



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**Институт по биология и имунология на размножаването
„Акад. Кирил Братанов”**

Десислава Петрова Анкова

**Клетъчно-специфична локализация и генна експресия на
Mas1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R
при жени с тумор на млечната жлеза**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен
„Доктор”

научна специалност ш. 01.06.17 „Физиология на животните и човека”
професионално направление ш.4.3. – „Биологически науки”

София, 2023 г

Дисертацията е обсъдена и допусната до защита на разширено заседание на секция „Имунобиология на размножаването“ на ИБИР-БАН, състояло се на 6 юли 2023 г.

Дисертацията съдържа 106 стр., в които 18 фигури, 3 таблици и литература, включваща 255 заглавия.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 27.09.2023, от..... часа в заседателната зала на ИБИР-БАН, гр. София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред **Научно жури в състав:**

Проф. Анна Толева – Тракийски университет, гр. Стара Загора
Проф. Татяна Влайкова - Тракийски университет, гр. Стара Загора
Проф. д-р Юлиан Ананиев - Тракийски университет, гр. Стара Загора
Проф. д-р Цана Бошнакова - Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ Токуда
Доц. Десислава Абаджиева – ИБИР-БАН

Резервни членове:

Доц. Петя Маркова, Югозападен университет
Доц. Милена Мурджева – ИБИР-БАН

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР - БАН, гр. София, бул. „Цариградско шосе“ 73, както и на интернет страницата на ИБИР - БАН /<https://ibir.bas.bg/>.

Забележка: номерата на фигурите и таблиците не съответстват на номерата в дисертационния труд

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение.....	5
II. Цели задачи.....	8
III. Материали и методи.....	9
IV. Резултати и дискусия.....	10
1.Класификация на изследваните тумори от млечна жлеза.....	10
2. Експресия на CD10 в туморна и околна нетуморна тъкан.....	11
3.Експресия на Mas1 рецептор в туморна и околна нетуморна тъкан.....	14
4. Експресия на ACE и ACE2 в туморна и околна нетуморна тъка.....	18
5. Експресия на KISS1 и KISS1R в туморна и околна нетуморна тъкан.....	25
V. Заключение.....	31
VI. Изводи.....	32

Използвани съкращения :

- СЗО** – Световна здравна организация
- EMT** – епително-мезенхимна трансформация
- VEGF** - васкуларен ендотелен растежен фактор
- RAS** - ренин-ангиотензинова система
- ACE** - ангиотензин-конвертиращ ензим
- ACE2** – ангиотензин-конвертиращ ензим 2
- AGT** - ангиотензиноген
- ANG I** - ангиотензин I
- ANG II** - ангиотензин II
- ANG-(1–7)** – ангиотензин (1–7)
- Mas1** - Mas1 рецептор
- AT1** – ангиотензин рецептор 1
- AT2** - ангиотензин рецептор 2
- MMP – 9** – матриксна металопротеиназа 9

I. ВЪВЕДЕНИЕ

От глобална гледна точка, въздействието на заболяванията на млечната жлеза в съвременното общество е основен здравен, епидемиологичен, социален и чисто човешки проблем, който продължава да нараства ежегодно. Тези заболявания се характеризират с висока честота и голяма хетерогенност и могат да оказват съществено влияние върху качеството на живота на жените. По данни на СЗО карциномът на гърдата е най-честият злокачествен тумор в развитите страни и е на второ място по смъртност от онкологични заболявания. Ракът на млечната жлеза се развива при една от всеки осем американки, една от десет западноевропейски и една от двадесет и две българки. Ранното откриване и диагностициране на рака на гърдата може значително да повиши шансовете за преодоляване на това заболяване, както и да повиши преживяемостта на пациентите. Това може да се постигне с откриването на точни биологични маркери за ранна детекция и разработването на адекватни лекарствени препарати.

Изследването на ренин-ангиотензиновата система (RAS) през последните години се е увеличило драстично, тъй като се смята, че експресията и активирането на компонентите на RAS, оказват влияние върху злокачественото заболяване и също така се прогнозира, че инхибиторите на ренин-ангиотензиновата система, които в момента се използват за лечение на хипертония и сърдечно-съдови заболявания, могат да намерят приложение при ракови терапии. Известно е, че RAS контролира тонуса на кръвоносните съдове, водно-солевата обмяна и растежа на клетките. Състои главно от ренин, AGT, ANG I, ACE, ANG II, AT1R и AT2R, често наричан класически път на RAS. Алтернативният път се състои главно от ANG-(1-7), Mas1 и ACE2. При класическия път на RAS, циркулиращият ренин, получен от бъбреците, разцепва ангиотензиноген, получен от черния дроб, за да образува ANG I, който се превръща от ACE в белите дробове до биологично активния ANG II, който е мощен вазоконстриктор. Алтернативно, ACE2, разцепва една аминокиселина от ANG I или ANG II, намалявайки нивата на ANG II и увеличавайки метаболита ANG-(1-7), който има вазодилататорни свойства.

ANG-(1-7) също се образува от ANG I след разцепване от други пептидази, включително неприлизин.

Ренин-ангиотензиновата система (RAS) е хормонална система, която е отговорна за хемостазата на кръвното налягане и електролитния баланс. Тя е замесена в отличителните белези на рака, тъй като се експресира локално в почти всички тъкани на тялото. Дисрегулацията на локалната RAS допринася за ракови метастази, адхезия, инвазия, ангиогенеза, пролиферация и ЕМТ.

Проучвания съобщават, че компонентите на RAS са локално експресирани в гръдната тъкан и по този начин могат да играят роля в патологията на рака на гърдата. В нормалната тъкан на гърдата активността на RAS разчита главно на алтернативния път (ACE2/ ANG-(1-7) /Mas1), докато в раковата тъкан на гърдата преобладава предимно класическият път (ACE/ANG II/AT1R).

Противораковият ефект на ANG-(1-7) чрез Mas1 е доказан от различни проучвания, при които ANG-(1-7) е в състояние да инхибира фиброзата, да намали теглото и обема на тумора, да възстанови епително-мезенхимния преход, както и да възпрепятства ангиогенезата и метастазите индуцирани от ANG II чрез инхибиране на експресията на VEGF и MMP-9. По-специално, наличието на ANG-(1-7) при рак на гърдата подобрява ефекта на ANG II, но експресиите на ANG-(1-7) и Mas1 са ниски при рак на гърдата и продължават да намаляват с прогресията на рака. Високата експресия на ACE намалява общата преживяемост при пациенти с рак на гърдата, докато високата експресия на ACE2 подобрява раковата прогноза и е свързана с нисък метастатичен потенциал на рак на гърдата. По този начин балансът между ACE и ACE2 е важен фактор, контролиращ нивата на ANG II и ANG-(1-7).

Голям интерес сред научните среди през последните години представлява сигналната система KISS1/KISS1R. Основните физиологични роли на тази сигнална система са добре проучени и са свързани с регулирането на гонадотропин-освобождаващ хормон, като по този начин действа като основен регулатор на невроендокринната репродуктивна ос, регулира негативно миграцията и инвазията на трофобласта, действайки като основен регулатор на плацентацията и развитието на плода. В по-малко проучени роли сигналната система KISS1/KISS1R също е предложена като регулатор на секрецията на инсулин, сърдечно-съдовата функция и развитието на бъбреците. По нататъшни проучвания разкриват неговата прогностична и потенциална терапевтична стойност при рака. Установено е, че KISS1/KISS1R функционира

като метастазен супресор при много видове рак, включително меланом, рак на яйчника, простатата, стомаха, панкреаса, пикочния мехур, езофагеалния и белодробния рак, но други изследвания показват, че KISS1/KISS1R сигнализирането стимулира туморогенезата при хепатоцелуларен и рак на гърдата.

Въпреки че, генът за KISS1 обикновено се класифицира като ген за потискане на метастази и намаляването на експресията на KISS1 и/или KISS1R корелира с лошата прогноза за пациентите при рак гърдата, още едно проучване показва, че свръхекспресията на KISS1 и KISS1R корелира с прогресията на тумора на гърдата и лошата прогноза за пациента. Освен това е установено, че експресията на KISS1 и KISS1R mRNA е повишена при ракови в сравнение с нормалната тъкан на млечната жлеза. Тези противоречиви резултати изискват по-задълбочени проучвания. Разбирането на сложните взаимодействия на KISS1 и KISS1R в тези физиологични и патофизиологични процеси могат да бъдат от решаващо значение за развитието на нови терапевтични агенти, насочени към този рецептор.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проследи клетъчно-специфичната локализация на Mas1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R и генната им експресия в околна нетуморна тъкан и тумори на млечната жлеза при жени.

Във връзка с постигане на така формулираната цел бяха поставени следните задачи:

1. Събиране и обработка на свеж оперативен материал от туморна и околна нетуморна тъкан.
2. Хистопатологично типизиране на туморите и оценка на тяхната степен на диференциация (грейд).
3. Имунохистохимичен анализ на клетъчно-специфичната локализация на Mas1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R в туморна и околна нетуморна тъкан.
4. Изолиране на тотална РНК от оперативен материал.
5. RT-PCR за изследване генната експресията на гените *mas1*, *per*, *ace*, *ace2*, *kiss1* и *kiss1r* и референтните гени *gapdh* и *pcbp1*.
6. Статистическа обработка на получените резултати.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията са проведени върху оперативен материал от тумори на млечна жлеза при пациентки, постъпили за преглед и лечение за периода 2009-2015г. и 2019-2020 г.

Оперативен туморен материал (**n=29**) беше предоставен от Център за рак на гърдата – МБАЛ „Токуда Болница София“. За целите на изследването е сключен Договор за съвместна научно-изследователска и приложна дейност от 26.08.2009 г. Проектът е одобрен от Комисия по етика на медицинските научни изследвания при МБАЛ „Токуда Болница София“ с протокол № 1 от 31.07.2009 г.

Допълнително, оперативен туморен материал (**n=54**) беше предоставен от отделението „Патоморфология на туморите“ към СБАЛО – София във връзка с изпълнение на проект КП-06-М34/5.

От повечето от пациентките бе взимана и видимо здрава околна тъкан, на разстояние не по-малко от 2 см от туморната тъкан (**n=71**).

Изследванията са проведени в ИБИР-БАН и са използвани следните методи:

- Обработка на тъканен материал за хистология
- Имунохистохимия на парафинови срезове - авидин-биотин-пероксидазен метод (АВС метод)
- Документиране на имунохистохимичните реакции и обработка на дигитализираните изображения
- Оценка на интензитета на цитоплазмената реакция с помощта на ImageJ
- Генно-експресионен анализ на базата на RT-PCR за установяване промяната в генната експресия в туморната тъкан спрямо околна нетуморна тъкан с използване на референтни гени и последваща обработка на данните по $\Delta\Delta C_t$ метода.
- Статистически методи:
 - Тест за нормалност на разпределението (Kolmogorov–Smirnov test);
 - Тест за анализ на вариацията (Kruskal-Wallis ANOVA);
 - Тест за различия между две групи (Mann-Whitney U test);
 - Корелационен анализ (Spearman)

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Класификация на изследваните тумори от млечна жлеза.

Хистологичният тип на изследваните тумори от млечна жлеза беше определен въз основа на оцветяване с хематоксилин и еозин с последващо извършване на хистопатологична диагностика.

1.1. За проследяване на експресията на MAS1, CD10, ACE и ACE2 бяха включени следните материали:

1.1.1. Тумори от млечна жлеза (n=29), от които:

- инвазивен, високодиференциран дуктален карцином, Grade 1 (n= 6);
- инвазивен, умеренодиференциран дуктален карцином, Grade 2 (n= 12);
- инвазивни, нискодиференциран дуктален карцином, Grade 3 (n= 11);

1.1.2. Околна нетуморна тъкан (n= 29);

1.2. За проследяване експресията на KISS1 и KISS1R бяха включени материали на инвазивен дуктален карцином - тумори от млечна жлеза (n=54) и околна нетуморна тъкан (n=42), за които бяха получени клинично-патологичните параметри на пациентите (табл. 1). Възрастта на пациентите варира от 27 до 85 години (средна възраст 60,28 г.).

Таблица 1. Основни характеристики на изследваните инвазивни карциноми на гърдата (n=54).

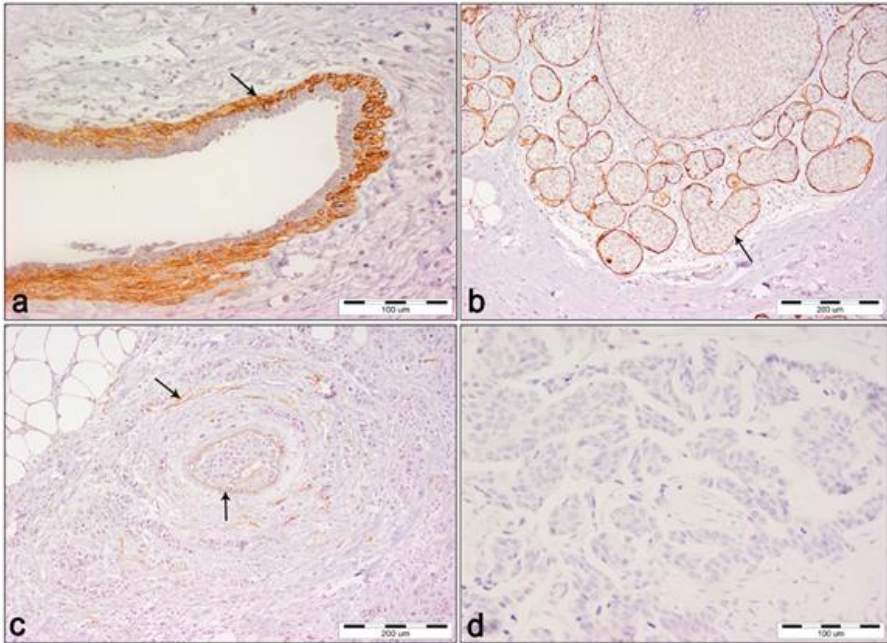
	n	%
Хистологичен тип		
Инвазивен дуктален карцином	48	88.9
Инвазивен лобуларен карцином	5	9.3
Инвазивен микропапиларен карцином	1	1.9
Grade		
G1	2	3.7
G2	22	40.7
G3	30	55.6

2. Експресия на CD10 в туморна и околна нетуморна тъкан.

Паренхимът на млечната жлеза се състои от млечни каналчета с епителен произход и строма с мезенхимен произход. Епителният растеж на тумора зависи отчасти от химическите медиатори между туморните клетки и стромалните клетки. Като миоепителен маркер, имунохистохимичното проследяване на стромалната експресия на CD10 в туморната тъкан е важен параметър при оценката на прогнозата и регулирането при инвазивни карциноми на гърдата.

Въпреки очевидното функционално инхибиране на ET - сигнализиране чрез инактивиране на ET1, клиничните и експериментални данни за CD10 при различни видове рак са противоречиви. Няколко доклада предполагат защитната роля на CD10 при ракови заболявания на простатата, яйчниците, пикучен мехур, рак на бъбреците, включително и при рак на гърдата. Други проучвания, посочват CD10 като възможен маркер за прогресия на тумора и неговото метастазиране при колоректален, плоскоклетъчен карцином на главата и шията, рак на белия дроб, рак на гърдата, а така също и способността му да регулира ET сигнализирането. И все пак, специфичната функция на CD10 и неговият механизъм при инвазия на рак на гърдата остава неясен.

При изследване на имунохистохимичната експресия на CD10 в нормален паренхим, беше установена интензивна реакция в миоепителните клетки на млечните каналчета (Фигура 1a). При дуктален карцином *in situ* и инвазивен карцином, интензитетът на реакцията в миоепителните клетки е значително по-слаб, като при инвазивния карцином оцветяване почти липсва и беше отчетена слаба реакция в епителните клетки (Фигура 1b,c). При нискодиференцирани дуктални карциноми не се наблюдава реакция за CD10 (Фигура 1d).



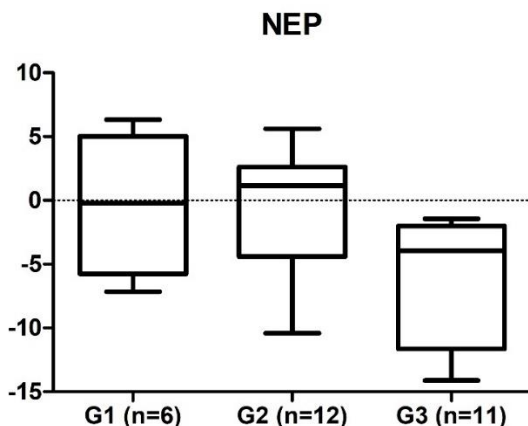
Фигура 1. Имунохистохимична експресия на CD10. a) околна нетуморна тъкан, оцветяване на миоепителни клетки b) in situ дуктален карцином, c) инвазивен умеренодиференциран дуктален карцином, d) инвазивен нискодиференциран дуктален карцином. Липсва реакция за CD10 при нискодиференцираните карциноми. (Имунопероксидазен метод, DAB).

Настоящите резултати показват отсъствие на протеинова експресия на CD10 в стромалните клетки при изследваните нискодиференцирани карциноми на млечната жлеза, което е в противоречие с докладваните през последните години резултати. Редица автори съобщават, че при инвазивни дуктални карциноми на гърдата липсва експресия на CD10 в миоепителните клетки, а експресията му в стромалните клетки означава преход от епителна към мезенхимна трансформация и се свързва с агресивно поведение на тумора.

Проведеният от нас RT-PCR показва подтискане на генната експресия в туморната тъкан, в сравнение с околната нетуморна тъкан. При разпределянето на туморите на базата на тяхната степен на диференциация, установихме, че има тенденция към повишаване на генната експресия наблюдаваща се единствено при G3 спрямо G1 и G2. По подобен начин, авторски колектив съобщава, че стромалната експресия на CD10 е сигнификантно свързана с висока степен на тумора.

Не се установяват статистически достоверни промени в генната експресия с промяна в степента на диференциацията на тумора, но се забелязва тенденция за понижаване при G3 (Фигура 2), което е в синхрон с данните докладвани от други автори. Може да се предположи, че в околната нетуморна тъкан CD10 упражнява благоприятен ефект, чрез превръщане на ангиотензин I в ангиотензин-(1-7), притежаващ вазодилаторно и антипролиферативно действие и вероятно допринася значително за повишаване плазмените нива на този пептид.

CD10 е цинк-зависима металопротеиназа и е известна също като „общ антиген на остра лимфобластна левкемия“ (Common Acute Lymphoblastic Leukaemia Antigen”, CALLA) или неприлизин (NEP). Той е ендопептидаза (95–100 kDa), намираща се на клетъчната повърхност, която разцепва и инактивира множество пептидни субстрати при N-терминалния им край при хидрофобни аминокиселинни остатъци. Субстратите на CD10 включват β -амилоид, ангиотензин I, брадикинин, субстанция P и ендотелин-1 (ET1). ET1 активира пътя на митоген-активираната протеин киназа (MAPK) чрез ендотелин-рецепторно сигнализиране и впоследствие модулира клетъчното оцеляване, пролиферация, инвазия и ангиогенеза и е замесен в множество видове рак. Въпреки очевидното функционално инхибиране на ET - сигнализиране чрез инактивиране на ET1, клиничните и експериментални данни за CD10 при различни видове рак са противоречиви.



Фигура 2. Промяна на генната експресия на CD10 (NEP) mRNA в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.

Няколко доклада предполагат защитната роля на CD10 при ракови заболявания на простатата, яйчниците, пикочен мехур, рак на бъбреците, включително и при рак на гърдата. Други проучвания посочват CD10 като възможен маркер за прогресия на тумора и неговото метастазиране при колоректален, плоскоклетъчен карцином на главата и шията, рак на белия дроб, рак на гърдата, а така също и способността му да регулира ET сигнализирането.

В обобщение заключихме, че CD10 може да бъде полезен маркер, позволяващ по-сложна оценка на миеоцителните клетки за диагноза на лезии на гърдата. Също така, CD10 може да действа като потенциална цел за разработване на нови лекарства.

3. Експресия на Mas1 рецептор в туморна и околна нетуморна тъкан.

Ренин-ангиотензиновата система (RAS) играе критична роля в регулирането на човешката физиология. Всъщност RAS е главен регулатор на сърдечно-съдовата физиология, който допълнително интегрира, координира и позволява функционирането на различни физиологични системи,

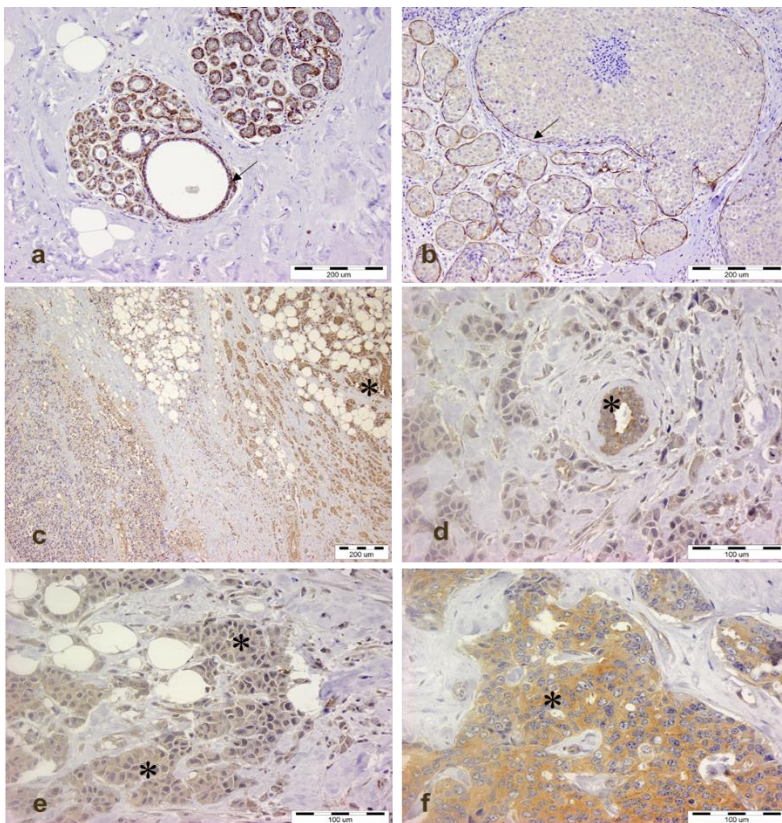
включително бъбречна и дихателна система. Забележителна е тази мрежа от хормони и рецептори, която генерира локална ендокринна система, регулирана е от специфични ензими, контролиращи и определящи различни ефекти в различни тъкани и органи. Състои главно от ренин, ангиотензиноген (AGT), ангиотензин I (ANG I), ангиотензин конвертиращ ензим (ACE), ангиотензин II (ANG II), рецептор на ангиотензин II тип 1 (AT1R) и рецептор на ангиотензин II тип 2 (AT2R), често наричан класически път на RAS. Алтернативният се състои главно от ангиотензин 1-7 (ANG-(1-7)), MAS рецептор (MAS1) и ангиотензин конвертиращ ензим 2 (ACE2).

Използвайки имунохистохимичен анализ, проведен върху инвазивни дуктални карциноми, класифицирани по степен на диференциация (Grade 1, Grade 2 и Grade 3) установихме, че картината на оцветяване на Mas1 рецептора в околната нетуморна тъкан е идентична с тази на CD10. Отчетена е интензивна реакция в миепителните клетки, а в епителните клетки липсва локализация на таргетния протеин (Фигура 3a). Значителни промени в интензитета на имунохистохимичната реакция, обаче, се наблюдава в туморната тъкан. При *in situ* дуктален карцином, интензитетът на реакцията в миепителните клетки е значително по-слаб в сравнение с околната нетуморна тъкан (Фигура 3b). Наблюдава се оцветяване в стромата при инвазивни карциноми Grade 2 и по-висок интензитет при инвазивни карциноми с ниска степен на диференциация Grade 3 (Фигура 3c и Фигура 3d,e). Със значителен интензитет е цитоплазмената реакция в туморните клетки при умерените и ниско диференцираните тумори.

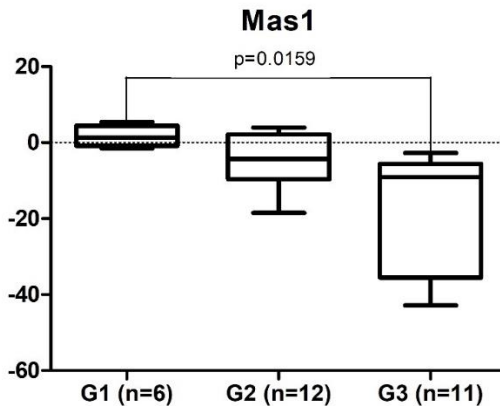
Нашите резултати отчасти съвпадат с тези публикувани от авторски колектив през 2015 година, който установява, че в доброкачествените тъкани на млечната жлеза Mas1 се експресира във високи нива предимно в миепителните клетки, докато експресията на Mas1 рецептор е отслабена във всички изследвани инвазивни карциноми. В проучването се посочва антитуморния ефект на Mas1 рецептор и че неговото активиране може да бъде постигнато, чрез активиране на ACE2, което се засилва чрез съвместно лечение с ангиотензин рецептор блокери. Една възможна причина за противоречивите резултати при двете изследвания вероятно е туморната микросреда, за която има доказателства, чрез *in situ* метод, че повлиява прогресията на рака на гърдата.

Друга причина може да е използваното поликлонално антитяло. Наблюдаваната от нас силна цитоплазмена реакция не означава непременно високи нива на функционален протеин. По-скоро това е поредния защитен механизъм на туморните клетки да избегнат ефекта на ангиотензин-(1-7) като анти-пролиферативен и апоптотичен фактор. Тази хипотеза се потвърждава и от проведения генно-експресионен анализ, който показва по-ниски нива на генна експресия при туморите, в сравнение с околната нетуморна тъкан. Достоверно по-висока е експресията ($p < 0.05$) в туморите от G1, спрямо тези от G3 (Фигура 4).

Ангиотензините са пептидни хормони, повечето ангиотензин рецептори са с G-протеин свързани рецептори (GPCRs), които причиняват активирането на няколко различни пътя на сигнална трансдукция, което позволява ефектите на хормоните да покажат специфичност на клетъчния тип. Като активен хормон на RAS, ANG II повишава кръвното налягане до нормално ниво. Той обаче има обратни ефекти в два типа G-протеинови двойки рецептори: AT1R и AT2R. Първият е по-често срещан в тъканите на възрастни като черния дроб, мозъка и бъбречната тъкан, докато вторият присъства предимно в тъканите на плода, яйчника и матката. Дерегулацията на този деликатен ендокринен баланс може да генерира различни патологии, включително атеросклероза, исхемична болест, хипертония и сърдечна недостатъчност. Следователно, тази нова RAS ос, включително и Mas1 рецептора представлява обещаваща терапевтична цел за сърдечно-съдови и метаболитни заболявания.



Фигура 3. Имунохистохимична експресия на Mas1 рецептор. а) околна нетуморна тъкан, отчита се интензивна реакция в миоепителните клетки, **б)** - *in situ* дуктален карцином **с)** инвазивен, високодиференциран дуктален карцином (Grade 1) **д)** инвазивен, умеренодиференциран дуктален карцином (Grade 2), **е)** инвазивен, умеренодиференциран дуктален карцином (Grade 2), **ф)** инвазивен, нискодиференциран дуктален карцином (Grade 3). Наблюдава се цитоплазмена реакция в туморните клетки при инвазивните умеренодиференцирани и нискодиференцирани дуктални карциноми (звездичка), (Имунопероксидазен метод, DAB).



Фигура 4. Промяна на генната експресия на *Mas1R mRNA* в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.

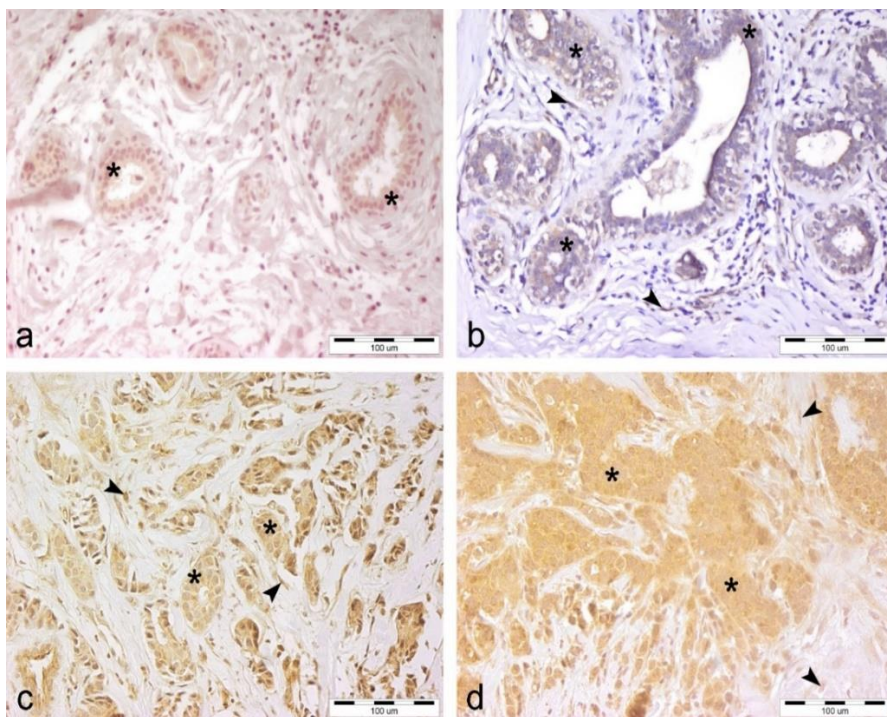
4. Експресия на ACE и ACE2 в туморна и околна нетуморна тъкан.

Проведеният имунохистохимичен анализ показва, че ACE е локализиран в епителните клетки в околната нетуморна тъкан (Фигура 5). В злокачествените тъкани беше отчетена реакция както в епителните, така и в туморните клетки. При инвазивни дуктални карциноми беше установена тенденция към повишаване интензитета на реакцията с повишаване степента на диференциация на тумора (Фигура 5b, c). Най-интензивна реакция се наблюдава при нискодиференцирани високостепенни карциноми (Фигура 5d).

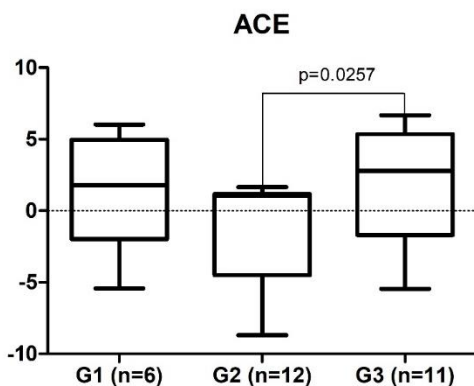
Анализът на ACE mRNA показва достоверно по-високи нива ($p < 0.05$) при G3 туморите в сравнение с тези от G2. Наблюдава се слаба тенденция към намаляване нивата на ACE mRNA при намаляване диференциацията на тумора (Фигура 6).

Ангиотензин-I-конвертиращият ензим (ACE, карбоксидипептидаза), е един от ключовите фактори, участващи в превръщането на ангиотензин-I (ANG I) във физиологично активен ангиотензин-II (ANG II). Въпреки това, при патология, включително рак, ролята на ACE в образуването на ANG II може да

бъде значително намалена чрез увеличаване на приноса на ACE-независимия път на превръщане на ANG I в ANG II в присъствието на химаза и други пептидази, повишавайки устойчивостта на туморните клетки към противотуморни терапии.



Фигура 5. Имунохистохимична експресия на ACE. a) околна нетуморна тъкан **b)** инвазивен, високодиференциран (Grade 1) дуктален карцином. **c)** инвазивен, умеренодиференциран, нискостепенен (Grade 2) дуктален карцином. **d)** – инвазивен, нискодиференциран дуктален карцином (Grade 3). Слабо оцветявяне в епителните клетки в околната нетуморна тъкан. Висок интензитет на реакцията в туморните клетки при нискодиференцираните карциноми. (Имунопероксидазен метод, DAB).



Фигура 6. Промяна на генната експресия на ACE mRNA в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.

Широко известно е, че ACE, имайки сравнително ниска субстратна специфичност, може да участва не само в образуването на ANG II, но и в кинините, както и в други физиологично активни молекули, които са потенциално свързани с процесите на канцерогенеза, растеж и разпространение на тумори. Обръща се внимание на информацията, че ACE, в допълнение към пептидазната активност, може директно да участва във вътреклетъчната сигнална трансдукция на ANG II, като всъщност е рецептор на ANG II. Според авторите на цитираната публикация механизмът на ACE-зависимото приемане на ANG II може да играе важна роля в управлението на миграцията и пролиферацията на раковите клетки.

Динамиката на промените в топологията и нивата на експресия на ACE при рак може да служи като маркер за локализиране на проонкогенните ефекти на ANG II и други хуморални фактори, чиито метаболизъм е свързан с функциите на компоненти на RAS. Например, при рак на бъбреците се наблюдава промяна в активността и топологията на експресия на ACE протеини. Обикновено епителът на кортикалните сегменти на тубула на нефрона, по-специално епителът на проксималния участък, показва висока степен на експресия на ACE, която липсва при светлоклетъчният бъбречноклетъчен карцином

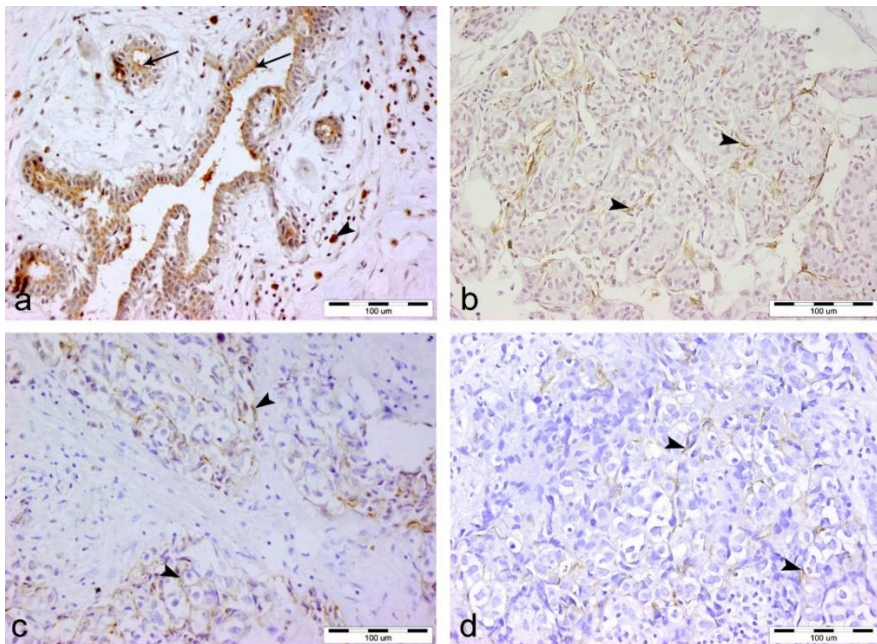
(CCRCC) и се открива само в кръвоносните съдове на тумора. Авторите показват, че нивото на протеинова експресия в тумора и степента на неговата ензимна активност в плазмата може да служи като маркер при пациенти с CCRCC и обща преживяемост на пациенти с CCRCC. От друга страна, инхибирането на неоангиогенезата при злокачествени новообразувания от ACE блокери се счита за една от основните индикации за приложение на лекарства от тази група в онкологията.

Значително повишаване на експресията на ACE при рак на ларинкса показва неблагоприятен ход на заболяването и висок риск от туморни метастази. По този начин промените в експресията на ACE, както увеличаване, така и намаляване, заедно с изследването на полиморфизма на ACE гена, се използват широко в съвременната онкология като маркер за тежестта на заболяването и прогнозата (Regulska, 2013). Въпреки това, според някои автори, нивото на експресия на ACE от злокачествени туморни клетки не винаги корелира с интензивността на локалното производство на ANG II, поради повишената активност на химазата, която регулира ACE-независимия път на образуване на ANG II. Освен това е необходимо да се има предвид, че ACE участва пряко в регулирането на имунните реакции на организма.

Подобно на ACE, ние установихме, че в околната нетуморна тъкан ACE2 е локализиран в епителните клетки. За разлика от ACE, при ACE2 в околната нетуморна тъкан реакцията е най-интензивна (Фигура 7a). С понижаване степента на диференциация (увеличаване на грейда), беше отчетена понижена протеинова експресия на ACE2 в туморната тъкан (Фигура 7b, c). Установена бе и слаба цитоплазмена реакция при нискодиференцирани високостепенни карциноми на млечната жлеза (Фигура 7).

Проведеният имунохистохимичен анализ на ACE2 показва липса на протеинова експресия в туморни епителни клетки и намаляване на оцветяването на стромалните клетки в тези тумори с повишаване на тяхната степен. Това е логично, тъй като ACE2 е отговорен за превръщането на ANG II в ANG-(1-7), който стимулира апоптозата и потиска клетъчната пролиферация, упражнявайки своя регулаторен ефект чрез Mas1 рецептора. Резултатите подкрепят находките и на други автори, според които, намаляването на експресията на ACE2 при рак на гърдата се счита за маркер

за тежко заболяване с висок риск от метастази.

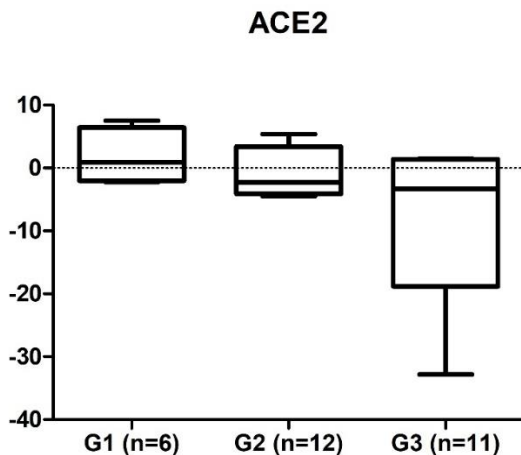


Фигура 7. Имунохистохимична експресия на ACE2. а) околна нетуморна тъкан **б)** инвазивен, високодиференциран (Grade 1) дуктален карцином. **с)** инвазивен, умеренодиференциран, нискостепенен (Grade 2) дуктален карцином. **д)** – инвазивен, нискодиференциран дуктален карцином (Grade 3). Интензивно оцветяване в епителните клетки в околната нетуморна тъкан. С повишаване на грейда, интензитетът на реакцията намалява. (Имунопероксидазен метод, DAB).

Повишената експресия на оста ACE2/ANG-(1-7)/Mas1 инхибира клетъчната миграция и инвазия *in vivo* и *in vitro* при рак на гърдата, докато намаляването на нейната експресия засилва метастазите на рак на гърдата чрез активиране на RAK1/NF- κ B/Snail1 пътища.

Проведеният RT-PCR за ACE2 не показва статистически значими разлики между групите тумори от различен грейд, но показва тенденция за понижаване нивата на генна експресия с намаляване на грейда, подобно на установената на

протеиново ниво (Фигура 8).



Фигура 8. Промяна на генната експресия на ACE2 mRNA в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.

Настоящите резултати съвпадат с публикувани данни през 2022 година, които проследяват протеиновата и генната експресия на ACE2 и докладват за намаляване на нивата на експресия в инвазивни дуктални карциноми в сравнение с околната нетуморна тъкан. Според този колектив, пациентите с ниски нива на експресия на ACE2 имат лоша прогноза, което се дължи на ДНК промоторното метилиране на ACE2. Проучвания съобщават, че нивата на ACE2 отрицателно корелират със степента на тумора и способността за метастазирание. При ендометриален карцином на матката и папиларен бъбречно-клетъчен карцином, експресията на ACE2 показва положителна корелация с прогнозата, придружена от повишени нива на инфилтрация в имунните клетки. Що се отнася до инфекцията със SARS-CoV-2, ACE2 заедно с TMPRSS2 действа като рецептор за навлизане в клетката гостоприемник.

Съобщава се, че нивото на експресия на ACE2 отрицателно корелира с интензивността на неоангиогенезата при недребноклетъчен белодробен карцином. Оста ACE2/ANG-(1-7)/Mas1 инхибира секрецията на VEGFA, докато матриксните металопроотеинази MMP-2 и MMP-9 спомагат за

ограничаване на неоангиогенезата, повишават чувствителността на тумора към цитостатични лекарства и намаляват риска от метастази. Многобройни проучвания показват, че хипоксията е отличителна черта на солидните тумори и че неадекватното снабдяване с кислород допринася за проонкогенния ефект на ACE/Ang II на фона на намаляване на ефектите на ACE2/ANG-(1-7)/Mas1 оста. Има достатъчно доказателства в подкрепа на включването на ANG-(1-7) в клиничната практика като възможност за лечение на тройно негативен рак на гърдата.

В същото време се подчертава, че влиянието на оста ACE2/ANG-(1-7)/Mas1 върху раковите клетки и прогресията на тумора може да зависи от самото местоположение на тумора. Според авторите има доказателства, че ANG-(1-7) стимулира миграцията на клетки от бъбречно-клетъчен карцином (RCC) и че повишената регулация на провъзпалителни гени има значително въздействие върху развитието и прогресията на RCC, тоест ANG-(1-7) по отношение на RCC има проонкогенен ефект.

Литературните данни потвърждават локалния синтез и ефект на компонентите на RAS в различни органи, включително и гърдата, като по този начин могат да играят роля освен в патологията на млечната жлеза, така и при различни злокачествени заболявания, като овариален карцином, рак на бъбреците, колоректален карцином.

Според някои учени, в околната нетуморна тъкан на млечната жлеза е застъпен основно алтернативния път (ACE2/ANG-(1-7)/Mas1) на физиологично действие на RAS, докато в злокачествената тъкан преобладава класическия път (ACE/ANGII/AT1R). Така че ANG II и неговите рецептори заслужават да бъдат изследвани, след прилагани терапии с ACE инхибитори.

Въпреки че се счита, че класическият RAS играе физиологична роля в регулирането на сърдечно-съдовата и бъбречната функция, кръвното налягане, биосинтезата и освобождаването на алдостерон и баланса на телесната сол и течности, дисбалансите в RAS могат също да представляват фактори, които са в основата на туморния растеж, метастази и ангиогенеза. Освен това алтернативният път на RAS (ACE2/ANG-(1-7)/Mas1) действа като отрицателен регулатор на активността на ANG II, докато ANG II индуцира туморна прогресия при интрахепатален холангиокарцином.

Ангиотензин-конвертиращият ензим 2 (ACE2) е ключов ензим на системата

ренин-ангиотензин и добре известен функционален рецептор за навлизането на коронавируса 2 на тежкия остър респираторен синдром (SARS-CoV-2) в клетките гостоприемници. Пандемията от COVID-19 постави ACE2 в светлината на прожекторите, а експресията на ACE2 в тумори и връзката му с инфекцията SARS-COV-2 и прогнозата на пациентите с рак получиха голямо внимание. Въпреки това, връзката между експресията на ACE2 и туморната терапия и прогнозата, особено при рак на гърдата, остава двусмислена.

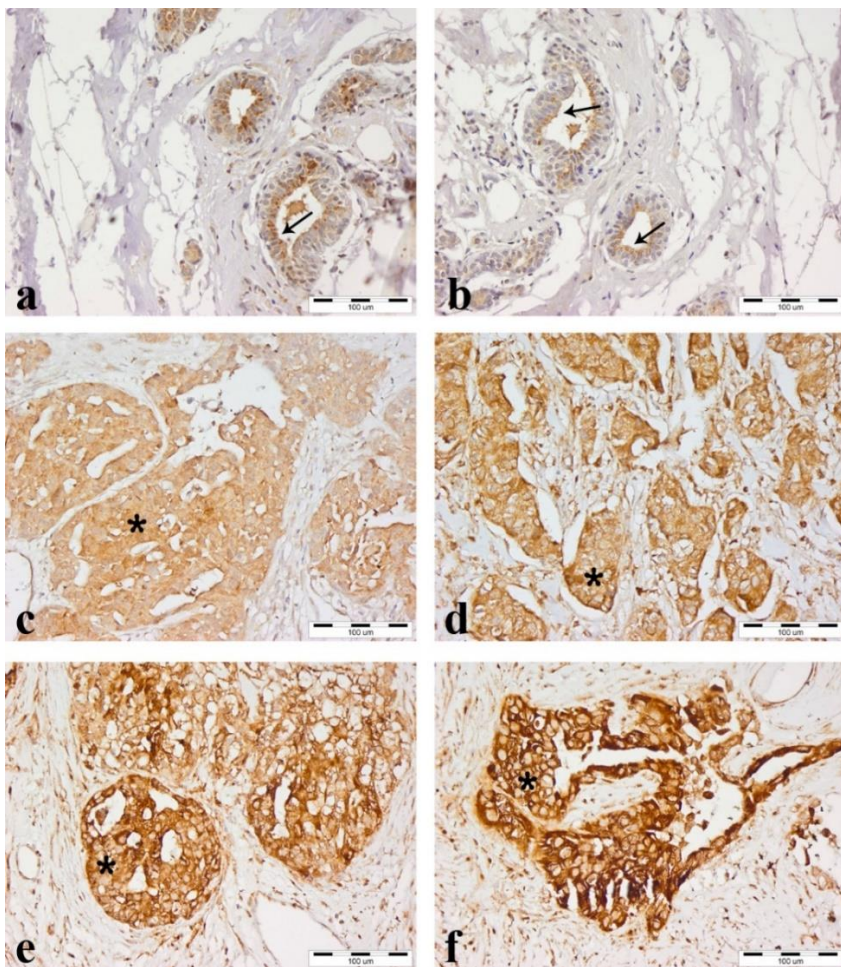
5. Експресия на KISS1 и KISS1R в туморна и околна нетуморна тъкан.

Ракът на гърдата е вторият най-често срещан рак в света сред жените. Докладвани са много метастазни супресорни гени, включително гена за KISS1, който кодира протеин от 145 аминокиселини (kisspeptin-145), който претърпява протеолитично разцепване, което води до kisspeptin-14, -13 и -10. Всички тези протеини могат да активират KISS1 рецептора (KISS1R). Данните получени при изследването на KISS1/KISS1R сигнализирането при рака на гърдата остават противоречиви. При проследяване на протеиновата експресия на KISS1 и неговия рецептор KISS1R в туморна тъкан в сравнение с околна нетуморна тъкан на млечната жлеза, установихме, че интензитетът на реакцията е значително по-висока при туморната тъкан в сравнение с околната нетуморна тъкан. KISS1 и KISS1R показаха по-силно оцветяване в цитоплазмата на туморните клетки с допълнителна мембранна реакция за KISS1R. При нискодиференцирани инвазивни дуктални карциноми реакцията е по-силна в сравнение с тази при умерено диференцирани дуктални карциноми (Фигура 9).

Докладите за експресията на KISS и KISS1R в различните видове тумори са доста противоречиви. В някои проучвания експресията на KISS1 е доказано, че намалява при високостепенни тумори, което е свързано с повишен метастатичен потенциал и неблагоприятна прогноза. Такава връзка е открита в аденокарцином на стомаха, карцином на хранопровода, карцином на яйчниците и др. Проучвания върху рака на гърдата обаче са показали обратното явление. Туморите с по-висок грейд показват повишена експресия на KISS1 и KISS1R, което корелира с повишен метастатичен потенциал и лоша прогноза. Нашите резултати показват, че експресията на KISS1 и KISS1R е по-висока в раковата тъкан в сравнение с околната нетуморна тъкан. Нашите

открития са в съответствие с предишни проучвания проведени от авторски колективи които също отчитат по-висока експресия на KISS1 в рак на гърдата в сравнение с нормалния паренхим на гърдата.

Съществуват данни, че ER α играе ключова роля в контролирането на KISS1/KISS1R сигнализация. При физиологични условия, в присъствието на ER α , активирането на KISS1R се свързва с растежа и ремоделирането на жлезата. Загуба на ER α в гърдата рак, обаче, води до повишена транскрипция на KISS1 и/или KISS1R. Повишената транскрипция в тези случаи не е свързана с физиологичната роля на KISS1 като метастатичен супресор, а по-скоро стимулира инвазивността чрез трансактивиране на EGFR от KISS1R. Това независимо от лиганда активиране на EGFR допълнително стимулира клетъчния инвазивност при рак на гърдата. Освен това, трансактивирането на EGFR от KISS1, необходимо за секрецията и активирането на MMP-9 и ефектите на активната MMP-9, се свързват със стимулиране на инвазията на туморните клетки и ангиогенезата. Повишеното KISS1R сигнализиране при рак на гърдата също е свързано с индукция на EMT, което им позволява да приемат мезенхимен фенотип, който включва повишен миграционен капацитет, инвазивност, повишена резистентност към апоптоза и значително увеличено производство на компоненти на екстрацелуларния матрикс.

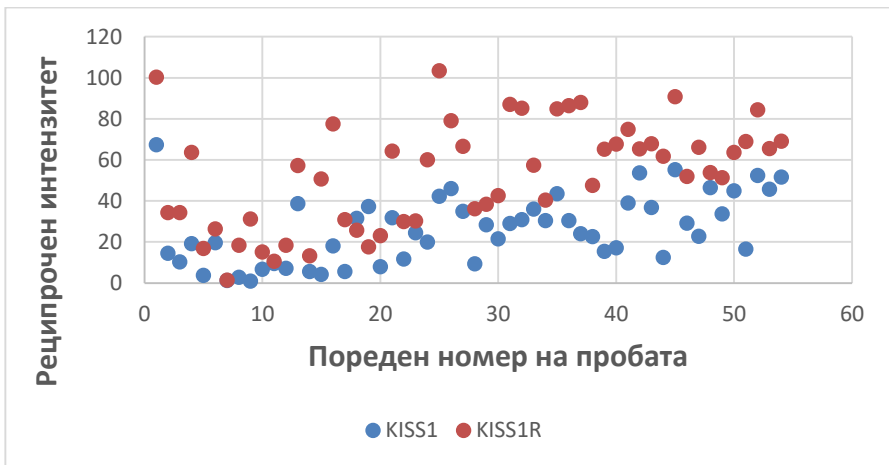


Фигура 9. Имунохистохимична експресия на KISS1 (a, c, e) и KISS1R (b, d, f) в нормален епител на гърдата (a, b), инвазивен умерено диференциран дуктален карцином (c, d) и инвазивен ниско диференциран дуктален карцином (e, f). Наблюдава се слаба цитоплазмна и по-интензивна апикална реакция както за KISS1, така и за KISS1R в нормален епител на гърдата (стрелки). По-силно оцветяване на цитоплазмата на туморните клетки при инвазивен умерено диференциран дуктален карцином и ниско диференциран дуктален карцином (звездичка).

Антиметастатичните свойства на KISS1/KISS1R сигнализирането са демонстрирани при много видове рак, включително меланом, рак на щитовидната жлеза, яйчниците, пикочния мехур, стомаха, хранопровода, панкреаса, белия дроб и рак на хипофизата. За няколко от тези типове рак беше разкрито, че потискането на метастазите се постига чрез KISS1/KISS1R-зависимо потискане на активността на матриксната металопротеиназа 9 (MMP-9) и последващо инхибиране на миграцията и инвазията на раковите клетки. Допълнителни проучвания върху рака на гърдата обаче разкриха, че сигнализирането на KISS1/KISS1R насърчава инвазията и метастазите.

Освен качествената оценка на имунохистохимичната реакция за KISS1 и KISS1R беше извършено и базирано на софтуер измерване на интензитета на оцветяване за оценка на евентуална връзка между протеиновата експресия на KISS1 и KISS1R. Базираното на софтуер измерване на интензитета на оцветяването е особено удачно, когато само определен тип положителни клетки или структури в тъканта са предназначени за анализ. Освен това, получените числени данни улесняват статистическия анализ.

В резултат на проведеното изследване беше установено, че KISS1 и KISS1R показват значителна положителна корелация помежду си ($r= 0.66$, $p<0.0001$), като за оценката на връзката между протеиновата експресия на KISS1 и KISS1R беше използвана извадка от 54 жени с рак на гърдата и бяха използвани изчислените стойности на реципрочен интензитет (RI) (Фигура 10).

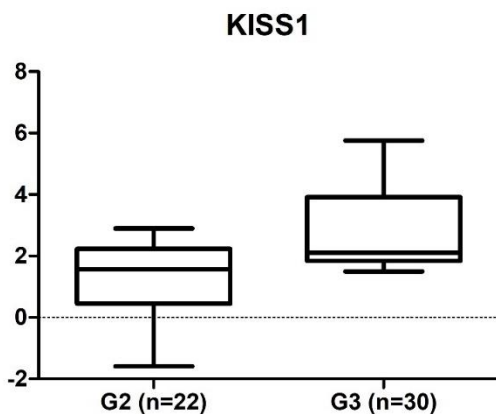


Фигура 10. Корелация ($r = 0.66$) между протеиновата експресия на KISS1 и KISS1R, $n = 54$.

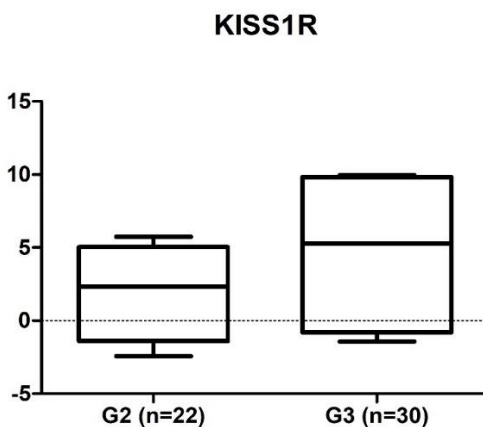
В съответствие с нарастващите доказателства за променено функциониране на KISS1/KISS1R сигнализацията при рак на гърдата, установената корелация между KISS1 и KISS1R не е изненадваща. Подобни резултати са докладвани и от други автори, които установяват по-висока протеинова експресия на KISS1 и KISS1R в тъканите от рак на гърдата (дуктални карциноми и лобуларни карциноми) в сравнение с неракови фиброкистозни тъкани от млечна жлеза, както и силна положителна корелация в протеиновата експресия на KISS1 и KISS1R.

В съответствие с получените данни за протеиновата експресия, нивата на KISS1 и на KISS1R mRNA в туморната тъкан са по-високи от тези в околната нетуморна тъкан, установено чрез използване на RT-PCR. Въпреки, че разликата между различните грейдове не е статистически значима, се наблюдава тенденция тя да е по-висока при по-високостепенни тумори (G3) (Фигури 11 и 12).

По данни в литературата и други автори докладват повишена експресия на KISS1 в туморната, в сравнение с нетуморна тъкан и значително по-висока експресия при тумори с метастази в лимфните възли.



Фигура 11. Промяна на генната експресия на *KISS1* mRNA в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.



Фигура 12. Промяна на генната експресия на *KISS1R* mRNA в туморната тъкан в пъти, спрямо околната нетуморна тъкан, според грейда на тумора.

Друго проучване съобщава, че *KISS1* mRNA и *KISS1R* mRNA са силно експресирани в инвазивни тумори на гърдата. Докладвани резултати

демонстрират, че сигнализирането на KISS1/KISS1R може да не функционира като супресор на метастази при рак на гърдата, но основните механизми са неизвестни.

Подобно на нашите резултати, през 2022 година са публикувани данни, докладващи за значително по-висока експресия на KISS1R mRNA при пациенти с тумори G3, в сравнение с пациенти с тумори G2. Други автори съобщават, че намаляването на експресията на KISS1 и/или KISS1R mRNA е свързано с лоша клинична прогноза при някои пациенти с различни видове рак, което предполага, KISS1 и/или KISS1R могат да бъдат мощен прогностичен маркер в клинични условия.

Фактът, че сигнализирането на KISS1/KISS1R е промигриращо и проинвазивно в клетките на рака на гърдата, е обяснен в проучване, направено от екип от учени, който демонстрира, че сигнализирането на KISS1R индуцира образуването на метастази и активиране на ключови протеини като кортактин, кофилин и мембранния тип I матриксна металопротеиназа (MT1-MMP). Освен това, KISS1R стимулира образуването на метастази чрез нов път, включващ β -арестин 2 и ERK1/2-зависими механизми. Такива открития предполагат, че насочването към сигналната ос KISS1/KISS1R може да бъде обещаваща стратегия за инхибиране на инвазивността и метастазите.

Резултатите от нашето изследване подкрепят идеята, че KISS1 и KISS1R може да не функционират като метастазен супресор в случаите на рак на гърдата, тъй като тяхната експресия е по-висока при по-високостепенни тумори на гърдата, но биха могли да се използват като прогностичен маркер за агресивността на рака.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ракът на гърдата е сериозен здравен проблем в световен мащаб, с високо заболяемост и смъртност сред жените. Редица проучвания съобщават, че компонентите на ренин-ангиотензиновата система, както и KISS1/KISS1R са локално експресирани в млечната жлеза и по този начин могат да играят роля в патологията на рака на гърдата. При проучванията извършени в настоящия дисертационен труд, а именно проследяването на протеиновата и гена

експресия на MAS1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R, без съмнение се установи участието на тези компоненти в туморната прогресия. Проследяването и изледването на тези компоненти, все още представлява голям интерес сред световните научни среди. В съответствие с редица литературни данни, се установи, че промяната в клетъчно-специфичната локализация на MAS1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R, може да послужи като важен белег при проследяването на злокачественото заболяване. Сега се знае, че миоепителните клетки също са важни за прогресирането на рака. Преди години са били доста пренебрегнати, но сега са смятани за естествени туморни супресори, без да е напълно изяснена тяхната роля в поддържането на полярността на епителните клетки и прогресията на клетъчния цикъл, както и отношението им към клетъчната миграция и инвазия, което отваря нови изследователски ниши на фактори, влияещи върху развитието на тумора.

Получените данни за нивата на експресия на MAS1R, CD10, ACE, ACE2, KISS1 и KISS1R, дават косвена подкрепа на терапевтичните концепции, но е възможно и да бъдат включени в програми по превенция на рака на гърдата, защото има основание да се ползват като прогностични маркери, а също така, и да послужат при разработването на нови лекарства.

VI. ИЗВОДИ

Извършените изследвания подкрепиха хипотезата, че компонентите на ренин-ангитензиновата система и KISS1/KISS1R сигналната система участват в патофизиологията на рака на гърдата и доведоха до следните изводи:

1. CD 10 отсъства в стромалните клетки при нискодиференцирани карциноми на млечната жлеза и генната му експресия в туморите е потисната, в сравнение с околната нетуморна тъкан.
2. С понижаване диференциацията на туморите от млечна жлеза протеиновата експресия на Mas1R се повишава, докато генната му експресия се понижава.

3. Най-висока протеинова експресия на ACE се наблюдава при нискодиференцирани високостепенни карциноми, като по подобен начин, ACE mRNA показва по-високи нива при по-високостепенните карциноми.
4. Установява се отслабване на протеиновата експресия на ACE2 в туморните епителни клетки и стромалните клетки с повишаване грейда на тумора, като подобна тенденция се наблюдава и в генната му експресия.
5. Повишената протеинова експресия на KISS1 и KISS1R при инвазивните нискодиференцирани карциноми потвърждава, че KISS1/KISS1R системата не действа като метастазен супресор при рака на гърдата.
6. Съществува положителна корелация в протеиновата експресия на KISS1 и KISS1R.

СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ:

1. **Ankova, D.**, D. Pupaki, Rashev P. (2018). Immunohistochemical Expression of KISS-1 Protein and KISS-1R in Breast Cancer. Acta morphologica et anthropologica, 25 (3-4): 5-10. Prof. Marin Drinov, ISSN 1311-8773 (print); ISSN 2535-0811 (online).
2. **Ankova, D.**, Pupaki, D., Rashev, P. (2019). ACE and ACE2 Protein Expression Changes with Tumour Grade in Invasive Ductal Carcinomas. Acta morphologica et anthropologica, 26 (3-4): 20-25. Prof. Marin Drinov. ISSN 1311-8773 (print); ISSN 2535-0811 (online).
3. Pupaki, D., Bachurska, S., Parvanov, **D.**, **Ankova, D.**, Rashev, P. (2022). ASSOCIATION BETWEEN THE EXPRESSION OF KISS1, KISS1R AND MMP-9 IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, 75 (10): 1514-1521. Издателство на БАН, ISSN:1310–1331, 1514-1521. SJR (Scopus):0.19, JCR-IF (Web of Science):0.329.

НАУЧНИ ФОРУМИ:

1. **Ankova, Dessislava**, Pupaki, Despina, Metodiev, Dimitar, Rashev, Pavel. IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF MAS1 AND CD10 IN HUMAN BREAST CARCINOMA. Международна научна конференция „20 години Факултет по Ветеринарна Медицина“, 28 - 30.11.2014, Юндола.
2. **Десислава Анкова**, Деспина Пупаки, Павел Рашев. Експресия на ACE и ACE2 при карциноми на млечната жлеза. Втора Национална конференция за млади учени “Биологически науки за по-добро бъдеще”. ПУ “Паисий Хилендарски”, 30 - 31.10.2015, Пловдив, България.
3. **D. Ankova**, D. Pupaki, P. Rashev. Immunohistochemical expression of KISS-1 Protein and KISS-1R in Breast Cancer. VII National Conference with International Participation "Morphological Days", Sofia, BG, 09.06.2018.
4. Despina Pupaki, Svitlana Bachurska, **Dessislava Ankova**, Pavel Rashev. Protein expression of KISS1 and ER in invasive breast carcinomas. 7 th INTERNATIONAL MARDIN ARTUKLU SCIENTIFIC RESEARCHES CONFERENCE (Доклад), Mardin, Turcia, 10.12.2021 - 12.12.2021.

5. Д. Пупаки, Св. Бачурска, Д. **Анкова**. Оценка на протеиновата експресия на KISS1 при инвазивни карциноми на гърдата. XIII-ти НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО ПАТОЛОГИЯ (Доклад), Бургас, БГ, 10.09.2021 - 12.09.2021.