

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ	
И-Т ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ И АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ	
Вх. №	420
	11.09 2019 г.
СОФИЯ	

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Нина Недева Атанасова, дбн, назначена със заповед на Директора на ИЕМПАМ
№ РД -15-70 от 17.07.2019 г.

Относно: дисертационен труд за придобиване на ОНС „доктор“ по специалност „Морфология“ (01.06.26), Професионално направление 4.3 „Биологически науки“

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

Автор: Весела Симеонова Петрова

Научен ръководител: проф. Машенка Димитрова, доктор

Научни консултанти: доц. Ивайло Иванов, доктор

доц. д-р Веселина Ценова-Съйнова, доктор

Весела Симеонова Петрова е родена на 16.08.1987 г. в гр. София. Пред 2012 г. завършва ветеринарна медицина във Факултета по ветеринарна медицина към Лесотехническият университет в София. Постъпва като редовен докторант на 01.01.2013 г. в ИЕМПАМ. Прекъсва докторантурата поради отпуск по майчинство от 01.05. 2015 г. за срок от две години. Отчислена е с право на защита считано от 01.01.2018 г. Дисертантката е покрила изискуемия брой кредити според правилника на Центъра за обучение при БАН. При минимум 250 точки, тя е получила 666 точки. Владее отлично английски език. Била е участник в Целевата група в два проекта финансирани от Оперативните програми за развитие на млади учени, докторанти и пост-докторанти, финансирани от МОН и Европейския съюз чрез Европейските структурни и инвестиционни фондове.

Представеният за мнение дисертационен труд е написан на 88 страници и съдържа стандартните раздели, правилно разпределени в обема на дисертацията – Увод (2 стр.), Литературен обзор (24 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (12 стр.), Резултати и дискусия (32 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр) и Литература.

Настоящият труд е посветен на ролята на ензима аминоксептидазата А (АРА) 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. Тематиката е изключително актуална, с подчертано клинично значение, имайки предвид, че според WHO, рактът на гърдата е едно от най-често срещаните онкологични заболявания при жените и е сред водещите причини за смъртност.

В литературния обзор са разгледани накратко основните видове рак на гърдата и използваните при диагностиката им биологични маркери. По-голямо внимание е отделено на ензима аминопептидаза А, обект на дисертационната разработка, като са представени структурата на ензимната молекула и принципа на каталитично действие, локализацията в органи на бозайници и човек, основни субстрати, функции и участие на ензима в етиогенезата на онкологични заболявания с акцент върху за ролята му при карциноми на млечна жлеза, известното до момента. Използвани са общо 115 литературни източника, като повече от $\frac{1}{4}$ от тях са от последните 10 години. Прави впечатление стегнатия стил с конкретна насоченост и критичен анализ, по отношение на изследваната тема. В края на литературния обзор са направени 5 извода, които убедително мотивират целта и седемте задачи на изследването, свързани с проучване на локализацията и ролята на АРА като биомаркер за диагностика и прогноза на рака на гърдата. Те се основават на синтеза на нови субстрати и инхибитор на ензима, което предопределя иновативността на дисертационната разработка и получаването на оригинални приноси.

В раздела „Материали и методи“ са описани подробно проведените експерименти. Предимството на методологичния подход е неговата интердисциплинарност с умело съчетание на молекулен дизайн и синтез на химични съединения с клетъчна биология и биохимия. Приложени са широк спектър от класически и съвременни методи на хистологията, цитологията и биохимията като различни видове оцветявания, ензимна цито- и хистохимия, клетъчно култивиране и цитологични изследвания, кинетични ензимни анализи, включващи работа с най-съвременен софтуер, както и оригинално прилагане на методите на молекулно моделиране.

Разделът „Резултати и дискусия“ е най-голям по обем и е илюстриран с 36 фигури – микроскопски фотографии, графични резултати от ензимни анализи, както и молекулни модели. Цялата документацията по дисертацията е с отлично качество.

Преди започване на детайлното изследване, авторката е намерила най-подходящите условия за провеждане на хистохимичната и цитохимична локализация на АРА (фиксация за ензимната цитохимия или директно замразяване за хистохимията; различни видове буферни разтвори с оптималното за ензима рН 7.4; различни концентрации на субстрата, и на активиращите калциеви йони, както и времето на инкубация), което неминуемо гарантира получаване на достоверни резултати.

Проведеното изследване е основано на новосинтезирани, тествани от авторката субстрати за хистохимично, цитохимично и биохимично проучване на АРА, които имат редица предимства пред досега използваните съединения. Използван е и нов специфичен инхибитор на ензима и новосинтезиран хромогенен биохимичен субстрат за фибробласт активиращия протеин α , необходими за изясняване ролята на АРА в неопластичната

трансформация. Може да се каже, че съществен оригинален принос на дисертационния труд е именно въвеждането на тези съединения, които дават по-точни и достоверни резултати и придават интердисциплинарен характер на работата. Например, флуорогенният хистохимичен субстрат за визуализиране на АРА - Glu-HHNI позволява визуализацията и измерване на ензимната активност да става чрез светлинна и чрез флуоресцентна микроскопия с получаване на ясни и трайни изображения. Аналогично, флуоресцентният субстрат α -глутамил-2-акридониламид (Glu-AMAC) за биохимично изследване на АРА позволява прецизно количествено определяне на степента на ензимна хидролиза/активност.

За изследването на маркерната роля на АРА при различните видове тумори на млечната жлеза е необходим и специфичен инхибитор, чието потискане на ензима е концентрационно-зависимо. Това мотивира моделирането и синтезата на α -L-глутамил-N-хидроксиамид (GH) от авторите с използване на кристалната структура на човешка аминопептидаза А.

Държа да отбележа, че специфичността на субстратите Glu-HHNI и Glu-AMAC и на инхибитора GH са доказани от дисертантката и са използвани в изследванията ѝ върху маркерната роля на АРА при рак на млечна жлеза.

Комплексният и детайлизиран подход за разработване на дисертационната теза се демонстрира със съчетание на ин vivo и ин vitro опитни постановки с използване на експериментален/животински и клиничен/човешки материал, като: миши модел на рак на гърдата, а именно тумора на Ерлих (асцитна и солидна форма); клетъчни линии от миши нормални и туморни фибробласти; три човешки клетъчни линии (една нормална и две туморни от рак на гърдата с различен метастатичен потенциал) и оперативни биопсии от тумори на млечна жлеза при човек.

Не може да не се отбележи включването на оригинален подход за оценка на възможни изменения в структурата и функционирането на АРА в туморните клетки, какъвто е прилагането на различни активатори на ензима – йони на алкалоземни метали (калций, барий, стронций). Този подход е приложен при ин vivo туморния модел и при туморните клетъчни линии. Предложена е възможност за оценка на инвазивния потенциал на туморните клетки *in situ* в зависимост от отнасянето им към активиране на АРА с различните двувалентни йони.

Моделът на тумора на Ерлих при мишки е близък до туморите на гърдата при човека по отношение измененията в активността на АРА и според авторката той е подходящ от използваните досега модели, с което твърдение съм съгласна. Съгласно получените резултати, активността на АРА е по-ниска в по-бързо делящите се клетки от

асцитната форма (по-агресивен от солидната), което се потвърждава и от биохимичния анализ на активността на ензима в хомогенати от двете форми на тумора.

Имайки предвид, че фибробластите имат решаваща роля при развитието на солидните тумори, дисертантката е провела цитохимично изследване на активността на АРА в туморни фибробласти от фибросарком при мишка. Получените данни предоставят възможност за експериментално разграничаване на нормални от туморни фибробласти в модели на онкологични заболявания при мишки, като при доказване на АРА се използват различни активиращи йони. Така например, нарастването на активността на ензима (за която са необходими Ca^{2+} йони) в присъствие на Sr^{2+} и Ba^{2+} би показало наличие на туморни фибробласти.

Маркерната роля на АРА при човешки тумори на гърдата, е изследвана при 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, като последната е получена от най-агресивния тип рак на млечна жлеза – тройно негативен. Активността на АРА намалява диференциално при прилагане на активаторните йони на алкалоземните метали, в съответствие с нарастване на метастатичния потенциал на тумора. Тези резултати са в унисон с получените данни при модел на тумора на Ерлих.

Експериментите с йоните-активатори на АРА показват едно потенциално приложение 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 който да е от 3-те йона би показало висок потенциал за прогресиране на тумора и лоша прогноза.

Въз основа на експериментите с прилагане на йони-активатори на АРА, авторката изказва предположение, че Ca^{2+} -свързващият център на АРА при туморните клетки има различна структура от този при нормалните, което може да е причинено от мутации в гена, кодиращ ензима. Активността на АРА намалява в туморните клетки паралелно с нарастване на агресивността на тумора, което се дължи на потиснат синтез и експресия на ензима.

Също така, използвана е много добре обмислена моделна система за изследване ефектите на специфичен инхибитор на АРА (α -L-глутамил-N-хидроксиамид - GH) върху преживяемостта, пролиферативната активност (брой митотични фигури) и апоптотичния потенциал (активност на ензима каспаза) на клетки от туморни и нормални линии. За изследване участиета на АРА в туморогенезата е измерена ензимната активността на фибробласт активиращия протеин α (FAP α) с прилагане на синтезиран хромогенен биохимичен субстрат β -Ala-D-Ala-Pro-pNA. Третирането на нормалните клетки от млечна

жлеза с инхибитор на АРА води до съществено нарастване на тяхната пролиферативна активност и потискане на експресията на $\text{FAP } \alpha$, т.е. техният фенотип се променя и се доближава до този на туморните клетки от карцином на млечна жлеза. Това дава основание на авторката да допусне, че понижената активност на АРА при рак на гърдата не е страничен ефект, а напротив – тя е част от туморния фенотип на клетките. Държа да отбележа, че тази част от проучванията е извършена след отчисляването на докторантката с право на защита, което подчертава стремежа към осъвършенстване на разработката.

Проведени са и начални изследвания върху криостатни срези от оперативни биопсии, което позволява да се провери съответствието между изследванията *in vitro* и реалната ситуация при пациенти с рак на гърдата. Отсъствието на ензимна активност в туморните клетки е в унисон с получените резултати за туморните клетъчни линии. Те 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 продължени изследванията на маркерната роля на ензима в оперативни биопсии от рак на млечна жлеза, с което авторката демонстрира перспективи за бъдещи разработки след защита на дисертационния труд.

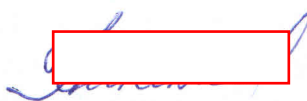
Въз основа на получените резултати са направени изводи, които са обобщени накратко, както следва „Съгласно получените резултати, потискането на синтеза и експресията на АРА при карцином на млечна жлеза е свързано с преминаването на клетките към туморен фенотип. Драстичното намаляване на активността на 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*.“ Изведени са 5 оригинални приноси и един потвърдителен, с което съм напълно съгласна.

По темата на дисертацията се отпечатани общо 5 статии – едната е доклад в пълен текст от международен научен форум и 4 в български списания, 3 от които са реферирани и индексирани във Web of Knowledge. Изнесени са 10 доклада на научни форуми – два в чуждестранни и 8 в национални с международно участие.

В заключение, обемът и качеството на проведеното комплексно и подробно морфо-функционално изследване върху ролята на АРА при туморогенезата на млечната жлеза, определят дисертационния труд на Весела Петрова, като завършена и прецизно осъществена научна разработка с ясно изразен фундаментален характер, с иновативност и клинично значение. Оставам силно впечатлена от високото научно ниво и професионализъм на изпълнение на дисертационния труд, както и от изискания и стегнат научен стил при неговото написване и оформяне. Представените данни от Весела Петрова

несъмнено убеждават в маркерния потенциал на протеазата АРА при карцином на млечна жлеза. Обемът и качеството на труда и успешното изпълнение на образователната и научна програма напълно покриват критериите на ЗРАС на РБ и съответните правилници за неговото приложение. С придобитите знания и умения Весела Петрова е изграден учен, способен за самостоятелна научно-изследователска работа. Във връзка с горе-изложеното, с висока убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на тема „Проучвания върху маркерната роля на аминоксептидазата А при рак на млечна жлеза чрез нови субстрати и инхибитори ” и препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват „ЗА” присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Весела Петрова.

05.08.2019 г.


/проф. Н. Атанасова, дбн/

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