

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ,  
ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ  
Вх. № 414  
09.09 от проф. д-р Мариела Константинова Оджакова-Байтошева,  
СОФИЯ

## Рецензия

от проф. д-р Мариела Константинова Оджакова-Байтошева,  
СУ „Св.Климент Охридски“  
относно дисертационен труд за присъждане на ОНС „доктор“  
по професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност  
„Морфология“

**Автор:** Весела Симеонова Петрова, редовен докторант, ИЕМПАМ, БАН

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

**Научен ръководител:** проф. Маша Димитрова, дб

**Научни консултанти:** доц. Ивайло Иванови, дб

доц. д-р Веселина Ценова, дм

Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИЕМПАМ и отговаря на критериите за придобиване на ОНС „доктор“. Според справката за проведената образователна и научна програма и получените кредити според изискванията на правилника за дейността на Центъра за обучение на БАН, Весела Петрова има общо 666 точки по кредитната система.

Весела Петрова завършва Факултет по ветеринарна медицина към ЛГУ през 2012 г. с придобита професионална квалификация ветеринарен лекар. Работила е като ветеринарен лекар (2014-2016 – ветеринарна клиника „Vas-Vet“), монитор на клинични проучвания (2016-2017 - Медитрайл Интернешънъл) и от 2017 до сега в Чилтърн Интернешънъл. През 2013 г. е зачислена за редовен докторант към секция „Експериментална морфология“, ИЕМПАМ-БАН. Със заповед РД-15-10 от 24.01.2018 е отчислена с право на защита.

През последните години голяма част изследвания се фокусират върху молекулярната биология на рака на гърдата. При това заболяване клетъчната микросреда и вродените характеристики на пациента повлияват патофизиологията, терапията и резултатите от лечението. Така персонализираната медицина придобива все по-голямо значение за клиничната практика. Поради това нараства необходимостта от идентифициране и валидиране на нови молекулни маркери с диагностично и прогностично значение.

Дисертационният труд е посветен на изследване ролята на аминокпептидаза А при рак на гърдата с оглед на потенциалното ѝ включване като спомагателен биологичен маркер за определяне на инвазивния потенциал на туморните клетки и за прогностични цели. Аминопептидазата А (глутамиламинопептидаза, АРА, ЕС 3.4.11.7) е мембранносвързана металопептидаза от фамилия М1. Функцията ѝ е най-добре охарактеризирана при контрола на кръвното налягане като компонент на централната и тъкан-специфичните ренин-ангиотензинови системи (RAS). Ролята ѝ при туморните заболявания обаче е сравнително слабо проучена за разлика от тази на други металопептидази. 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 да функционира като туморен промотор. От друга страна обаче, при ангиотензин II (AngII)-зависимите



тумори (каквото е и ракът на млечната жлеза), АРА може да потиска туморния растеж чрез разграждане на AngII до AngIII и да действа като туморен супресор. С оглед изясняване на функцията и значението на АРА е необходимо разработване на подобрен „инструментариум“ за изследване на локализацията и активността на ензима, което може да се осъществи чрез въвеждане на нови специфични субстрати и инхибитори.

Дисертационният труд следва общо приетия за този вид научни трудове модел, като отлично впечатление прави обединяването на резултати и обсъждане в самостоятелна глава. Написан е на 77 страници и съдържа 36 фигури и 3 таблици. Подредбата на материала е балансирана и дава превес на собствените резултати и интерпретации. Докторантката е запозната добре с пробема. Цитирани са 115 литературни източника. Тъй като областта на дисертационния труд е много актуална и усилено се разработва, би било добре да се включат повече научни публикации от последните години. По-голямата част от цитиранията обхващат период от преди 10 години. Независимо от това, литературният обзор е изчерпателен, последователен и целенасочен, написан стегнато и с професионализъм. Разгледани са видовете карциноми на гърдата при човек, както и използваните генетични маркери. Основният акцент е върху структурата, каталитичния механизъм и функциите на АРА в норма и патология. В резултат от прегледа на литературните данни докторантката е направила важни изводи, от които логично следват целта и задачите на изследването.

Целта на дисертацията е в експериментални моделни системи да се проучи потенциалната маркерна роля на аминокептидаза А при карцином на млечна жлеза като се използват предимствата на флуоресцентните ензимни анализи. За постигането ѝ са поставени 7 конкретни задачи. Те включват разработването на методи за цито- и хистохимично локализиране и определяне на активността на АРА на базата на новосинтезирани субстрати и специфичен инхибитор на ензима, и прилагането им в нормални и туморни клетки с различна степен на инвазивност. Задачите са добре дефинирани и изпълнението им би довело до валидиране на АРА като потенциален маркер с диагностична и прогностична стойност при рак на гърдата.

Подходите и методите са избрани целенасочено според поставените задачи. Използвайки молекулно моделиране с програма DS ViewerPro 6.0 е направена оптимизация на пространственото положение на ензим-субстратните комплекси на АРА с  $\alpha$ -глутамилхидразида-N-хексил-1,8-нафталимид (Glu-HHNI) и  $\alpha$ -глутамил-2-акридониламид (Glu-AMAC), както и на ензим-инхибиторния комплекс на АРА с  $\alpha$ -глутамил хидроксамат (GH). Новосинтезираните субстрати и инхибитор са използвани за определяне на различни кинетични ензимни параметри ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ,  $V_{max}/K_m$ ) посредством спектрофлуориметрия в хомогенати от клетъчни линии като е отчетено и влиянието на  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  и  $Ba^{2+}$  йони. Локализирането на АРА е осъществено чрез ензимна хисто и цитохимия. Използвани са различни моделни системи: модел на карцином на млечна жлеза при мишки – асцитна и солидна форма на тумор на Ерлих, нормални и туморни фибробласти от мишка (линията BALB/3T3 clone A31 и линия Meth A sarcoma), 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). Клетъчните линии са култивирани *in vitro* и е



определяна клетъчна жизненост, пролиферация, въздействие на ензимния инхибитор върху пролиферативната активност, ниво на апоптоза.

Считам, че докторантката притежава много добра теоретична и методична подготовка.

Разделът „Резултати и дискусия“ съдържа 8 глави подредени в логичен ред.

Проучванията върху участието на АРА в механизмите на туморогенезата и туморната прогресия изисква прилагане на високо специфични и чувствителни методи за визуализация на ензима *in situ*. За тази цел е получен флуорогенен субстрат за цито- и хистохимично локализиране на АРА -  $\alpha$ -глутамилхидразидо-N-хексил-1,8-нафталимид (GluHNHI). За изследване на ензимната активност на АРА досега са използвани синтетични субстрати, които са амиди на глутамовата киселина с 4-нитроанилин, 2-нафтиламин и 7-амино-4-метилкумарин. Новосинтезираният хистохимичен субстрат 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. Това е причината предварително да се моделира ензим-субстратния комплекс, като е използвана кристалната структура на човешка аминокиселина А в комплекс с глутамат (Protein Data Bank code 4KXD) с помощта на програмата DS ViewerPro 6.0 и силово поле на Драйдинг. Ензимът хидролизира хидразидната връзка при  $\alpha$  карбоксилната група на субстрата, при което се отделя N-хексил-нафталимид, който взаимодейства бързо с присъстващ в средата ароматен алдеhid – пиперонал и се получава неразтворим флуоресцентен продукт – хидразон, отлагащ се на местата с ензимна активност. Субстратът е тестиран в криостатни срези и препарати от култивирани клетки за локализиране на активността на АРА като са използвани различни начини за предварителна обработка на тъканите. Изследвано е и влиянието на рН, различни концентрации на субстрата и спомагателния реактив (пиперонал) и на активиращите калциеви йони, както и времето на инкубация. Намерени са най-подходящите условия за провеждане на хистохимичната и цитохимична локализация на АРА.

Субстратът Glu-HNHI 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 чрез светлинна и 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.

За целите на настоящия труд е синтезиран и флуоресцентен субстрат  $\alpha$ -глутамил-2-акридониламид (Glu-AMAC), който дава възможност за реализирането на подход за измерване на ензимната активност, базиран на понижаването на флуоресценцията в резултат на изчерпването на субстрата. 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. Определени са кинетичните константи на Glu-AMAC  $V_{max}$  и  $K_m$  на база уравнението на Михаелис и Ментен чрез нелинеен регресионен анализ.

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-АМАС има по-високо сродство към ензима от другите субстрати; Glu-АМАС има висок квантов добив, което позволява да се измерват и ниски активности на АРА.

Специфичните инхибитори на АРА са потенциални антихипертензивни средства и потенциални антитуморни агенти за потискане на васкуларизацията при солидни тумори. До сега няма предложен инхибитор за АРА от групата на хидроксаматите, въпреки, че те са известни инхибитори на металопротеинази. Отчитайки специфичността на ензима, такъв потенциален инхибитор е  $\alpha$ -L-глутамил-N-хидроксиамид (GH). Поради това е моделиран ензим-инхибиторния комплекс като е използвана кристалната структура на човешка аминоксипептидаза А в комплекс с глутамат. Определена е константата на полу-инхибиране  $IC_{50}$  за GH на АРА и инхибиторната константа  $K_i$ . Определен е типът на инхибиране на АРА от GH като смесен конкурентен – неконкурентен.

При всички следващи експерименти за изследване на маркерната роля на АРА при рак на млечна жлеза са използвани новосинтезираните субстрати и инхибитор

Като модел за изследване ролята на АРА е използвана асцитна и солидна форма на карцином на Ерлих. Активността на АРА е изследвана с използване на флуорогенния субстрат GluHHNI 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). Получените резултати съответстват на хистохимичните данни 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 заключение е 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.

Определени са константата на Михаелис (KM) и константата на ефективност ( $V_{max}/KM$ ) на ензима спрямо субстрата Glu-АМАС при активиране с различни йони на алкалоземни метали. Изследването с различни йони може да даде представа за потенциални изменения в структурата на  $Ca^{2+}$ -свързващия център на ензима при патологични състояния. При млечна жлеза на здрави мишки сродството на ензима със субстрата намалява в реда  $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+}$ . Проведените кинетични изследвания показват, че както сродството на АРА към субстрата Glu-АМАС, така и ефективността на хидролиза на този субстрат зависят от радиуса на активирания йон. Колкото по-голям е йонният 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.

Тъй като фибробластите имат решаваща роля при развитието на солидните тумори е 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. 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. При активиране с  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 резултатът при активиране със  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$ , където се наблюдава силна ензимна активност само в туморните фибробласти. Това отново показва, че  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  би показало наличие на туморни фибробласти.

За установяване на потенциалната роля на АРА като маркер при човешки тумори на гърдата, изследванията са проведени в 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. Отново е показана ясно изразена тенденция за намаляване на активността на ензима с нарастване на инвазивния потенциал на клетките. Тези резултати са в унисон с полученото при модела на тумора на Ерлих при мишки и демонстрират ползите от прилагането на този модел за изследване функциите на отделните компоненти на тъканните ренин-ангиотензинови системи (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  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  йони показва възможност за определяне на пролиферативния потенциал на туморните клетки на криостатен срез по увеличаването на активността на АРА в присъствие на тези йони. Получените количествени данни за кинетичните параметри за активността на АРА в зависимост от използваните субстрати (Glu-pNA, Glu-AMAC, Glu-HHNI) и влиянието на алкалоземните метали се различават в зависимост от моделната система. Поради множеството отчетени показатели и разнопосочност в отнасянията, би било добре резултатите да се представят в обобщен табличен вид сравнявайки всичките условия и параметри. Това би улеснило значително разбирането на установените различия и тенденции. Докторантката е успяла сравнявайки множеството данни логично да открие определени заключения: АРА в трите клетъчни линии осъществява по-ефективен катализ в присъствие на бариери йони; като ефективността на ензима към GluAMAC нараства с увеличаване на пролиферативната активност;  $\text{Ca}^{2+}$ -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 могат да се дължат на мутации в гена, кодиращ ензима;

Резултатите при човешките клетъчни линии 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  $\text{Ba}^{2+}$  и най-слабо от  $\text{Ca}^{2+}$ , докато при човешкия ензим е обратното, което предполага наличие на съществени разлики в калций-свързващия мотив.



Изследванията за въздействието на специфичния инхибитор на ензима GH върху преживяемостта, пролиферативната активност и апоптотичния потенциал на клетките от линията MCF-10A показват съществено нарастване на тяхната пролиферативна активност и потискане на експресията на фибробласт активирация протеин (FAP), т.е. техният фенотип се променя и се доближава до този на туморните клетки от карцином на млечна жлеза. Тези резултати дават основание да се допусне, че понижената активност на АРА при рак на гърдата не е страничен ефект, а напротив – тя е част от туморния фенотип на клетките

Изследвайки локализацията и активността на АРА в криостатни срези от оперативни биопсии при тумори на млечна жлеза е показано, че в туморни образувания на млечната жлеза при човека, в изменените секреторни клетки на млечните каналчета липсва АРА, поне при инфилтриращ дуктален/дуктолобуларен карцином. Тези данни дават основание да бъдат продължени изследванията на маркерната роля на ензима в оперативни биопсии от рак на млечна жлеза.

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*.

Въз основа на получените резултати и тяхното обсъждане са направени 10 извода. Бих препоръчала тяхното преработване, тъй като някои от тях са приноси (изв. 1,7), Не съм съгласна с едно от заключенията в извод 6 и твърдението на стр. 66: „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 потиснатата синтеза и експресия“. За доказване промяна в експресията са необходими съвсем друг тип изследвания, за които в дисертацията няма данни и не са обект на настоящето изследване.

Научните приноси на дисертационния труд са групирани като приноси с оригинален характер и принос с потвърдителен характер. 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-HHNI; Флуоресцентен метод за определяне на активността и кинетичните параметри на АРА със субстрат - Glu-AMAC; Специфичен инхибитор на АРА - GH. Показано е, че експерименталният модел на тумор на Ерлих при мишки е по 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. Показано е, че при карциноми на млечна жлеза се променя структурата на  $Ca^{2+}$  свързващия център и активния център на АРА, което може да се дължи на мутации в гена, кодиращ ензима или на епигенетични промени. При човек тези изменения водят до повишаване на каталитичната ефективност на ензима. 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. 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.



Приемам формулировките на приносите и смятам, че те правилно интерпретират получените резултати.

Авторефератът е изготвен по модела, по който е изработена дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните моменти от всички раздели (без литературния обзор) и отразява коректно резултатите, техния анализ и основните изводи.

По темата на дисертацията са публикувани 5 научни публикации, от които три в списание Acta Morph. Anthr, един доклад в пълен текст в тематичен сборник и един доклад в пълен текст от международно научно мероприятие у нас. Във всичките Весела Петрова е първи автор. Резултати са докладвани и на 15 национални научни форуми. Не са отбелязани цитирания. Изследванията включени в дисертационния труд са финансирани от три научни и образователни проекти.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Дисертацията е написана ясно и стегнато. Направени са много експериментални анализи, а резултатите са оформени отлично. Получени са интересни резултати, които са предпоставка за бъдещи разработки. Изработването и оформянето на дисертационния труд, включващо представянето на резултатите, тяхното дискутиране и илюстративният материал ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Весела Петрова е придобила теоретични знания и практически умения напълно съответстващи на третата степен на обучение.

Въз основа на гореизложеното, считам, че настоящият труд отговаря на изискванията на Правилника за развитие на академичния състав и покрива критериите за придобиване на ОНС „доктор“ на ИЕМПАМ,БАН. Оценявам го положително и препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди образователната и научна степен “Доктор” на Весела Петрова. по професионално направление 4.3 „Биологически науки“, научна специалност „Морфология“

06.09. 2019 г.

Изготвил рецензията:  ....

Проф.д-р Мариела Оджаква

\* заличен подпис - лични данни – чл. 2, ал. 1 ЗЗЛД (Закон за защита на личните данни).