

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на доктор Деспина Ваици Пупаки,
озаглавен "Роля на ендопептидазите в патогенезата на
туморите на млечната жлеза при кучето "

Рецензент : Проф.Цана Петрова Бошнакова – Празникова,дмн,

Дисертационният труд на д-р Деспина Ваици Пупаки е посветен на изключително важен проблем в патологията на млечната жлеза – туморните образувания. Двадесет процента от причините за смърт у жените в целия свят се дължат на рака на гърдата. Всяка година у нас умират 1200 жени, а 3500 научават за първи път, че имат това заболяване. Известно е, че редица постижения в морфологичната наука произхождат от изследвания, извършени на животни. Като имаме предвид, че млечната жлеза на кучето хистологично е близка до тази на човека, считам, че всяко изследване на онкопатологията ѝ в кучето биха били полезни за хуманната медицина. Още повече, че редица проблеми от туморния растеж остават все още не напълно изяснени.

Предприетите изследвания от д-р Пупаки в дисертационния ѝ труд върху ролята на ендопептидазите в патогенезата на туморите на млечната жлеза намирам за напълно навременни. В своята работа тя използва широк набор от съвременни хистохимични, имунохистохимични и молекулярни методи, които ѝ предоставят възможност да направи ценни изводи.

Трудът е написан на 138 страници, съобразно построен – съдържа следните части: въведение – 1 стр., литературен обзор – 29 стр., цел и задачи – 2 стр., материал и методи – 11 стр., резултати – 40 стр., обсъждане – 10 стр., изводи – 1 стр., заключение – 2 стр., приложения – списък на научните публикации, участия в научни конгреси и конференции и в научен проект – 1 стр. и литература – 24 стр., включваща 274 цитирани автора.

В литературния обзор д-р Пупаки проследява морфогенезата на млечната жлеза у кучето през различните периоди – ембрионален, по време на пубертета, при настъпване на бременност /с лактация/, както и нейната хормонална регулация. Акцентът е върху луминалните епителни и миоепителни клетки, както и на стромата на жлезата. Представена е ролята на предразполагащите фактори за развитието на тумори на млечната жлеза у кучето като месната храна и женските полови хормони. Проследен е процесът на канцерогенеза, характеризиращ се с нечувствителност на туморните клетки към сигналите, инхибиращи растежа, избягването на апоптозата и неограничените способности за пролиферация, инвазиране на тъканите и метастазирание. Представена е класификацията на туморите на млечната жлеза при кучето според хистологичния тип, степен на диференциация, стадий на развитие, рецепторен и генетичен статус. Акцент в литературния обзор са ендопептидазите, участващи в прогресирането и метастазирането на туморите. И по специално авторката разглежда ролята на основната серия ендопептидази – матриксните металопротеинази и тяхната регулация. Обзорът завършва с обща характеристика на инхибиторите в туморния растеж на млечната жлеза у кучето и тяхната класификация. След извършения подробен литературен обзор дисертантката решава, че не е достатъчно проучена ролята на матриксните металопротеинази – 2, 9, 14 и техния тъканен инхибитор и си поставя за цел да проследи тяхната генна експресия, локализация и активност при нормалното развитие на млечната жлеза и при тумори при кучето, което е напълно оправдано.

Шестте задачи са ясно формулирани и отговарят на поставената цел. Използваният материал е напълно достатъчен по обем. Той включва 32 тумора от 22 кучета на възраст от 7 до 16 години, постъпили за преглед и лечение в частни клиники в гр. София за периода 2012-2014 год. Същевременно е изследван и нормален паренхим от съседна млечна жлеза. Изследвани са 8 вида карциноми, злокачествен миоепителиом, фибросарком и фиброаденом на млечната жлеза. Похвално е, че е проучена палитра от редки форми на карцином и данните са съпоставени с находките при доброкачествените тумори и хиперпластичните процеси в гърдата. За осъществяване на проучването е изследван кръвен серум, богат набор от антитела за имунофенотипизиране на изследваните тумори – панцитокератин, гладкомускулен актин, виментин, p63 както и MMP-2, MMP-9, MMP-14 и TIMP-2. В дисертационния труд са описани компетентно използваните методи като желатинова зимография за проследяване активността на MMP-2 и MMP-9 и изследване на генната експресия чрез полимеразна верижна реакция в реално време - изолиране на тотална РНК от тъканен материал, определяне на количеството на РНК и обратна транскрипция в кДНК. Използването на такъв широк набор от модерни методики е гаранция за доброто качество на дисертационния труд и надеждността на получените резултати.

Експерименталните данни са подложени на статистически анализ, като е използвана описателна статистика с помощта на четири непараметрични теста, включително и корелационен анализ.

Резултатите са описани и онагледени по професионален начин. Отделните варианти на карциномите, тубуларен, тубулопапиларен, кистичнопапиларен, микропапиларен, инвазивен, комедо-карциноми, комплексен карцином са перфектно описани. Направена е диференциална диагноза между карцинома и злокачествения миоепителиом. Интерес представлява описания карцином в доброкачествен смесен тумор / смесен карцином/. Находките са съпоставени с доброкачествени неоплазми като комплексен аденом/аденомиоепителиом/, фиброаденом, както и със случаи на лобуларна хиперплазия. Съществен момент в работата заема изследването на имунохистохимичната реактивност на матриксните металопротеинази MMP-2, 9, MMP-14 и тъканния инхибитор на металопротеиназите TIMP-2. Те са изследвани в нормален паренхим и в тумори на млечната жлеза – при доброкачествени неоплазми – фиброаденом и комплексен аденом както и при тубуларен карцином, комедокарцином, комплексен карцином, смесен карцином и злокачествен миоепителиом.

Всички нозологични форми са документирани и представени по убедителен начин. Хистологичните снимки илюстрират доброто качество на извършените изследвания и сполучливото представяне на различните нозологични единици. Имунохистохимичните реакции са правилно отчетени като са съпоставени находките при злокачествените и доброкачествени лезии. Принос на работата е проследяването на динамиката на ензимната активност на MMP-2 и MMP-9 в тъканни лизати от нормален паренхим и от тумори на млечната жлеза. Проследена е промяната в генната експресия на MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 при тумори на млечната жлеза. В допълнение на хистологичната картина са представени нагледни таблици и графици, отчитащи промените в генната експресия на MMP-2, MMP-9, MMP-14. Извършеният статистически анализ е на високо ниво.

В обсъждането се подчертава, че дисертанката използва различни имунохистохимични реакции за идентифициране на миоепителни клетки/ MEK/ за по-голяма сигурност на

получените резултати, което говори за изисканост в извършването на изследването. Според авторката най-сигурни маркери за МЕК са p63 и маспин.

Принос в работата е подробното проучване и охарактеризиране на различните типове миоепителни клетки - супрабазални и интерстициални. Интересна е констатацията, че в хистогенезата на туморите на млечната жлеза у кучета по-често участват МЕК. Струва си да бъдат изследвани по-обстойно и при туморите у човека. Отчита се различната имунохистохимична реактивност между супрабазалните МЕК и интерстициалните. Промяната в реактивността при интерстициалните МЕК се свързва с епително-мезенхимна трансформация, при която епителните клетки добиват мезенхимен фенотип, който включва повишена способност за миграция, по-голяма устойчивост на апоптоза и повишено образуване на компоненти на извънклетъчния матрикс. Това съответства на дезмопластичната реакция, която наблюдаваме при карциномите у човека. Дисертантката обяснява, че понижаваната експресия на SMA, CK и p63 и повишената експресия на виментин демонстрира, че клетката е претърпяла епително мезенхимна трансформация /EMT/. Потвърждават се някои данни от литературата, че мезенхимната компонента на смесените тумори може да произхожда от миоепителните клетки, а не от стромалната съединителна тъкан, което може би не е валидно за всички случаи. Принос на работата е изследването на МЕК при различните форми на карцином. В дисертацията основателно се прави опит да се обясни ролята на МЕК и се посочват доказателства за действието на диференцираните МЕК като естествени туморни супресори. Авторката установява отслабване на реакцията на p63 в супрабазалните МЕК в злокачествените тумори в сравнение с тяхната реактивност в нормалния паренхим и доброкачествените тумори и обсъжда въпроса за техните протективни свойства. В резултат на проведените изследвания дисертантката прави извода, че МЕК в процеса на туморогенеза в някои случаи губят своята тумор супресорна функция и дори подпомагат инвазивността и метастазирането. Въпросът се дискутира в обсъждането като се отчитат данни за възможност за стимулиране на растежа и инвазията на тумора от МЕК. Ценно е съпоставянето на състоянието на МЕК в нормалната жлеза и в туморите и използването на различни имунохистохимични маркери за изследване на фенотипа на МЕК. Дисертантката проучва локализацията на MMP-2, MMP-14 както и TIMP-2 при развитието на жлезата, при бременност, лобуларна хиперплазия и различни видове тумори в епителните и МЕК. В нормалния паренхим и лобуларната хиперплазия преобладават неактивните форми на MMP-2 и MMP-9. Тяхната активност се повишава при придобиване на инвазивен фенотип. Тези изводи следва да се считат като съществени приноси на дисертационния труд. В нормалния паренхим MMP-14 е характерна за епителните, но не и за миоепителните клетки. Основен източник за TIMP-2 в нормалния паренхим и лобуларната хиперплазия са МЕК.

Авторката стига до извода, че в хистогенезата на туморите на млечната жлеза у кучета по-често участват МЕК и подкрепя становището, че туморите с миоепителна компонента имат по-добра прогноза.

В дисертационния труд е доказано понижаване на генната експресия на MMP-2, MMP-9, MMP-14 и TIMP-2 при лобуларна хиперплазия при кучето. Установена е корелация в генната експресия на MMP-2, MMP-14 и TIMP-2 при туморите на млечната жлеза на кучето. Това са оригинални приноси на дисертационния труд.

Отделно са дискутирани резултатите от желатиновата зимография чрез която се идентифицират активните и неактивни форми на MMP-9 с тяхното молекулно тегло.

При сравнение на желатинолитичната активност в различните тумори на гърдата се констатира разлика единствено между доброкачествените и злокачествени инвазивни тумори. Авторката основателно стига до извода, че активирането на MMP- 9 зависи от хистологичния тип на тумора. Съществува положителна корелация в генната експресия на MMP-2, MMP-14 и TIMP-2 при туморите на млечната жлеза при кучето..Повишената активност на желатиназите предоставя морфологични доказателства за инвазиране на стромата.Това действително потвърждава тезата,че преминаването на интрадукталния карцином ин ситу в инвазивен рак се предшества от промени на молекулярно ниво.

На високо ниво е изследвана генната експресия.Проучени са 14 кандидат референтни гена като са изследвани 22 проби от нормална млечна жлеза и 22 проби от тумори /доброкачествени и злокачествени/. Компетентно е отчетена промяната в генната експресия на различните ендопептидази като не се отчитат различия при неинвазивните и инвазивни тумори. Дисертантката съпоставя собствените резултати с данните от литературата у млади жени при които се сочи, че над 90% от промените в генната експресия настъпват рано преди развитието на хистологично доказан карцинома ин ситу. При изследването на генната експресия на MMP-2, MMP-9, MMP-14 и TIMP-2 при аденоза, тубуларен и смесен карцином,трите най-често срещани хистологични типове дисертантката намира различия между аденозата и карцинома,както по отношение на двете желатинази така и по отношение на MMP-14. Така се доказва, че при доброкачествените процеси генната експресия е понижена , а при туморите и по-специално при смесените карциноми е повишена, което е важен диференциалнодиагностичен белег.

Изводите произтичат от дисертационния труд и могат да се отчитат като приноси на дисертантката по отношение на пълната имунохистохимична характеристика на различните типове МЕК. Доказано е участие на интерстициалните МЕК в прогресирането на инвазивните тумори с миоепителна компонента.Тя установява,че повишената ензимна активност предшества появата на морфологични данни за инвазивност при тумори на млечната жлеза у кучето .

Приемам напълно самооценката на дисертанката за приносите в дисертационния труд.

Авторката има 34 публикации, 2 от които са свързани с дисертацията, четири доклада, свързани с дисертационния труд и едно участие в научен проект.

ДИСЕРТАЦИОННИЯТ ТРУД Е РЕАЛИЗИРАН НА ВИСОКО НИВО С ГОЛЯМ НАБОР ОТ СЪВРЕМЕННИ МОДЕРНИ МЕТОДИКИ, ИЗПОЛЗВАН Е ДОСТАТЪЧЕН МАТЕРИАЛ , НАПРАВЕНИ СА ЦЕННИ ИЗВОДИ, ИМА ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ И СЛЕДВА ДА ПОЛУЧИ ПОЛОЖИТЕЛНА ОЦЕНКА.

ТРУДЪТ ОТГОВАРЯ НАПЪЛНО С ВСИЧКИ СВОИ КАЧЕСТВА НА ИЗИСКВАНИЯТА НА ЗАКОНА ЗА НАУЧНИТЕ СТЕПЕНИ И ЗВАНИЯ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И НАУЧНА СТЕПЕН "ДОКТОР" НА НЕГОВИЯ АВТОР – ДОКТОР ДЕСПИНА ВАИЦИ ПУПАКИ И УБЕДЕНО ПРЕДЛАГАМ НА УВАЖАЕМОТО НАУЧНО ЖУРИ ДА ГЛАСУВА ПОЛОЖИТЕЛНО ЗА НЕЙНИЯ ИЗБОР.

28.11..2016 г.

Изготвил рецензията :.....

/проф.д-р Цана Петрова Бошнакова – Празникова,дмн/