекса, представен на Фигура 11, показва предполагаемия начин на свързване на GH като конкурентен инхибитор. Свързването на инхибитора с каталитичния Zn^{2+} , става чрез карбонилния кислороден атом и кислородния атом от хидроксаматния остатък. Така, инхибиторът се проявява като бидентатен лиганд в координационната сфера на каталитичния цинков йон, което е причина за относително високата стабилност на този комплекс. Свързването на инхибитора е съпроводено с отделяне на молекула вода от координационната сфера на Zn^{2+} , която има каталитична функция. Това води до блокиране на S_1 -подцентъра на ензима и ефективно инхибиране. По отношение на неконкурентния тип инхибиране, нашето предположение е, че GH може да се свързва в S'_1 -подцентъра на ензима, формирайки водородни връзки с Arg386 и Arg891.



Фигура 11. Модел на свързване на GH в активния център на АРА.

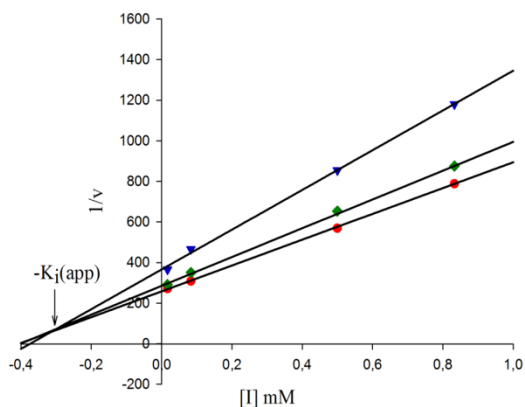
Беше определена константата на полу-инхибиране IC_{50} за GH на АРА в бъбречен хомогенат от мишка (Фиг. 12). От фигурата се вижда, че степента на инхибиране е концентрационно зависима, т.е. с повишаване на концентрацията на инхибитора се

повишава степента на потискане на ензима. От тази графика беше определена IC_{50} , която е 0,4 mM.



Фигура 12. Зависимост на степента на инхибиране на АРА от концентрацията на ГН.

Инхибиторната константа K_i на ГН беше определена чрез построяване графиката на Диксън, която показва зависимостта на скоростта на ензимно-катализираната реакция от концентрацията на субстрата при различни концентрации на инхибитора (Фиг. 13), и тя е 0.3 mM. От фигурата се вижда, че правите не се пресичат върху осите на координатната система, което означава, че типът на инхибиране на АРА от ГН е смесен конкурентен – неконкурентен.



Фигура 13. Графика на Диксън за ГН в хомогенат от бъбрек на мишка.

Специфичността на субстратите Glu-HHNI и Glu-AMAC и на инхибитора ГН се доказва от наличието в молекулите на остатък от α -глутамова киселина, към който АРА е специфичен, както и от молекулните модели, които показват взаимодействията на тези съединения с аминокиселинните остатъци в активния център на ензима и правилното разположение на подлежащата на хидролиза връзка спрямо каталитичния цинк. Също така, опитите показаха, че ензимната хидролиза е зависима от присъствието на калциеви

йони, което е характерно за АРА по отношение на кисели субстрати и инхибитори (20, 21, 31).

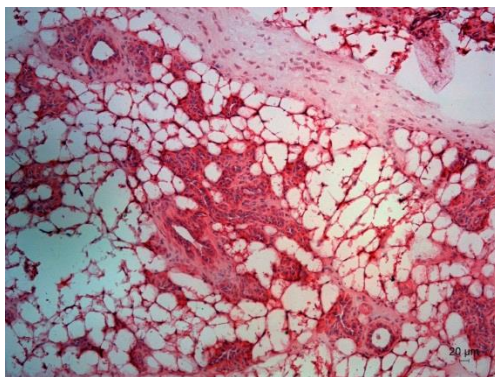
Поради изброените предимства, новосинтезираните субстрати и инхибитор бяха използвани при нашите експериментите за изследване на маркерната роля на АРА при рак на млечна жлеза.

III.4. Експерименти *in vivo* върху модел на карцином на млечна жлеза при мишки – асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих.

Данните показват, че N-метил-нитрозоуреа-индуцираният тумор на гърдата при плъхове не е подходящ модел за изследване ролята на АРА при карцином на млечна жлеза поради междувидовите различия във функционирането на локалната tRAS (18). Затова, ние потърсихме друг модел на рак на гърдата при друг животински вид.

Карциномът на Ерлих е един от често използваните животински модели на рак на гърдата, тъй като наподобява най-бързо растящите недиференцирани, но податливи на химиотерапия тумори при човека (74). Той е получен от спонтанно възникнал аденокарцином на млечна жлеза при мишка и се поддържа *in vivo* чрез интраперитонеални пасажии. Солидната форма се получава чрез подкожно инжектиране на туморни клетки в областта на млечните жлези. Моделът се използва за проучване на алтернативни подходи в терапията на рака, както и за оценка на терапевтичния потенциал на природни екстракти и синтетични съединения (49).

В нашите експерименти бяха използвани полови зрели бели мишки най-малко 10 дни след отбиване, когато млечната жлеза е involуирала практически напълно след лактацията (Фиг. 14). На фигурата се вижда възстановената структура на каналчетата на жлезата.



Фигура 14. *Криостатен срез от млечна жлеза на мишка, 10 дни след лактация. Оцветяване с H&E. X200*

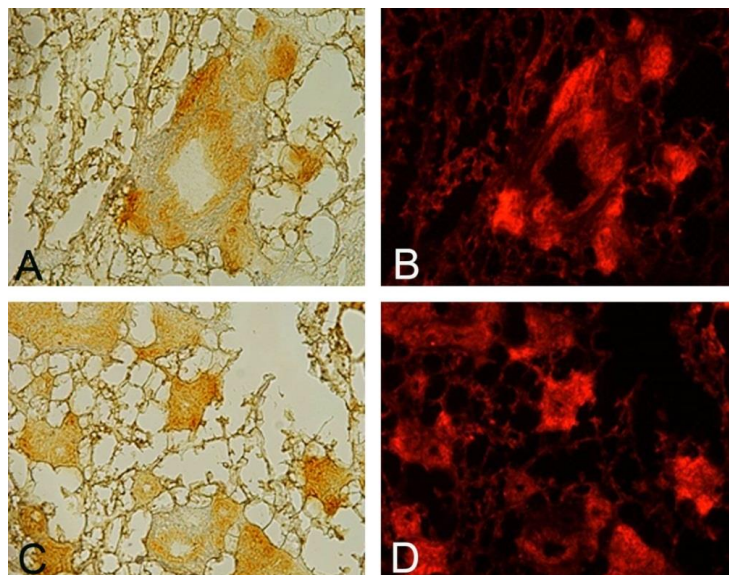
Както беше описано по-горе, бяха получени асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих. Активността на АРА беше изследвана с използване на флуорогенния субстрат Glu-NNI в криостатни срези от солидните тумори и в натривки от клетъчен аспират от

перитонеална кухина (асцитна форма на тумора на Ерлих) в сравнение с тази при млечна жлеза на мишки, третирани само с разтворител (PBS).

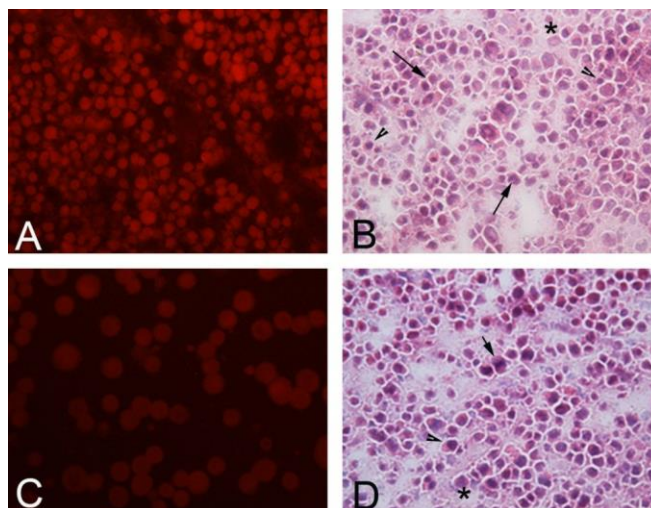
Наблюдавана беше висока активност на АРА в секреторния епител на млечните жлези на здравите мишки (Фиг. 15).

В солидната форма на тумор на Ерлих морфологично се наблюдават клетки в различни фази на митоза, пикнотични ядра и клетки с вакуолизирана цитоплазма (Фиг. 16А). От флуоресцентната фотография се вижда ниска активност на АРА (Фиг. 16В).

Асцитните клетки, оцветени с хематоксилин-еозин, показват същите морфологични изменения, както при солидната форма на тумора (Фиг. 16С). Активността на АРА се визуализира близко до фоновата, т.е. тя е практически нулева (Фиг. 16D).



Фигура 15. Активност на АРА в млечна жлеза на здрава мишка. А, С – светлинна микроскопия. В, D – флуоресцентна микроскопия. X200



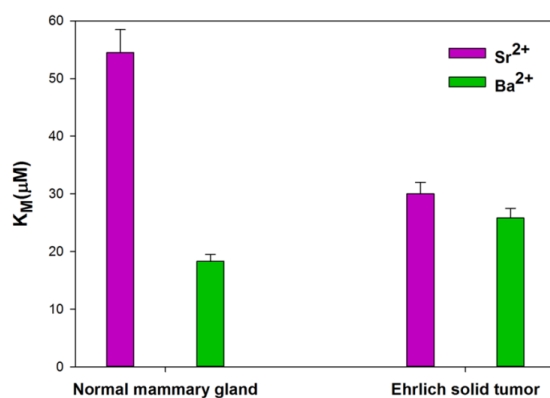
Фиг.16. Визуализиране на АРА (А, С) в солидна (А) и асцитна (С) форма на тумор на Ерлих при мишки. Дясно – оцветяване с Н&Е на клетки от солидна (В) и асцитна (D) форма на тумора. При оцветяването с Н&Е се наблюдават митотични фигури (стрелки), пикнотични ядра (глави на стрелки) и клетки с вакуолизирана цитоплазма (звезди). X400

И двете форми на тумора на Ерлих са получени от една и съща клетъчна линия - ЕАС, култивирана *in vivo*. Клетките в асцитната форма обаче, се размножават по-бързо, поради лесния достъп до хранителни вещества и по-голямото свободно пространство за нарастване. Затова, асцитната форма може да се определи като по-агресивна (49). Съгласно получените от нас резултати, активността на АРА е по-ниска в по-бързо делящите се клетки от асцитната форма. Това заключение беше потвърдено и чрез биохимичен анализ на активността на ензима в хомогенати от двете форми на тумора на Ерлих в сравнение с тази в млечната жлеза при нетретирани мишки (Фиг. 17 и 18).

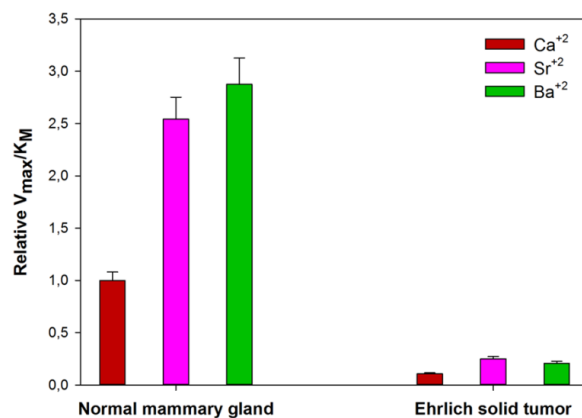
Биохимично бяха определени константата на Михаелис (K_M) и константата на ефективност (V_{max}/K_M) на ензима спрямо субстрата Glu-АМАС при активиране с различни йони на алкалоземни метали – калциеви (с които се активира нативния ензим), стронциеви и бариеви (Фиг. 17 и 18). Изследването с различни йони може да даде представа за потенциални изменения в структурата на Ca^{2+} -свързващия център на ензима при патологични състояния.

Както е добре известно, константата на Михаелис дава представа за сродството на ензима към субстрата. Колкото по-ниско е K_M , толкова по-стабилен е ензим-субстратният комплекс и съответно, толкова по-голямо е сродството на ензима към дадения субстрат (Фиг. 17). На фигурата не е представено K_M за Ca^{2+} , защото тя е в пъти по-висока от тази със Sr^{2+} и Ba^{2+} и не може да се измери. Вижда се, че при млечна жлеза на здрави мишки сродството на ензима със субстрата намалява в реда $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+}$. При солидната форма на тумора, този ред е същия, но с тази разлика, че при активиране с Ba^{2+} и Sr^{2+} разликата в K_M не е статистически значима.

На фигура 23 е показана константата на специфичност на ензима към субстрата Glu-АМАС V_{max}/K_M . Колкото е по-голямо това съотношение, толкова по-активен е ензима спрямо този субстрат. Вижда се, че в норма най-ниска е ефективността при активиране с Ca^{2+} , следва със Sr^{2+} и най-висока с Ba^{2+} , което е потвърждение на полученото в първата графика. При солидната форма на тумора се получава много ниска ефективност при активиране и с трите йона. Понеже ефективността зависи от V_{max} , която пък зависи линейно от концентрацията на ензима, това означава, че при този тумор АРА е с много ниска концентрация. Данни за асцитната форма няма, защото там не се регистрира ензимна активност.



Фиг. 17. Константа на Михаелис (K_M) за АРА в млечна жлеза на здрави половозрели мишки и в модел на тумор на Ерлих при активиране на АРА с йони на алкалоземни метали.



Фиг. 18. Определяне на константата на ефективност на АРА (V_{max}/K_M) при субстрат Glu-АМАС в млечна жлеза на здрави половозрели мишки и в модел на тумор на Ерлих при активиране на ензима с йони на алкалоземни метали.

Проведените кинетични изследвания при млечна жлеза на половозрели мишки показват, че както сродството на АРА към субстрата Glu-АМАС, така и ефективността на хидролиза на този субстрат зависят от радиуса на активирания йон (Табл. 2).

Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
1.00	1.18	1.35

Таблица 2. Йонни радиуси на металните йони за координационно число 6 (Å). (по Shannon, 1976)

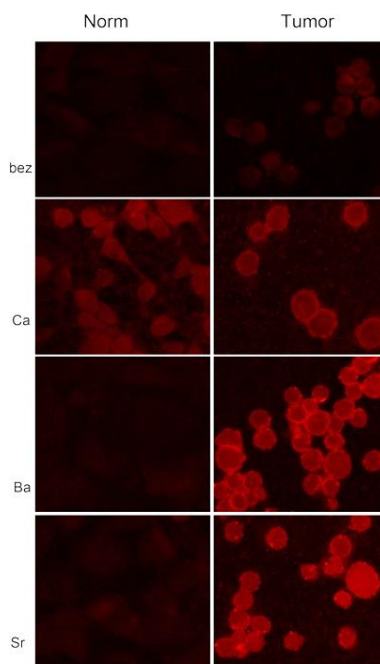
Колкото по-голям е йонния радиус, толкова по-благоприятно е свързването на субстрата и по-ефективна е ензимната катализа. Този резултат е неочакван, защото Ca^{2+} са природни активатори на ензима. От друга страна, такава зависимост не е ясно изразена при модела на тумор на Ерлих, което позволява да се допусне, че Ca^{2+} -свързващият център при туморните клетки има различна структура.

Получените резултати съответстват на хистохимичните данни по-горе и показват, че при този експериментален модел активността на АРА намалява драстично в туморните клетки и зависи от агресивността на тумора, т.е. колкото е по-агресивен, толкова по-ниска е активността на АРА. Това показва също, че моделът на тумор на млечна жлеза при мишки е близък до туморите на гърдата при човека по отношение измененията в активността на АРА (60, 81) и съответно, е по-полезен от MNU-индуцираният карцином на жлезата при плъхове.

III.5. Активност на АРА при нормални и туморни фибробласти от мишка.

Тъй като фибробластите имат решаваща роля при развитието на солидните тумори, беше проведено цитохимично изследване на активността на АРА със субстрат Glu-HHNI в туморни фибробласти от фибросарком при мишка (линия Meth A sarcoma) в сравнение с тази в нормални ембрионални фибробласти на мишка от линията BALB/3T3 clone A31 (Фиг. 19). В отсъствие на метални йони, ензимът не е активен към субстрата Glu-HHNI, което съответства на данните от молекулните изследвания върху субстратната специфичност на АРА (31). При активиране с Ca^{2+} , се наблюдава ензимна активност и в двата вида клетки, но в туморните флуоресцентният сигнал е видимо по-силен, т.е. активността е по-висока. Интерес предизвиква резултата при активиране със Sr^{2+} и Ba^{2+} , където се наблюдава силна ензимна реакция само в туморните фибробласти. Това показва, че Ca^{2+} -свързващия мотив (а вероятно и активният център) на АРА при туморните фибробласти има различна структура в сравнение с този при нормалните, което може да е причинено от мутации в гена, кодиращ АРА.

Тази разлика предоставя възможност за експериментално разграничаване на нормални от туморни фибробласти в модели на онкологични заболявания при мишки в криостатни срези, като при доказване на АРА се използват за активатори различни йони на алкалоземни метали. Така, нарастването на активността на ензима в присъствие на Sr^{2+} и Ba^{2+} би показало наличие на туморни фибробласти.



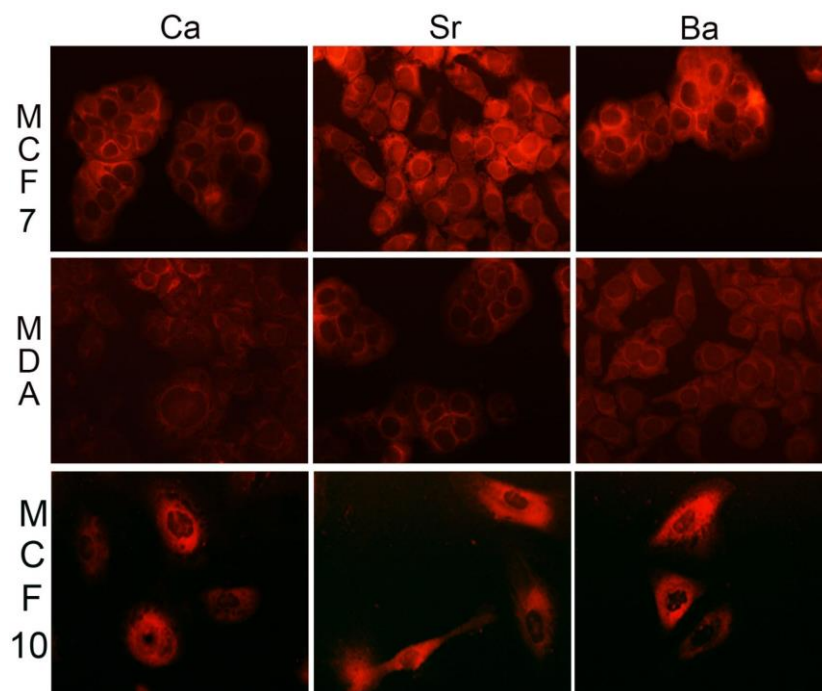
Фигура 19. Цитохимична локализация на АРА в нормални и туморни фибробласти от мишка при активиране с йони на алкалоземни метали. X400

Получените данни за карцином на млечна жлеза при мишки показват драстично понижаване на активността на АРА в туморната паренхима. От друга страна е възможно АРА от фибробластите в туморната строма да действа синергично с матриксни и други протеази за осигуряване на оптимална среда за разпространение на туморните клетки.

III.6. Изследване на активността на АРА в моделна система от три човешки клетъчни линии.

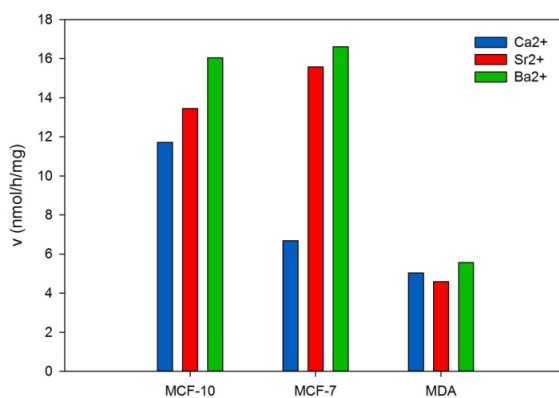
За да получим данни за маркерната роля на АРА при човешки тумори на гърдата, използвахме моделна система от три човешки клетъчни линии – епителни клетки от млечна жлеза (MCF-10A), и две туморни линии с различна степен на инвазивност – MCF-7 и MDA-MB-231. И двете туморни линии се характеризират с висока пролиферативна активност, но MCF-7 е изолирана от луминален карцином тип А, докато MDA-MB-231 е получена от най-агресивния тип рак на млечна жлеза – тройно негативен.

Цитохимичният анализ на активността на АРА беше проведен в препарати от трите клетъчни линии със субстрат Glu-НННI, в присъствие на различни активатори на ензима (Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+}) (Фиг. 20). В линията MCF-10A се наблюдава висока активност на АРА при активиране и с трите вида йони. В линията MCF-7 активността на ензима е ниска при активиране с Ca^{2+} и нараства при активиране със Sr^{2+} и Ba^{2+} . И при трите типа йони обаче, активността остава по-ниска от тази в линията MCF-10A. Активността на АРА в линията MDA-MB-231 е много ниска и при трите вида активация.



Фигура 20. Цитохимична локализация на АРА в три човешки клетъчни линии със субстрат Glu-HHNI, в присъствие на йони на алкалоземни метали. X400

За количествена оценка на активността на АРА, ние определихме биохимично нивата на активност на ензима чрез измерване на началните скорости на реакцията на хидролиза на субстрата Glu-pNA в хомогенати от трите клетъчни линии, в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони (Фиг. 21). При линията MCF-10A активността на ензима е висока и постепенно се покачва с увеличаване на йонния радиус на активиращите йони (Табл. 2). При линията MCF-7 активността е много по-ниска от тази при нормалните клетки в присъствие на калциеви йони, но нараства в присъствие на стронциеви и бариеви йони, което потвърждава данните от цитохимичния експеримент. Активността на АРА в линията MDA-MB-231 е много ниска, по ниска от тази при първите 2 клетъчни линии и не се променя независимо от активиращия йон.



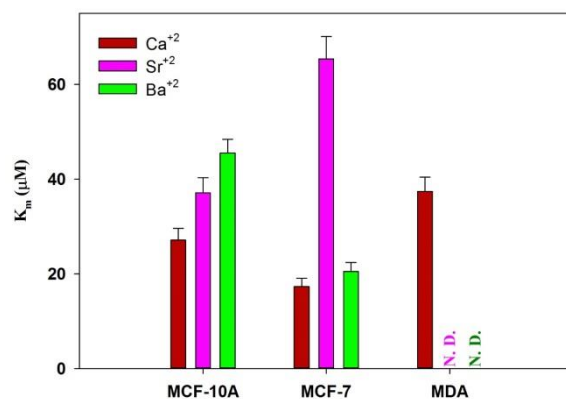
Фигура 21. Начални скорости на реакцията на хидролиза на Glu-pNA, катализирана от АРА в хомогенати от три клетъчни линии, в присъствие на 1 mM концентрации от Ca^{2+} , Sr^{2+} или Ba^{2+} . Данните са средните стойности от три експеримента ($SD < 6\%$).

Тези резултатите показват, че активността на АРА е много по-ниска в туморните линии в сравнение с нормалната при прилагане на природния активатор на ензима (Ca^{2+}), което съответства на данните, получени от други автори при изследване на оперативни биопсии (60, 81). Вижда се и съответствие с цитохимичните резултати, тъй като ензимът в линията MCF-7 се активира значително в присъствие на Sr^{2+} и Ba^{2+} , а този в MDA-MB-231 има ниска активност независимо от вида на активирания йон. Ясно изразена е и тенденцията за намаляване на активността на ензима с нарастване на пролиферативната активност (инвазивния потенциал) на клетките. Тези резултати са в унисон с полученото при модел на тумора на Ерлих при мишки и отново показват ползите от прилагането на този модел за изследване функциите на отделните компоненти на tRAS при рак на млечна жлеза, тъй като той в голяма степен съответства на туморните заболявания при човека.

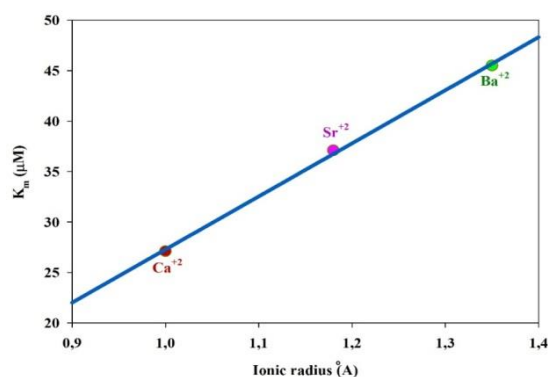
Също така, отнасянето на линията MCF-7 към Sr^{2+} и Ba^{2+} йони показва възможност за определяне на пролиферативния потенциал на туморните клетки на криостатен срез по покачването на активността на АРА в присъствие на тези йони.

В хомогенати от три човешки клетъчни линии (MCF-10A, MCF-7 MDA-MB-231) в присъствие на йони на алкалоземни метали (Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+}) с концентрация 1 mM, бяха определени кинетичните параметри на реакцията на хидролиза на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC от АРА. Реакцията бе проведена в 0.1 M какодилатен буфер с pH 7.4 при 37°C. От получените начални скорости на реакцията при различни концентрации на субстрата и използване на уравнението на Михаелис и Ментен, чрез нелинеен регресионен анализ бяха определени максималната скорост ($V_{\max}$), константата на Михаелис (K_M) и константата на специфичност ($V_{\max}/K_M$) в присъствие на Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} йони. Получените резултати за K_M са представени на Фигура 22.

Получените данни показват, че и при трите клетъчни линии K_M е най-ниска при използване на калциеви йони, в сравнение с йоните на другите алкалоземни метали. При линията MDA-MB-231, K_M в присъствие на Sr^{2+} и Ba^{2+} е над един порядък по-висока от тази в присъствие на Ca^{2+} и на практика не може да се измери. Тези резултати дават основание да се заключи, че бариевите и стронциевите йони, водят до влошаване на свързването на субстрата Glu-AMAC в активния център на АРА, като ефектът е най-силен при клетките от линията MDA-MB-231. Това заключение е в съгласие с факта, че свързващия алкалоземните йони център в молекулата на ензима е конструиран да свързва най-ефективно калциеви йони. То се подкрепя и от получената при клетъчната линия MCF-10A линейна зависимост на стойностите на K_M ($r = 0.9994$) от йонния радиус на алкалоземните метали (Фиг. 23). С нарастване на йонния радиус се наблюдава влошаване на свързването на субстрата, дължащо се вероятно на структурни промени в калций-свързващия център. При двете туморни клетъчни линии такава зависимост не се установява, което вероятно се дължи на изменения в този център на ензима.

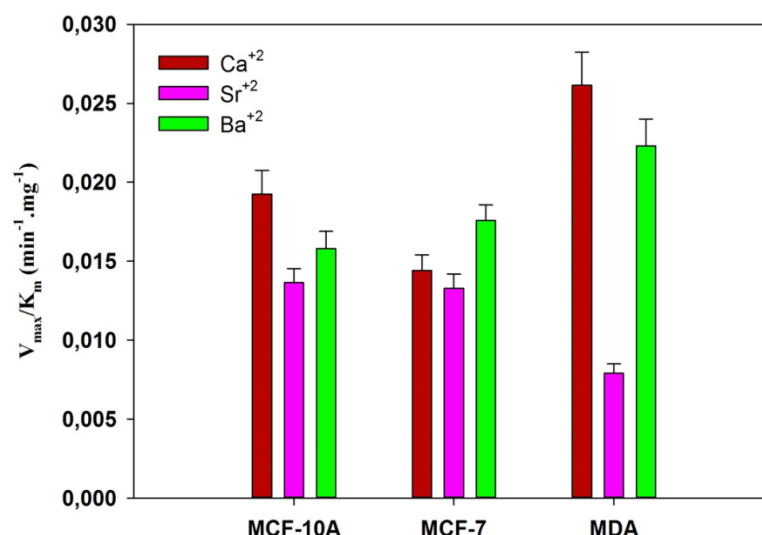


Фигура 22. Сравняване на константата на Михаелис K_m в трите човешки клетъчни линии, в присъствие на различни активиращи йони.



Фигура 23. Линейна зависимост на K_m от йонния радиус на активирация метал при линията MCF-10A.

Резултатите от изследването на константата на ефективност (специфичност) на АРА в трите вида клетки в присъствие на различни активиращи йони са показани на фигура 24. Константата на специфичност (V_{max}/K_m) на използване на флуоресцентния субстрат Glu-AMAC спрямо АРА в присъствие на калциеви йони, нараства в реда MCF-7 < MCF-10A < MDA-MB-231. При активиране с бариеви йони се наблюдава нарастване на V_{max}/K_m в реда MCF-10 < MCF-7 < MDA-MB-231. Това показва, че ефективността на ензима към Glu-AMAC в присъствие на Ba²⁺ нараства с увеличаване на пролиферативната активност (инвазивността) на клетъчната линия. При използване на стронциеви йони, се установява обратната зависимост - V_{max}/K_m нараства в реда MDA-MB-231 < MCF-7 < MCF-10.



Фигура 24. Определяне на константата на ефективност на АРА ($V_{\max}/K_M$) за АРА в трите клетъчни линии при активиране с йони на алкалоземни метали.

Отношението на константите на специфичност при линиите MDA-MB-231 и MCF-10A в присъствие както на Ca^{2+} , така и на Ba^{2+} йони е изчислена на 1.4. Като се вземат предвид по-високите стойности на K_M за линията MDA-MB-231, особено в присъствие на Ba^{2+} , може да се предположи, че каталитичната константа k_{cat} в този случай е значимо по-висока. Това означава, че Ca^{2+} -свързващият участък и активният център на АРА в линията с по-висок метастатичен потенциал се изменят по такъв начин, че да се осъществява по-ефективен катализ. Тези изменения може да се дължат на мутации в гена, кодиращ ензима.

Трябва да се отбележи, че както при нетуморогенната клетъчна линия MCF-10A, така и при по-слабо инвазивната туморна клетъчна линия MCF-7 се наблюдава едно и също увеличение (1.4 пъти) на k_{cat} при прехода от Ca^{2+} към Ba^{2+} йони. Тези данни и казаното по-горе, дават основание да се направи заключението, че АРА в трите клетъчни линии осъществява по-ефективен катализ в присъствие на бариеви йони.

Влиянието на стронциевите йони при клетъчните линии MCF-10A и MCF-7 е различно. При MCF-10A каталитичните константи в присъствие на Ca^{2+} и Sr^{2+} йони са практически еднакви. При клетъчната линия MCF-7, в присъствие на Sr^{2+} k_{cat} е 3.5 пъти по-висока отколкото в присъствие на калциеви йони. Следователно, АРА в клетъчната линия MCF-7 осъществява по-ефективен катализ при активиране със Sr^{2+} .

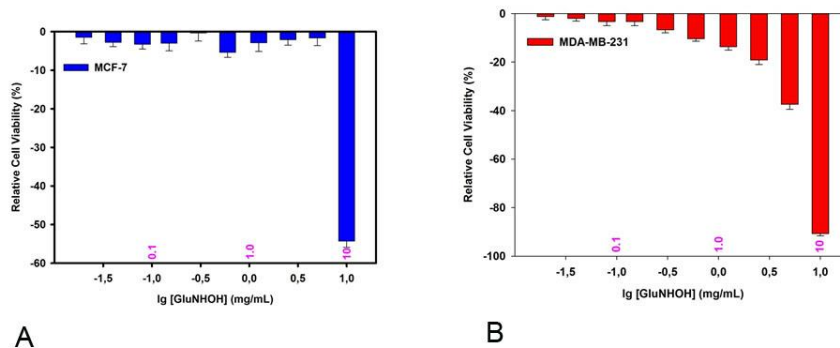
Този резултат съответства на видимото покачване на активността на АРА в MCF-7 в присъствие на Sr^{2+} , установено при цитохимичното визуализиране на ензима със субстрата Glu-NNI (Фиг. 20). Той показва една възможност за оценяване на инвазивния потенциал на туморните клетки *in situ* в криостатни срези от биопсии. Така, при активиране на ензима със Sr^{2+} , засилването на флуоресцентния сигнал би означавало сравнително нисък потенциал за разпространение на туморните клетки, докато фонова флуоресценция при активиране с кой да е от 3-те йона би показало висок потенциал за прогресиране на тумора и лоша прогноза.

Представените резултати доказват, че регистрираната при туморните линии ниска активност на АРА не се дължи на неспособност на ензима да разгражда субстратите си, а на потисната синтеза и експресия.

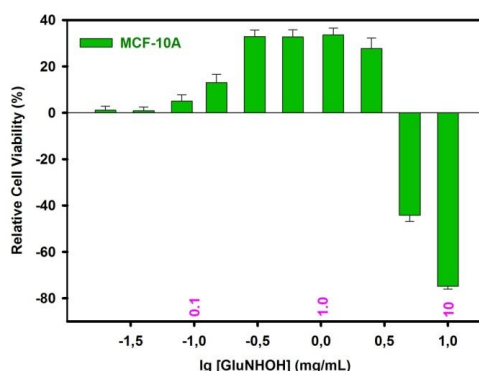
Резултатите при човешките клетъчни линии са интересни и от друга гледна точка – те показват различно отнасяне на мишия и на човешкия ензим към трите вида йони както в норма, така и в туморни клетки от млечна жлеза. Мишият ензим в норма се активира най-ефективно от Ba^{2+} и най-слабо от Ca^{2+} , докато при човешкия ензим е обратното. Данните от сравняването на аминокиселинната последователност на АРА при двата вида показват над 70% идентичност (35). Нашите резултати обаче, предполагат наличие на съществени разлики в калций-свързващия мотив.

III.7. Действие на специфичен инхибитор на АРА GH върху човешки клетъчни линии.

Във връзка с представените по-горе резултати за намалена активност на АРА при клетки от рак на млечна жлеза, ние решихме да проучим въздействието на специфичния инхибитор на ензима GH върху преживяемостта, пролиферативната активност и апоптотичния потенциал на клетките от линията MCF-10A. Първоначално, изследвахме цитотоксичните свойства на инхибитора в трите човешки клетъчни линии чрез МТТ-тест (Фиг. 25 и 26). На фигурите е показана зависимостта на клетъчната преживяемост в проценти от логаритъм от концентрацията на инхибитора, като преживяемостта на контролните нетретирани клетки е приета за 100%. Бяха определени константите на полу-инхибиране на клетъчния растеж IC_{50} (Табл. 3). От фигурите и от високите стойности на IC_{50} , показани в таблицата, ясно се вижда, че GH не е токсичен за нито една от клетъчните линии. При нормалните клетки от линията MCF-10A се оказва, че GH в концентрации от 0.3 до 1.25 mg/ml ускорява пролиферацията на клетките с $\approx 30\%$ (Фиг. 26). Беше определена концентрацията на активиране с 50% - $EC_{50} = 0.15$ mg/ml. Механизмът на това въздействие на инхибитора *in vitro* не е ясен на този етап. Възможно е АРА да участва в механизмите за регулиране на клетъчното делене. От друга страна, потискането на АРА *in vivo* води до натрупване на AngII. Известно е, че AngII има митогенен ефект върху клетките, медиран от AT1-рецепторите (1, 68, 95). Свързването на AngII с AT1R стартира вътреклетъчни сигнални пътища, които водят до експресия на онкогени с пролиферативен ефект (71) и растежни фактори (24). Намаленият катаболизъм на AngII и увеличената концентрация на AT1-рецепторите при рака на млечната жлеза (91) могат да доведат до драстично нарастване в митогенната активност на туморните клетки.



Фигура 25. Определяне цитотоксичността на инхибитора на APA GH за туморни клетки от линиите MCF-7 (A) и MDA-MB-231 (B) с помощта на MTT-тест.



Фигура 26. Определяне цитотоксичността на инхибитора на APA GH за клетки от линията MCF-10A с MTT-тест.

Клетъчна линия	MCF-10A	MCF-7	MDA-MB-231
IC ₅₀ [mg/ml]	6.0	9.0	6.5

Таблица 3. Константи на полу-инхибиране на клетъчния растеж на трите човешки клетъчни линии от инхибитора на APA GH.

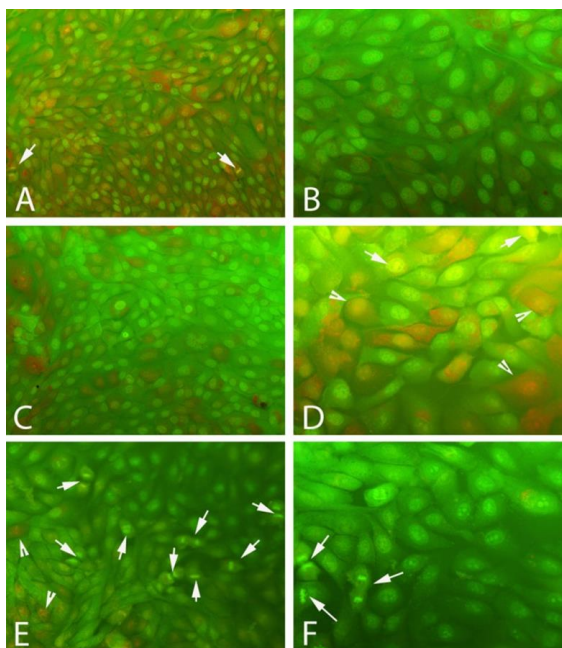
За проучване на възможни ефекти на инхибитора GH върху клетките от линията MCF-10A, използвахме следната моделна система: клетки от линията бяха третирани за 72 часа със стандартния цитостатик оксалиплатина в концентрация 2 μ M, която съответства на IC₁₀ (определена при предварителни експерименти за тази клетъчна линия). Освен това, към клетки, предварително третирани за 2 часа с GH в концентрация 1.5 μ M, която съответства на EC₈₀, беше добавена оксалиплатина, както по-горе. За контроли бяха използвани нетретирани клетки MCF-10A.

За визуализиране на резултатите, бяха подготвени препарати от клетки, оцветени със смес акридин оранж (АО) : пропидиев йодид (PI) 1:1 и проучвани под флуоресцентен микроскоп. При това оцветяване, ядрата на интактните клетки се маркират с АО и флуоресцират в зелено. При клетки с нарушена цялост на мембраната (некротични или в късна апоптоза) ядрата се оцветяват от PI (червена флуоресценция) (72). Оцветяването позволява да се наблюдават и митотични фигури. Резултатите са показани на Фиг. 32. При контролите се установява нормална морфология на клетките; незначителен брой клетки са с червено оцветени ядра (некроза или късна апоптоза), а митотичните фигури са 1-2 на зрително поле при увеличение x200 (Фиг. 27A, B). При клетките, третирани с оксалиплатина се виждат както интактни клетки, така и клетъчни ядра с оранжево-червена до ярко червена флуоресценция, което показва значителен брой некротични клетки (или в късна апоптоза) (Фиг. 27C, D). При клетките, предварително третирани с инхибитор, прави впечатление големият брой митотични фигури – 7-9 на зрително поле, което

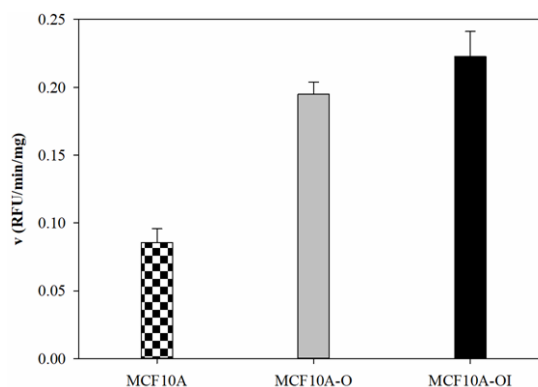
съответства на получения по-горе резултат за митогенно действие на инхибитора на АРА. Некротичните клетки са малко, както при нетретираните контроли (Фиг. 27Е, F).

Оцветяването с АО/PI е въведено за бърза оценка на преживяемостта на клетки, третирани със цитостатици (8) и се прилага широко и до днес в комбинация с поточна цитометрия или цитохимично за определяне на съотношението живи/мъртви клетки (42). То не дава пълна представа за нивата на апоптозата, защото в ранните ѝ етапи клетъчната мембрана е интактна и не може да се получи оцветяване на ядрата с PI. Също така, различни морфологични изменения като вакуолизация на цитоплазмата, образуване на апоптотични мехурчета, промени в структурата на ядрата (пикноза, кариорексис) не се документират достатъчно ясно, за да бъдат оценени количествено.

За количествена оценка на нивото на апоптозата, от трите групи клетки бяха приготвени хомогенати, в които беше определена активността на каспаза 3 по стандартен метод с комерсиален флуорогенен субстрат на базата на 7-амино-4-метилкумарин - Ас-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Фиг. 28).



Фигура 27. Оцветяване на препарати от клетки MCF-10A с АО/PI. Ляво (A, C, E) X200; Дясно (B, D, F) X400. A, B – контролни (нетретираните клетки) – нормална морфология на клетките с 1-2 митотични фигури на зрително поле; C, D – клетки, третирани само с оксалиплатина – апоптотични клетки (глави на стрелки), по 1 митоза на 2-3 зрителни полета; E, F – клетки, третирани с инхибитора на АРА GH и след това с оксалиплатина – апоптотични клетки (глави на стрелки), 8-10 митотични фигури на зрително поле.



Фигура 28. Начални скорости на реакцията на хидролиза на Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC, катализирана от каспаза-3 в хомогенати от клетъчната линия MCF-10A: MCF10A – нетретираните клетки; MCF10A-O – клетки, третирани с оксалиплатина; MCF10A-OI – клетки, третирани с GH и оксалиплатина.

Резултатите показват ниска активност на каспаза 3 в нетретираните клетки MCF-10A. При прилагането на цитостатика, очаквано активността на ензима нараства двойно. При клетките, предварително третирани с инхибитор, нивото на апоптозата е малко по-високо, но разликата не е статистически значима, което означава, че инхибиторът на APA не оказва влияние върху този процес.

Каспазите са втреклетъчни цистеинови ендопептидази, които хидролизират пептидна връзка при карбоксилната група на аспартова киселина. Част от тях формират протеолитична каскада, която хидролизира последователно втреклетъчни протеини. В резултат на тези процеси клетката придобива характерна морфология – формиране на мехурчета по клетъчната мембрана, свиване, кондензиране на хроматина и фрагментиране на ДНК и крайният резултат е програмирана клетъчна смърт (апоптоза). Каспазите се активират при рецептор-зависимата и при митохондриално-зависимата апоптоза (Morgan et al., 2014). Съществуват и каспазно-независими апоптотични пътища (26). Каспазата 3 е най-често активируения ензим при апоптоза и се използва за количествена оценка на този процес (78). Каспаза 3 принадлежи към ефекторните каспази и има отношение към стартирането на апоптотичните промени в клетката (103). Има обаче, клетъчни типове, при които тя не се активира (26, 78).

Двойното нарастване на активността на каспаза 3 в клетъчната линия MCF-10A при третиране с оксалиплатина при нашите опити показва, че каспаза 3 има отношение към апоптотичния процес при тази клетъчна линия.

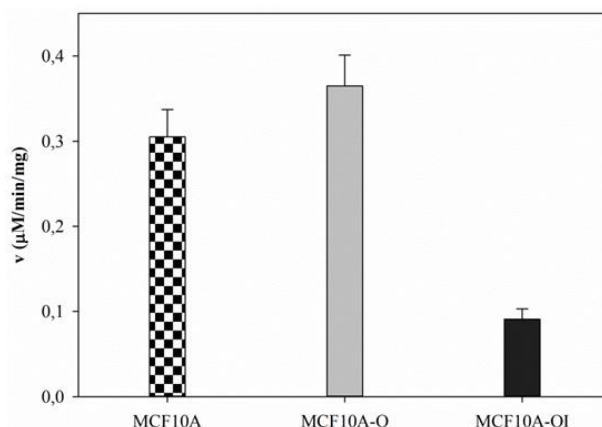
Изследванията ни в тази моделна система включиха и определяне на нивата на активност на Фибробласт активирация протеин α .

Фибробласт активирация протеин α (FAP; EC 3.4.21.B28) е мембранно-свързана серинова протеаза от фамилия S9b (пролин-специфични пептидази). Ензимът практически не се експресира във възрастни тъкани и органи. Той е характерен главно за ембрионални клетки и активирани фибробласти, но е намерен и в някои типове туморни клетки (29, 47). Този ензим се свързва с етиологията на голям брой туморни заболявания. При много онкологични заболявания той е активатор на туморната прогресия. Има обаче, и редица

малигнени заболявания, при които FAP е туморен супресор (81). Например, отсъствието на експресия на FAP по мембраната на клетки от малигнена меланом и недребноклетъчен карцином на белия дроб при човека се счита за част от туморния фенотип (108, 109).

Показано е, че FAP се експресира и е активен в клетки от линията MCF-10A (45). От друга страна, клетките от линиите MCF-7 и MDA-MB-231 се използват като отрицателни контроли за отсъствие на експресия на FAP (42). Ролята на ензима при тумор на млечна жлеза не е добре изяснена. Повечето автори приемат, че FAP е характерен за туморните фибробласти, но не и за самите туморни клетки (47) и нивата му във фибробластите могат да имат диагностична стойност (36).

Ние изследвахме нивата на активност на фибробласт активирания протеин α (FAP) в хомогенати от трите групи клетки с прилагане на хромогенния биохимичен субстрат β -Ala-D-Ala-Pro-pNA (Фиг. 29).



Фигура 29. Начални скорости на реакцията на хидролиза на β -Ala-D-Ala-Pro-pNA катализирана от FAP в хомогенати от клетъчната линия MCF-10A: MCF10A – нетретираните клетки; MCF10A-O – клетки, третирани с оксалиплатина; MCF10A-OI – клетки, третирани с GH и оксалиплатина.

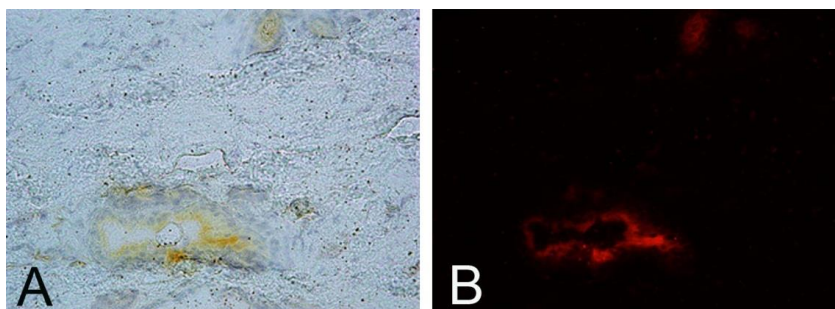
От фигурата се вижда, че ензимът е активен в нетретираните клетки от линията MCF-10A, което съответства на литературните данни (45). При клетките, третирани само с оксалиплатина, нивата на активност на ензима са малко по-високи, но разликата не е статистически значима. При клетките, третирани предварително с инхибитор обаче, се наблюдава рязък спад на активността на FAP. Както бе описано по-горе, отсъствието на този ензим е характерно за туморните клетки от млечна жлеза.

От горните изследвания се вижда, че третирането на нормалните клетки от млечна жлеза MCF-10A с инхибитор на АРА води до съществено нарастване на тяхната пролиферативна активност и потискане на експресията на FAP, т.е. техният фенотип се променя и се доближава до този на туморните клетки от карцином на млечна жлеза. Тези резултати ни дават основание да допуснем, че понижената активност на АРА при рак на гърдата не е страничен ефект, а напротив – тя е част от туморния фенотип на клетките.

III.8. Изследване на локализацията и активността на АРА в криостатни срези от оперативни биопсии при тумори на млечна жлеза.

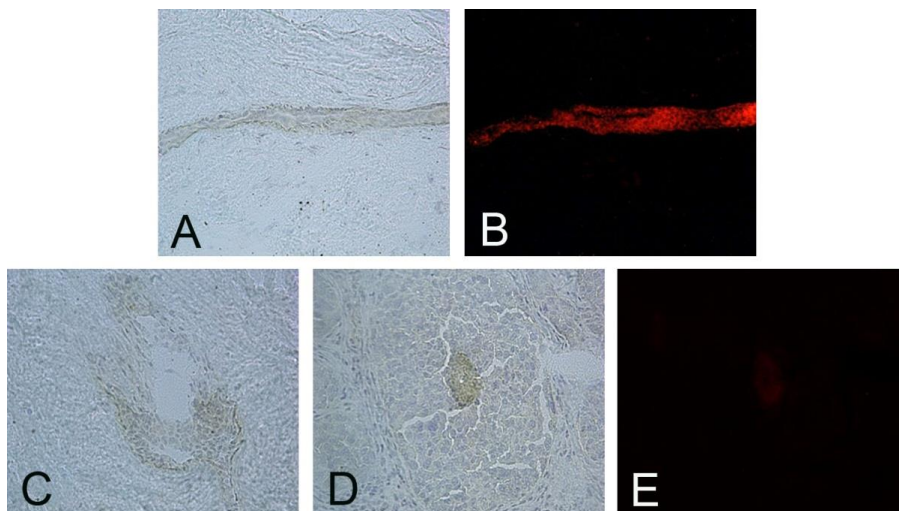
Като част от нашите изследвания и за проверка на резултатите, получени при човешки клетъчни линии, ние направихме проучване на нивата на активност на АРА в криостатни срези от туморни образувания при човек с помощта на флуорогенния субстрат Glu-НННI. Криостатните срези бяха анонимни, от пациенти на средна възраст 53 години и бяха предоставени от Специализирана болница за активно лечение по онкология ЕАД, София. Те са диагностицирани от патолога на болницата като инфилтриращ дуктален карцином и смесен дукто-лобуларен карцином на млечна жлеза.

На фигура 30 е представен участък от резекционната линия с нормална морфология на жлезата. Вижда се каналче с активна АРА в секреторния епител.



Фигура 30. Резекционна линия. Млечно каналче с положителна реакция за АРА.
X200

На фигура 31 са представени туморен кръвоносен съд, положителен за АРА (Фиг. 31А, В) и каналчета, изпълнени с туморни клетки, в които не се наблюдава активност на АРА (Фиг.31С, D, Е). Високата активност на ензима в туморните кръвоносни съдове съответства на данните, получени от други автори (84) и на установената роля на ензима в неоваскуларизацията (59). Отсъствието на ензимна активност в туморните клетки е в унисон с получените резултати за туморните клетъчни линии.



Фигура 31. Тумор на млечна жлеза при човек. Туморен кръвоносен съд, положителен за АРА (А, В); каналчета, изпълнени с туморни клетки, отрицателни за АРА (С, D, Е). X200

Получените резултати показват, че в туморни образувания на млечната жлеза при човека, изменените секреторни клетки на млечните каналчета не експресират АРА, поне при инфилтриращ дуктален/дуктолобуларен карцином. Тези данни дават основание да бъдат предложени изследванията на маркерната роля на ензима в оперативни биопсии от рак на млечна жлеза.

IV. ИЗВОДИ

Въз основа на получените резултати бяха направени следните изводи:

1. На базата на новосинтезирани съединения са разработени:
 - Флуорогенен метод за цито- и хистохимично локализиране на АРА (субстрат - α -Glu- HNHNI);
 - Флуоресцентен метод за определяне на активността на АРА (субстрат - α -Glu-AMAC);
 - Тестирано е приложението на нов специфичен инхибитор на АРА - α -Glu-хидроксамат,
с което значително е подобрен „инструментариума“ за изследване маркерната роля на ензима при различни заболявания.
2. Показано е, че при експериментален модел на тумор на Ерлих активността на АРА в туморните клетки намалява в сравнение с тази здрави млечни жлези и с нарастване агресивността на тумора.
3. Доказано е, че активността на АРА нараства в туморните фибробласти от мишка като се модифицира структурата на Ca^{2+} -свързващия мотив. Намерен е начин за маркиране на туморни фибробласти *in situ* по повишаването на активността на ензима в присъствие на стронциеви и бариеви йони.
4. Показано е, че в експериментална моделна система от една трайна нормална и две туморни клетъчни линии от рак на млечна жлеза при човек с различна степен на инвазивност активността на АРА намалява паралелно с нарастване на метастатичния потенциал.
5. Трите типа клетки от млечна жлеза при човек реагират различно на трите вида йони – активатори на ензима, което показва изменения в Ca^{2+} -свързващия участък и активният център на АРА при развитието на тумор на гърдата, вероятно дължащи се на мутации в гена, кодиращ ензима.
6. Промените в молекулата на ензима при карцином на млечна жлеза водят до повишаване на каталитичната ефективност. Наблюдаваната по-ниска активност на АРА при този тип карциноми се дължи не на намалена способност на ензима да разгражда субстратите си, а на намален синтез и експресия на ензимната молекула и вероятно е реакция на клетките към потиснатата експресия на ензима.
7. Предложен е метод за оценка на метастатичния потенциал на туморните клетки *in situ* чрез използване на стронциеви и бариеви йони като активатори на АРА.

8. Показано е, че потискането на АРА в нормални епителни клетки от млечна жлеза с нетоксичен специфичен инхибитор води до нарастване на пролиферативната активност и загуба на експресия на фибробласт активиращ протеин α , т.е. те придобиват характерни особености на туморни клетки от млечна жлеза. Този резултат дава основание да се допусне, че намалената активност на АРА при този тип тумори не е странично явление, а е част от туморния фенотип на клетките.

9. Доказано е, че потискането на АРА не влияе върху апоптотичния потенциал на клетките, както и че каспаза 3 се активира при действието на про-апоптотични агенти върху клетки от линията MCF-10A.

10. Началните изследвания на оперативни биопсии от инфилтриращи дуктални/дуктолобуларни карциноми показват отсъствие на ензимна активност в туморните клетки.

Обобщение: Съгласно получените резултати, потискането на синтеза и експресията на АРА при карцином на млечна жлеза е свързано с преминаването на клетките към туморен фенотип. Драматичното намаляване на активността на ензима в туморните клетки може да служи като спомагателен биомаркер за лоша прогноза. Прилагането на различни активатори на ензима (йони на алкалоземни метали) може да спомогне за оценка на метастатичния потенциал на клетките *in situ*.

V.ПРИНОСИ.

Оригинални приноси:

1. На базата на новосинтезирани химични съединения са разработени методи за изследване на локализацията и активността на АРА, които показват редица предимства пред досега използваните:

Флуорогенен метод за цито- и хистохимично локализиране на АРА със субстрат - Glu-NNH₂;

Флуоресцентен метод за определяне на активността и кинетичните параметри на АРА със субстрат - Glu-AMAC;

Специфичен инхибитор на АРА - GH,

2. Показано е, че експерименталният модел на тумор на Ерлих при мишки е подходящ за изследване ролята на tRAS при рак на млечна жлеза от MNU-индуцирания карцином на млечна жлеза при плъхове, защото е по-близък до рака на гърдата при човека.

3. Доказано е, че при карциноми на млечна жлеза се променя структурата на Ca²⁺-свързващия център и активния център на АРА, което може да се дължи на мутации в гена, кодиращ ензима или на епигенетични промени. При човека тези изменения водят до повишаване на каталитичната ефективност на ензима.

4. Показано е, че потискането на АРА със специфичен инхибитор в нормални епителни клетки от млечна жлеза на човек води до придобиване на фенотипни промени, характерни за туморните клетки, т.е. ниските нива на ензима при рака на гърдата са част от туморния фенотип на клетките.

5. Предложен е метод за оценка на инвазивния потенциал на туморни клетки от млечна жлеза *in situ*, основан на отнасянето на АРА към активиране с Sr^{2+} и Ba^{2+} йони.

Потвърдителен принос:

Доказано е, че активността на АРА при рак на гърдата е по-ниска от тази в съседните здрави тъкани и намалява с повишаване на агресивността на тумора.

VI. ЛІТЕРАТУРА.

1. Ager E. I., Neo J., Christophi C. The renin–angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(9), 1675–1684.
2. Aguilera G., Kiss A., Luo X., Akbasak B. S. The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci.*, 1995, **771**, 173–86.
3. Alliot, F., Rutin J., Leenen P. J., Pessac B. Brain parenchyma vessels and the angiotensin system. *Brain Res.*, 1999, **830**, 101–112.
4. Andrade S. P., Cardoso C. C., Machado R. D. P., Beraldo W. T. Angiotensin II-induced angiogenesis in sponge implant in mice. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, 1996, **16**, 302–307.
5. Angelopoulou K., Diamandis E. P., Sutherland D. J.A. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int. J. Can.*, 1994, **58**, 480–487.
6. Arpino G., Generali D., Sapino A., Del Matro L., Frassoldati A. Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective. *The Breast*, 2013, **22**, 109–120.
7. Banegasa I., Prietoa I., Albab F., Vivesb F., Araquea A., Segarraa A. B., Dur´anb R., de Gasparoc M., Ram´ıreza M.. Angiotensinase activity is asymmetrically distributed in the amygdala, hippocampus and prefrontal cortex of the rat. *Behavioural Brain Research*, 2005, **156**, 321–326.
8. Bank H. L. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1988, **24**(4), 266–273.
9. Beveridge R. A. Review of clinical studies of CA 27.29 in breast cancer management. *Int. J. Biol. Markers*, 1999, **14**(1), 36–9.
10. Blanco L., Sanz B., Perez I., Sanchez C. E., Cadenas M. L., Pinto F. M., Gil J., Casis L., Ilopez J., Larrinaga G. Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms. *BMC Cancer*, 2014, **14**, 386.
11. Bodineau L., Frugiere A., Marc Y., Inguibert N., Fassot C., Balavoine F., Roques B., Llorens-Cortes C. Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure A new strategy for treating hypertension. *Hypertension*, 2008a, **51**, 1318–1325.
12. Bodineau L., Frugiere A., Marc Y., Claperon C., Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as centrally acting antihypertensive agents. *Heart. Fail. Rev.*, 2008b, **13**, 311–319.
13. Bogenrieder T., Finstad C. L., Freeman R. H., Papandreou C. N., Scher H. I., Albino A. P., Reuter V. E., Nanus D. M. Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV in benign and malignant human prostate tissue. *Prostate*, 1997, **33**, 225–232.
14. Bouchet C., Spyrtos F., Martin P. M., Hacene K., Gentile A., Oglobine J. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinomas. *Br. J. Cancer*, 1994, **69**(2), 398–405.
15. Broughton-Pipkin F., Symonds E. M. Factors affecting angiotensin II concentrations in the human infant at birth. *Clin. Sci. Molec. Med.*, 1977, **52**, 449–456.
16. Carrera M. del P., Ramirez-Exposito M. J., Valenzuela M. T., Garcia M. J., Mayas M. D., Martinez-Martos J. M. Glutamyl- but not aspartyl- aminopeptidase activity is modified in serum of N-methyl nitrosourea-induced rat mammary tumours. *Anticancer Research*, 2004, **24**, 801–806.
17. Carrera M. del P., Ramirez-Exposito M. J., Garcia M. J., Mayas M. D., Martinez-Martos J. M. Ovarian renin–angiotensin system-regulating aminopeptidases are involved in

progesterone overproduction in rats with mammary tumours induced by *N*-methyl nitrosourea. *Anticancer Research.*, 2009, **29**, 4633-4638.

18. Carrera M. del P., Ramirez-Exposito M. J., Mayas M. D., Garcia M. J., Martinez-Martos J. M. Mammary renin-angiotensin system – regulating aminopeptidase activities are modified in rats with breast cancer. *Tumor biology*, 2010, **31**(6), 583-588.

19. Chuang H.-Y., Jiang J.-K., Yang M.-H., Wang H.-W., Li M.-C., Tsai C.-Y., Jhang Y.-Y., Huang J. C. Aminopeptidase A initiates tumorigenesis and enhances tumor cell stemness via TWIST1 upregulation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(13), 21266-21280.

20. Claperon C., Rozenfeld R., Iturrioz X., Inguibert N., Okada M., Roques B., Maigret B., Llorens-Cortes C. Asp218 participates with Asp213 to bind a Ca²⁺ atom into the S1 subsite of aminopeptidase A: a key element for substrate specificity. *Biochem. J.*, 2008, **416**, 37–46.

21. Couvineau P., de Almeida H., Maigret B., Llorens-Cortes C., Iturrioz X. Involvement of arginine 878 together with Ca²⁺ in mouse aminopeptidase A substrate specificity for N-terminal acidic amino-acid residues. *PLoS One*, 2017, **12**(9), e0184237.

22. Dawson R., Elliot D., Elliot W., Jones K. Biochemists Manual (in Russian). Mir, Moscow, 1991, p 301.

23. De Paepe B., Verstraeten V. L., De Potter C. R., Vakaet L. A., Bullock G. R. Growth stimulatory angiotensin II type 1 receptor is unregulated in breast hyperplasia and *in situ* carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem. Cell Biol.*, 2001, **116**, 247 – 254.

24. Deshayes F., Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol. Metab.*, 2005, **16**, 293–299.

25. Duffy M. J., Evoy D., McDermott E. W. CA 15–3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin. Chim. Acta*, 2010, **411**(23–24), 1869–1874.

26. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*, 2007, **35**(4), 495–516.

27. English D. P., Roque D. M., Santin A. D. HER2 expression beyond breast cancer: therapeutic implications for gynecologic malignancies. *Mol. Diagn. Ther.*, 2013, **17**(2), 85-99.

28. Fisher B., Redmond C. K., Wickerham D. L., Rockette H. E., Brown A., Allegra J., et al. Relation of estrogen and/or progesterone receptor content of breast cancer to patient outcome following adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1983, **3**(4), 355–364.

29. Gorrell, M. D., Park J. E. Fibroblast activation protein α . In: Handbook of proteolytic enzymes (Eds. N. D. Rawlings, G. S. Salvesen), Elsevier Ltd, 2013, 3395-3400.

30. Gottlieb E., Vousden K. H. p53 Regulation of metabolic pathways. In: “Additional Perspectives on The p53 Family” (Eds: Levine A. J. and Lane D. P.), Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2010, **2**, a001040.

31. Goto Y., Hattori A., Ishii Y., Mizutani S., Tsujimoto M. Enzymatic properties of human aminopeptidase A. Regulation of its enzymatic activity by calcium and angiotensin IV. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 23503–23513.

32. Goto Y., Hattori A., Mizutani S., Tsujimoto M. Aspartic acid 221 is critical in the calcium-induced modulation of the enzymatic activity of human aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 37074–37081.

33. Harbeck N., Sotlar K., Wuerstlein R., Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: Today and tomorrow. *Cancer Treatment Reviews*, 2014, **40**, 434-444.

34. Holmgran L, O'Reilly M. S., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.*, 1995, **1**, 149–153.
35. Holmes R. S., Spradling-Reeves K. D., Cox L. A. Mammalian glutamyl aminopeptidase genes (ENPEP) and proteins: comparative studies of a major contributor to arterial hypertension. *J. Data Mining Genomics Proteomics*, 2017, **8**(2), 2 , doi:10.4172/2153-0602.1000211.
36. Hua X., Yu L., Huang X., Liao Z., Xian Q. Expression and role of fibroblast activation protein-alpha in microinvasive breast carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 2011, **6**, 111-117.
37. Ino K., Nagasaka T., Okamoto T., Uehara C., Nakazato H., Nakashima N., Mizutani S. Expression of aminopeptidase A in human gestational choriocarcinoma cell lines and tissues. *Placenta*, 2000, **21**, 63–72.
38. Ino K., Uehara C., Kikkawa F., Kajiyama H., Shibata K., Suzuki T., Khin E. E., Ito M., Takeuchi M., Itakura A., Mizutani S. Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT1 receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 2003, **88**(8), 3973–3982.
39. Ito N., Nomura S., Iwase A., Ito T., Ino K., Nagasaka T., Tsujimoto M., Kobayashi M., Mizutani S. Ultrastructural localization of aminopeptidase A/angiotensinase and placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in chorionic villi of human placenta. *Early Human Development*, 2003, **71**, 29–37.
40. Iturrioz X., Vazeux G., Celerier J., Corvol P., Llorens-Cortes C. Histidine 450 plays a critical role in catalysis and, with Ca²⁺, contributes to the substrate specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry*, 2000, **39**, 3061–3068.
41. Iturrioz X., Rozenfeld R., Michaud A., Corvol P., Llorens-Cortes C. Study of asparagine 353 in aminopeptidase A: characterization of a novel motif (GXMEN) implicated in exopeptidase specificity of monozinc aminopeptidases. *Biochemistry*, 2001, **40**(48), 14440-14448.
42. Jia J., Martin T. A., Ye L., Jiang W. G. FAP- α (Fibroblast activation protein- α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. *BMC Cell Biology*, 2014, **15**, 1-16.
43. Johansen T. L., Kjaer A. Reversible renal impairment induced by treatment with the angiotensin II receptor antagonist candesartan in a patient with bilateral renal artery stenosis. *BMC Nephrol.*, 2001, **2**, 1.
44. Juillerat-Jeanneret L., Lohm S., Hamou M.-F., Pinet F. Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature: evidence for a role of transforming growth factor- β . *Laboratory investigation*, 2000, **80**(6), 973-980.
45. Kahounová Z., Kurfürstová D., Bouchal J., Kharaishvili G., Navrátil J., Remšík J., Šimečková Š., Študent V., Kozubík A., Souček K. The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry A.*, 2018, **93**(9), 941-951.
46. Kakinuma Y., Hama H., Sugiyama F., Yagami K. I., Goto K., Murakami K., Fukamizu A. Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat. Med.*, 1998, **4**, 1078–1080.

47. Kelly T., Huang Y., Simms A. E., Mazur A. Fibroblast Activation Protein-a: a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. In: International review of cell and molecular biology, Academic Press – Elsevier, USA, UK, The Netherlands, 2012, 83-116.
48. Keshaviah A., Dellapasqua S., Rotmensz N., Lindtner J. Crivellari D. et al. CA15-3 and alkaline phosphatase as predictors for breast cancer recurrence: a combined analysis of seven International Breast Cancer Study Group trials. *Annals of Oncology*, 2007, **18**(4), 701–708.
49. Kiziltan, H. S., Bayir A. G., Yucesan G., Eris A. H., Karatoprak I. K., Aydin T., Akcakaya A., Mayadagli A. Medical ozone and radiotherapy in a peritoneal Ehrlich ascites tumor cell model. *Altern. Ther. Health Med.*, 2015, **21**, 24-29.
50. Lalu K., Lampelo S., Nummelin-Kortelainen M., Vanha-Perttula T. Purification and partial characterization of aminopeptidase A from the serum of pregnant and non-pregnant women. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **789**, 324-333.
51. Lavoie J. L., Bianco R. A., Sakai K., Keen H. L., Ryan M. J., Sigmund C. D. Transgenic mice for studies of the renin-angiotensin system in hypertension. *Acta Physiol. Scand.*, 2004, **181**, 571–577.
52. Lawnicka H., Potocka A. M., Juzala A., Fournie-Zaluski M.-C., Pawlikowski M. Angiotensin II and its fragments (angiotensins III and IV) decrease the growth of DU-145 prostate cancer cells in vitro. *Med. Sci. Monit.*, 2004, **10**(11), 410-413.
53. Li T.-H., Yan H.-X. Antitumor- and apoptosis-inducing effects of pomolic acid against SK-MEL-2 human malignant melanoma cells are mediated via inhibition of cell migration and sub-G1 cell cycle arrest. *Molecular Medicine Reports*, 2018, **17**(1), 1035-1040.
54. Liedtke C., Kiesel L. Breast cancer molecular subtypes – Modern therapeutic concepts for targeted therapy of a heterogeneous entity. *Maturitas*, 2012, **73**, 288-294.
55. Lin, Q., Taniuchi I., Kitamura D., Wang J. Y., Kearney J. F., Watanabe T., Cooper M. D. T and B cell development in BP-1/6C3/aminopeptidase A-deficient mice. *J. Immunol.*, 1998, **160**, 4681–4687.
56. Lojda Z., Gossrau R. Study on Aminopeptidase A. *Histochemistry*, 1980, **67**, 267-290.
57. Lojda Z., Gossrau R., Schiebler, T. H. Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1979, 47.
58. Lozanov V., Ivanov I. P., Benkova B., Mitev V. Peptide substrate for caspase-3 with 2-aminoacridone as reporting group. *Amino Acids*, 2009, **36**, 581-586.
59. Marchio S., Lahdenranta J., Schlingemann R. O., Valdembri D., et al. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer cell*, 2004, **5**, 151-162.
60. Martinez J. M., Prieto I., Ramirez M. J., Cueva C., Alba F., Ramirez M. Aminopeptidase activities in breast cancer tissue. *Clinical Chemistry*, 1999, **45**(10), 1797–1802.
61. Mayo S. L., Olafson B. D., Goddard W.A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. *J. Phys. Chem.*, 1990, **94**, 8897-8909.
62. Migaud M., Durieux C., Viereck J., Soroca-Lucas E., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P. The *in vivo* metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. *Peptides*, 1996, **17**, 601-7.
63. Mitsui T., Nomura S., Okada M., Ohno Y., Kobayashi H., Nakashima Y., Murata Y., Takeuchi M., Kuno N., Nagasaka T., O-Wang J., Cooper M. D., Mizutani S. Hypertension and angiotensin II hypersensitivity in aminopeptidase A-deficient mice. *Mol. Med.*, 2003, **9**, 57–62.

64. Mizutani S., Yamada R., Kurauchi O., Ito Y., Narita O., Tomoda Y. Serum aminopeptidase A (AAP) in normal pregnancy and pregnancy complicated by pre-eclampsia. *Arch. Gynecol.*, 1987, **240**, 27–31.
65. Mizutani S., Ishii M., Hattori A., Nomura S., Numaguchi Y., Tsujimoto M., Kobayashi H., Murohara T., Wright J. W. New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension. *Heart Fail. Rev.*, 2008, **13**, 273–284.
66. Morgan C. W., Julien O., Unger E. K., Shah N. M., Wells J. A. Chapter Eight - Turning ON caspases with genetics and small molecules. *Methods in Enzymology*, 2014, **544**, 179-213.
67. Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55–63.
68. Munro M. J., Wickremesekera A. C., Davis P. F., Marsh R., Tanand S. T., Itinteang T. Renin-angiotensin system and cancer: A review. *Integr. Cancer Sci. Therap.*, 2017, **4**(2), 1-6.
69. Nadal J. A., Scicli G. M., Carbin L. A., Scicli A. G. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF- β and PDGF-BB. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2002, **282**, 739-748.
70. Neudeck H., Schuster G., Hildebrandt R., Oney T., Stierner B., Hopp H., Graf R. Histochemical evaluation of placental angiotensinase A in pre-eclampsia: enzyme activity in villous trophoblast indicates an enhanced likelihood of gestational proteinuric hypertension. *Placenta*, 1996, **17**, 155-163.
71. Nogueira E. F., Vargas C. A., Otis M., Gallo-Payet N., Bollag W. B., Rainey W. E. Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 2007, **39**, 365–374.
72. Norsharina I., Maznah I., Mustapha U. I., Nur Hanisah A., Siti F. F., Jhi B. F. Mechanistic basis for protection of differentiated SH-SY5Y cells by oryzanol-rich fraction against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, **14**, 467-490.
73. O-Wang, J., Cooper M. D., Iturrioz X., Llorens-Cortes C. Glutamyl Aminopeptidase. – In: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Ed. N. D. Rawlings, G. Salvesen), 3edn, Academic Press Elsevier, 2013, pp 410-412.
74. Ozaslan M., Karagoz I. D., Kilic I. H., Guldur M. E. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr. J. Biotech.*, 2011, **10**, 2375-2378.
75. Padia S. H., Kemp B. A., Howell N. L., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P., Carey R. M. Conversion of renal angiotensin II to angiotensin III is critical for AT2 receptor-mediated natriuresis in rats. *Hypertension*, 2008, **51**(2), 460-465.
76. Parentes-Vieira JB., Lopes-Costa PV., Pires CG, Santos AR, Pereira-Filho JD, Silva BB. Quantification of angiogenesis in estrogen receptor-positive and negative breast carcinoma. *International Seminars in Surgical Oncology*, 2007, 4-22.
77. Poręba M., Stróżyk A., Salvesen G. S., Drag M. Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, **5**(8), a008680.
78. Porter A. G., Jaenicke R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 1999, **6**, 99-104.
79. Portier B., Gruver A., Huba M., Minca E., Cheah A., Wang Z., Tubbs R. From morphologic to molecular: established and emerging molecular diagnostics for breast carcinoma. *New Biotechnology*, 2012, **29**, 665-681.

80. Ramírez-Expósito M. J., Carrera-González M. del P., Mayas M. D., Duenas B., Martínez-Ferrol J., Martínez-Martos J. M. Neoadjuvant chemotherapy modifies serum angiotensinase activities in women with breast cancer. *Maturitas*, 2012, **72**, 79-83.
81. Ramirez-Montagut T., Blachere N. E., Sviderskaya E. V., Bennett D. C., Rettig W. J., Garin-Chesa P., Houghton A. N. FAP alpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor. *Oncogene*, 2004, **23**, 5435–5446.
82. Reaux A., Fournie-Zaluski M., Llorens-Cortes C. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 2001, **12**, 157-162.
83. Rivera E. S., Andrade N., Martin G., Melito G., Cricco G., Mohamad N., et al. Induction of mammary tumors in rat by intraperitoneal injection of NMU: histopathology and estral cycle influence. *Cancer Lett.*, 1994, **86**, 223–228.
84. Schlingemann R. O., Oosterwijk E., Wesseling P., Rietveld F. J. R., Ruiter D. J. Aminopeptidase A is a constituent of activated pericytes in angiogenesis. *Journal of pathology*, 1996, **179**, 436 – 442.
85. Shannon R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Cryst.*, 1976, **A32**, 751-767.
86. Slawicki S., Mroczko B., Szmitkowski M. Tumor markers of breast cancer. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2004, **58**, 292-300.
87. Slamon D. J., Godolphin W., Jones L. A., Holt J. A., Wong S. G., Keith D. E., et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989, **244**, 707–712.
88. Steven, A. A., Randers L., Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol. Prog.*, 1993, **9**, 671–674.
89. Suganuma T., Ino K., Shibata K., Nomura S., Kajiyama H., Kikkawa F., Tsuruoka N., Mizutani S. Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor–stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Laboratory Investigation*, 2004, **84**, 639–648.
90. Syrjanen K. J., Kosma V. M. Hormone receptor levels related to histological parameters of tumor-host relationships in female breast carcinoma. *J. Surg. Oncol.*, 1982, **21**(1), 49–53.
91. Tahmasebi M., Puddefoot J. R., Inwang E. R., Goode A. W., Carpenter R., Vinson G. P. Transcription of the prorenin gene in normal and diseased breast. *Eur. J. Cancer*, 1998, **34**, 1777 – 1782.
92. Tandon A. K., Clark G. M., Chamness G. C., et al. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N. Eng. J. Med.*, 1990, **322**, 239–331.
93. Troyanovskaya M., Jayaraman G., Song L., Healy D. P. Aminopeptidase A. I. cDNA cloning and expression and localization in rat tissues. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.*, 2000, **278**, 413-424.
94. Touyz R. M., Deng L. Y., He G., Wu X. H., Schiffrin E. L. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J. Hypertens.*, 1999, **17**, 907-916.
95. Touyz R. M. Schiffrin E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.*, 2000, **52**, 639–672.

96. Tsujimoto M., Goto Y., Maruyama M., Hattori A. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail. Rev.*, 2008, **13**(3), 285-291.
97. Ucuzian A. A., Greisler H. P. In vitro models of angiogenesis. *World J. Surg.*, 2007, **31**, 654–663.
98. Vallee B.L., Auld D.S. Short and long spacer sequences and other structural features of zinc binding sites in zinc enzymes. *FEBS Lett.*, 1989, **257**(1), 138-140.
99. Van Nagell J. Jr., Donaldson E. S., Wood E. G., Goldenberg D. M. The clinical significance of carcinoembryonic antigen in the plasma and tumors of patients with gynecologic malignancies. *Cancer*, 1978, **42**(3), 1527–32.
100. Varona A., Blanco L., Lopez J. I., Gil J., Agirregoitia E., Irazusta J., Larrinaga G. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2007, **292**, F780–F788.
101. Vaidyanathan K., Vasudevan D. M. Organ Specific Tumor Markers: What's New? *Indian J Clin Biochem.*, 2012, **27**(2), 110–120.
102. Vazeux G., Iturrioz X., Corvol P., Llorens-Cortes C. A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A. *Biochem. J.*, 1997, **327**, 883–889.
103. Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.*, 2005, **84**, 627–639.
104. Vinson G. P., Barker S., Puddefoot J. R. The renin–angiotensin system in the breast and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 2012, **19**, R1–R19.
105. Wang J., Cooper M.D. Histidine residue in the zinc-binding motif of aminopeptidase A is critical for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**(4), 1222-1226.
106. Weber G. Toward a molecular classification of cancer. *Toxicology*, 2010, **278**, 195–198.
107. Weigelt B., Geyer F., Reis-Filho J. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, 2010, **4**, 192-208.
108. Wesley U. V., Albino A. P., Tiwari S., Houghton A. N. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J. Exp. Med.*, 1999, **190**, 311–322.
109. Wesley U. V., Tiwari S., Houghton A. N. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non-small cell lung carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2004, **109**, 855-866.
110. Wesseling P., Ruiter D. J., Burger P. C. Angiogenesis in brain tumors; pathobiological and clinical aspects. *Journal of Neuro-Oncology*, 1997, **32**(3), 253-265.
111. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (Eds. Tavassoli F. A. and Devilee P.). IARC Press, Lyon, 2003, 9-112.
112. Wingate H., Puskas A., Duong M., Bui T., Richardson D., Liu Y., et al. Low molecular weight cyclin E is specific in breast cancer and is associated with mechanisms of tumor progression. *Cell Cycle*, 2009, **8**(7), 1062–1068.
113. Yang Y., Liu C., Lin Y.L., Lil F. Structural insights into central hypertension regulation by human aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.*, 2013, **288**, 25638–25645.
114. Zini S., Fournie-Zaluski M. C., Chauvel E., Roques B. P., Corvol P., Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1996, **93**(21), 11968-11973.

115. Zini S., Masdehors P., Lenkei Z., Fournie-Zaluski M.-C., Roques B. P., Corvol P., Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A: Distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 1997, **78** (4), 1187–1193.

VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

VII.1. Научни публикации, свързани с дисертацията

1. Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I. Aminopeptidase A in different diseases: a minireview. *Acta Morph. Anthr.*, 2014, 20, 95-100.
2. Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I., Stefanova N., Topouzova-Hristova T. Influence of metal ions on the activity of aminopeptidase A in mouse kidney – a quantitative study. *International scientific on-line journal Science & Technologies* 4(3), 2014, 90-93
3. Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I., Cenova V. Study on the localization of aminopeptidase A in invasive mammary gland carcinoma. *Acta Morphol. Anthropol.* 21, 2015, 94-97
4. Petrova V., Ivanov I., Tasheva D., Dimitrova M. Study on the effect of divalent metal ions on the activity of aminopeptidase A. *Proceedings of the 8th Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products*, November 27-29, 2013, Sofia, 1, 2013, pp. 55-59
5. Petrova V., Tasheva D., Iliev I., Dimitrova M., Ivanov I.. Biological activity of a newly synthesized specific inhibitor of Aminopeptidase A: A preliminary study. *Acta* 2018, 25 (3-4), 80-83.

VII.2. Участия в научни форуми

6. Petrova V., Ivanov I., Tasheva D., Dimitrova M. Study on the effect of divalent metal ions on the activity of aminopeptidase A. Report at the 8th Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, November 27-29, 2013, Sofia.
7. Petrova V., Tasheva D., Iliev I., Dimitrova M., Ivanov I.. Biological activity of a newly synthesized specific inhibitor of Aminopeptidase A: A preliminary study. 7th National Conference with International Participation “Morphological Days”, 8-10 June, 2018, Sofia.
8. Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I., Stefanova N., Topouzova-Hristova T. Influence of metal ions on the activity of aminopeptidase A in mouse kidney – a quantitative study. Poster at the 24th International Scientific Conference, 5-6 June 2014, Stara Zagora
9. Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I., Dimitrova S., Stefanova N., Topouzova-Hristova T. Study on aminopeptidase A activity in normal and tumor mouse fibroblasts. Poster at the 3rd Balkan Scientific Conference on Biology, 2014, May 30 – June 1, Plovdiv, Bulgaria
10. Petrova V., Saynova V., Ivanov I., Dimitrova M. Study on the localization of aminopeptidase A in invasive mammary gland carcinoma. Доклад на VI Национална конференция с международно участие “Морфологични дни”, 6-8 юни 2014 г., Национален антропологичен музей при ИЕМПАМ – БАН, София
11. Pavlova V., Petrova V., Dimitrova M., Ivanov I., Nikolova E. Modulation of the activities of intestinal alkaline phosphatase and lactase by growth factors in organ culture. Доклад на VI Национална конференция с международно участие “Морфологични дни”, 6-8 юни 2014 г., Национален антропологичен музей при ИЕМПАМ – БАН, София

12. Petrova V., Pavlova V., Iliev I., Ivanov I., Tasheva D., Dimitrova M. Study on aminopeptidase A activity in normal mouse mammary gland and in murine in vivo model of Ehrlich carcinoma solid form. Постер на национална конференция за млади учени „Биологически науки за по-добро бъдеще“, Пловдив, 30-31 октомври, 2015.
13. Petrova V., Aleksandrova T., Dimitrova M., Pavlova V., Tasheva D., Iliev I., Mitev V., Ivanov I. Role of the amino group in the structure and design of potential inhibitors of aminopeptidase A. Report at the Tenth workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 17-19 November 2015, Sofia
14. Petrova V., Pavlova V., Iliev I., Lozanov V., Ivanov I., Dimitrova M. Study on the effects of alkaline earth metals on the activity of aminopeptidase A in normal and tumor human mammary gland-derived cells. Report at the Eleventh workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 14-16 December 2016, Sofia
15. Petrova V., Tasheva D., Iliev I., Dimitrova M., Ivanov I. Development of a novel specific inhibitor of aminopeptidase A. Report at the Twelfth workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 27-29 November 2017, Sofia

VII.3. Участия в проекти

16. “Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи за ефективно прилагане на биомедицинските изследвания за подобряване качеството на живот.” – договор BG 051PO001-3.3.06-0048/04.10.2012 г. по ОП „Развитие на човешките ресурси“ Ръководител: проф. Нина Атанасова, дбн.
17. “Изграждане и развитие на млади висококвалифицирани изследователи и преподаватели за иновативни интердисциплинарни изследвания от полза за биомедицината.” Договор BG05M2OP001-2.009 -0019-C01/02.06.2017 г. Оперативна програма „Наука и образование за интелигентен растеж“ 2014-2020 г. Ръководител: проф. Нина Атанасова, дбн.
18. „Синтез, биохимични и цитохимични изследвания на специфични инхибитори за Аминопептидаза А“. Март 2015 – Декември 2015 г. № 29/2015 НИС-СУ. Ръководител – доц. Донка Ташева, доктор – ФХФ на СУ.