

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО**

**„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“**

**Лаборатория по Репродуктивни ОМИКс технологии**

---

**Илка Цветанова Цветкова-Иванова**

**„Изследвания на механизмите на клетъчна смърт и ролята на ефектора Gasdermin D, при индукция на инфламазомата NLRP3.**

**Значение за нарушение на мъжкия фертилитет“**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

---

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

**Научна специалност „Имунология“**

**Шифър 01.06.23**

**Научен ръководител:**

**Проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн**

София, 2024

Дисертационният студ съдържа **136** страници и е онагледен с **3** схеми, **1** диаграма и **40** фигури. Библиографията включва **213** литературни източници, всички на английски език.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... 2024г. от ..... часа, в заседателната зала на ИБИР-БАН, бул. Цариградско шосе № 73, София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред **Научното жури в състав:**

**Членове:**

Проф. Пламен Тодоров, дбн

Доц. д-р Велислава Терзиева, дм

Проф. Росица Конакчиева, дбн

Акад. Богдан Петрунов, дмн

Акад. Румен Панков, дбн

**Резервни членове:**

Доц. Диана Зашева, дб

Доц. Йордана Тодорова, дб

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, бул. Цариградско шосе № 73, София, както и на интернет страницата на ИБИР: <https://ibir.bas.bg/>.

*Забележка: Номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.*



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. КИРИЛ БРАТАНОВ“**

**Лаборатория по Репродуктивни ОМИКс технологии**

---

**Илка Цветанова Цветкова-Иванова**

**„Изследвания на механизмите на клетъчна смърт и ролята на  
ефектора Gasdermin D, при индукция на инфламазомата NLRP3.  
Значение за нарушение на мъжкия фертилитет“**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

---

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

**Научна специалност „Имунология“**

**Шифър 01.06.23**

**Научен ръководител:**

**Проф. д-р Сорен Хайрабедян, дбн**

София, 2024

## СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Увод.....	5
2. Цел и задачи.....	6
3. Материали и методи.....	7
4. Резултати и обсъждане.....	9
5. Изводи.....	41
6. Приноси на дисертационния труд.....	42
7. Списък с научните статии, свързани с дисертационния труд.....	43
8. Списък с участия на научни форуми във връзка с дисертацията.....	43

## *Използвани съкращения на английски език:*

<b>AMPK</b> -	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
<b>ASC</b> -	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
<b>HMGB1</b> -	High mobility group box protein 1
<b>MAPK</b> -	Mitogen-activated protein kinases
<b>AIM</b> -	Интерферон-индуцируем протеин, липсващ при меланома
<b>Araf-1</b> -	Апоптоза-активиращ фактор 1
<b>ATP</b> -	Аденозинтрифосфат (АТФ)
<b>Bcl-2</b> -	В-клетъчен лимфом 2
<b>Cyt c</b> -	Цитохром с
<b>DAMP</b> -	Молекулни модели, свързани с увреждане
<b>GSDM</b> -	Газдермин (Gasdermin)
<b>IER3</b>	Незабавен ранен отговор 3
<b>IL-1<math>\alpha</math>; <math>\beta</math></b> -	Интерлевкин-1 алфа; бета
<b>LPS</b> -	Липополизахарид
<b>MAPK</b> -	Митоген-активирана протеин киназа
<b>NF-<math>\kappa</math>b</b> -	Ядрен фактор- $\kappa$ b
<b>NGF</b>	Нервен растежен фактор
<b>NK</b> -	Естествени клетки убийци
<b>NLR</b> -	Нуклеотид-свързващ олигомеризационен домен, богат на левцинови повтори
<b>NLRP3</b> -	Съдържащ NACHT, LRR и PYD домени, протеин 3, аналог на човешкия NALP3
<b>NOD</b> -	Нуклеотид-свързващ олигомеризационен домен
<b>PAMPs</b> -	Патогенно-свързани молекулни модели
<b>ROS</b> -	Реактивни кислородни видове
<b>siRNA</b> -	Малка интерферираща РНК
<b>TNF<math>\alpha</math></b> -	Тумор некрозиращ фактор $\alpha$

## 1. УВОД

С навлизането на методите за асистирана репродукция в последните години става ясно, че силно нараства процентът на „мъжки фактор“ при двойките с репродуктивни проблеми. В голяма степен причините може да бъдат в следствие от механична увреда (травма), прекарано инфекциозно заболяване, или с неизяснен характер. При нормални условия, кръвно-тестисна бариера създава имунологично-толерантна среда, подходяща за зреещите сперматиди. Травми или инфламаторно увреждане на тестиса могат да доведат до нарушаване целостта на тази бариера.

Сертолиевите клетки са сред основните участници, съхраняващи и предпазващи половите клетки. Със своите плътни контакти участват в кръвно-тестикуларна бариера, създавайки ниша в тестисите, формираща имунно-превилигирана среда, а чрез сложна хормонална регулация се осигурява нормалното формиране на гонадите. Различни фактори на средата биха могли да нарушат тези процеси. Освен в имунни клетки, се изясняват процеси в клетките на Сертоли, водещи до клетъчна увреда с ефект върху тази толерантна среда. Наличието на каспази и възможността за отделяне на възпалителни цитокини, провокирано от продължителни възпалителни реакции, биха могли да доведат до нарушение на техните функции, засягащи глобално възможността за правилно протичане на сперматогенезата. Активирането на апоптотичните пътища е пощадящият път за клетъчна смърт, водеща до предпазване на съседни клетки, но силни възпалителни процеси и невъзможността на клетката да се справи с инфекциозен агент, водят до активацията на пироптотични такива, провокиращи съседни или имунни клетки. Медирана от газдермини пироптоза насърчава изчистването на патогените и може да помогне за възстановяване на хомеостазата, но нерегулираната пироптоза е в основата на много болестни състояния, медирани от възпаление. Автоимунната реакция към антигени срещу половите клетки, са една от възможните причини за стерилитет. Поради тази причина, е необходимо проследяването на вида клетъчна смърт, настъпваща в следствие от активиране на про-апоптотични и про-пироптотични каспази, тяхната взаимовръзка и път на активация.

## 2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### Цел:

Целта на настоящия дисертационен труд бе да се изследват механизмите на клетъчна смърт в клетки на Сертоли и свързаните с тях сигнални пътища, включващи основните каспази и Gasdermin D.

### Задачи:

За изпълнението на поставената цел, бяха определени следните задачи:

1. Проследяване типа клетъчна смърт, възникнала след сигнали за опасност LPS и АТР, връзка с про-пироптоичната каспаза-1 и про-апоптотичната каспаза-3.
2. Изследване влиянието на оста Nlrp3-Asc върху настъпването на клетъчна смърт и върху каспаза-1 и каспаза-3.
3. Проследяване на клетъчна сигнализация, в резултат на активиране на рецептори за патоген-асоциирани молекулни сигнали, посредством нанопорово транскриптомно профилиране.
4. Доказване на връзката на рецептора CD300a с каспаза-1 и каспаза-3.
5. Изследване на участието на GSDMD в каноничния инфлазобен път Nlrp3-Asc и връзката му с рецептора CD300a.
6. Изследване на връзката на GSDMD с каспаза-1 и каспаза-3.
7. Изследване на индукцията на макроавтофагия и митофагия във връзка със сигнали за опасност като LPS.

### 3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Материали

1.1. Клетъчна линия 15P-1

1.2. Хранителни среди за клетъчно култивиране

1.3. Ензим акутаза (Accutase - Sigma-Aldrich)

1.4. Трансфекция

1.4.1. Синтетични малки интерфериращи РНК-и (siRNAs)

1.4.2. Трансфектант

1.5. Лиганди на рецептори от системата на вродения имунен отговор

1.6. Сигнал за активиране на инфламазомата – ATP

1.7. Активатор на NOD1 рецептора – iE-DAP

1.8. Кит за детекция активността на каспаза-1

1.9. Кит за детекция активността на каспаза-3

1.10. Бои за маркиране на тип клетъчна смърт

1.10.1. Про-пироптоичен маркер PI (Propidium Iodide)

1.10.2. Про-апоптоичен маркер Annexin V FITC-conjugated и Annexin V APC-conjugated APC

1.10.3. Про-апоптоичен маркер Yo-pro-1 Iodide

1.11. Кит за детекция на активен GSDMD (Abcam)

1.12. Кит за детекция на С-терминалния фрагмент на GSDMD

1.13. Праймери за RT-qPCR

1.14. Кит за изолиране на тотална РНК и синтез на копи ДНК

1.15. Кит за пречистване на РНК-и и кДНК-и

1.16. Кит за нанопорово секвениране на кДНК

#### 2. Методи

- 2.1. Клетъчно култивиране
- 2.2. Криоконсервация на клетъчната линия 15P-1 за целите на дълготрайно клетъчно култивиране, и под формата на суха утайка, за последващо изолиране на тотална РНК за целите на RT-qPCR
- 2.3. Проточна флуоцитометрия
- 2.4. Обратно-транскриптазна количествена полимеразно-верижна реакция (RT-qPCR)
- 2.5. Нанопорово секвениране на сертолиеви клетки 15P-1
- 2.6. Отчитане количеството на активен GSDMD, посредством ELISA метод
- 2.7. Отчитане количеството на С-терминалния фрагмент на GSDMD, посредством ELISA метод
- 2.8. Активиране на макроавтофагия и митофагия в условия на гладуване в сертолиеви клетки
- 2.9. Отчитане каспазна активност и клетъчна смърт на флуоресцентен инвертен микроскоп
- 2.10. Статистически анализ на брой клетки, претърпели клетъчна смърт
- 2.11. Статистически анализ



#### 4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

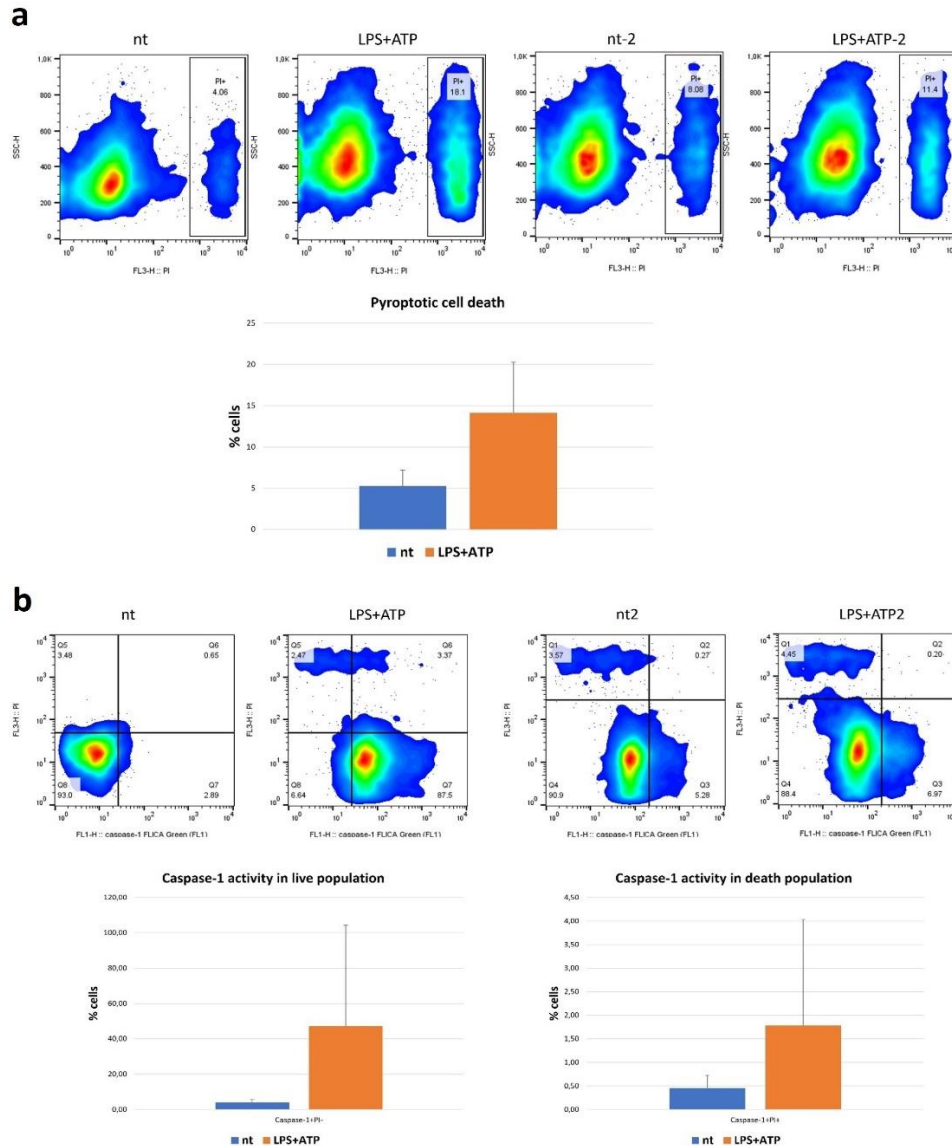
##### *Активацията на TLR4 и инфламазомата Nlrp3 в контекста на клетъчна смърт и активност на каспазите*

В настоящия дисертационен труд бе изследван типът клетъчна смърт в клетки на Сертоли, от полово зрели мишки Balb/c. Основният въпрос беше дали клетъчната смърт е резултат само от активацията на каспаза-1 през инфламазомата Nlrp3 или има по-комплексен характер.

Сертолиевите клетки са абсолютно необходими за правилното развитие и жизнеспособност на зародишните клетки (сперматозоидите). Сертолиевите клетки дирижират процесите на сперматогенезата, чрез осигуряване на хранителни вещества за развиващите се зародишни клетки, формират кръвно-тестисната бариера, посредством плътните контакти по между им, като по този начин разделят зародишния епител на базално и луминално пространство. Регулират освобождаването на зрели сперматиди (процес, известен като спермиация), осъществяват секреция на флуиди, протеини, енергийни субстрати и растежни фактори и осъществяват фагоцитоза на дегенеративните зародишни клетки (Murphy et al., 2014).

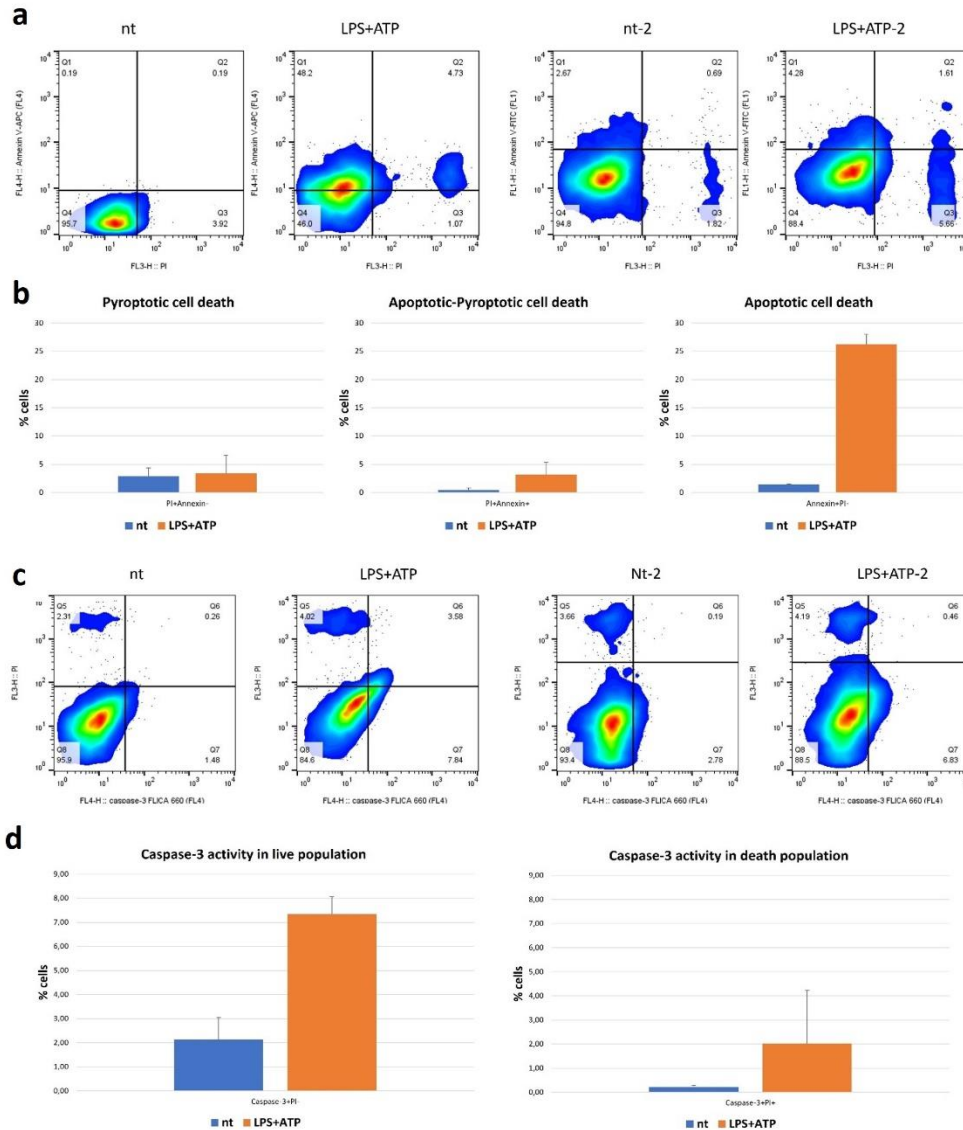
Досегашните изследвания в световната литература проследяват предимно експресията на рецепторите на вродената имунна сигнализация в неимунни епителни клетки, разположени върху лигавиците при човека и другите бозайници. Съществуват единични съобщения, показващи възможността инфламазомите да се експресират и да са функционални в неимунни клетки. Инфламазомите NALP1 и NALP3 са открити в различни човешки епителни клетки (Feldmeyer et al., 2007), включително в клетки на тестиса (Kummer et al., 2007), превръщайки този тип изследвания в такива с транслационно значение. В скорошни изследвания, стимулацията с LPS индуцира Nlrp3 и РНК в тестиса на мишки с фенотип С3Н/HeN (González-Benítez et al., 2008). Наскоро бе доказано, че инфламазомата Nlrp3 не само се експресира в клетки на Сертоли в полово зрели мишки, но е и функционално активна, т.е. след подходящ “priming” (предварителна активация) и след стимулирането на рецептори на вродената имунна сигнализация, като NOD1, NOD2 и TLR4. Последваща индукция на транскрипционния фактор NK-kB води до повишена експресия на инфламазомния транскрипт, в резултат на което се осъществява протеиновата му експресия и активация на каспаза-1 по Nlrp3-зависим механизъм, с последващо срязване до зряла форма на цитокина IL-1 $\beta$ , секрецията му и

паралелно с това клетките претърпяват клетъчна смърт по АТФ-доза-зависим път, вероятно с активирането на каспаза-1 (S. Naugabedian et al., 2016). По-късно бе показан подобен феномен на експресия и в човешки сертолиевы клетки (Walenta et al., 2018). Основен ефектор от активирането на функционалната Nlrp3 инфламазома, ключов компонент от каноничния път на възпаление, е каспаза-1. Активирането на каспаза-1 (Caspase-1) става с протеолитичното ѝ срязване, дължащо се на формирането на мулти-протеинов комплекс от множество повтарящи се комплекси от активен платформен инфламазомен протеин и адапторен протеин Asc (X. Liu & Lieberman, 2017). Въпреки, че основните стъпки по функционалното активиране на инфламазомата Nlrp3, с последващата активация на каспаза-1 и срязването и секрецията на IL-1 $\beta$  бяха доказани, остават все още неизяснени подробности за механизма на активация и за евентуалната допълнителна регулация по отношение на активирането на каспаза-1. Този феномен е от особено голямо значение, т.к. каспаза-1, освен като медиатор за цитокини, има роля и в индуциране на канонична програмирана клетъчна смърт, известна при макрофагите, като пироптоза (Bergsbaken et al., 2009). Наши данни от активирането на TLR4 чрез LPS за 24 часа и АТФ за 2 часа, в клетъчна линия 15P-1 на сертолиевы клетки, потвърждават активацията на каспаза-1 и настъпването на пироптоична клетъчна смърт. Проследявайки маркера за пироптоична клетъчна смърт (PI) бе установено, че в условия на третиране с LPS+АТФ, броят на клетките, претърпели клетъчна смърт значително се завишава (**Фиг. 1**). Освен това, индукцията с LPS и АТФ води до силно завишаване на процента клетки, в които има активна каспаза-1 със значително по-голям процент живи клетки, отколкото мъртви.



**Фиг.1. Проточна флоуцитометрия на клетъчна линия 15P-1, проследяваща настъпването на про-пироптоична клетъчна смърт и активирането на каспаза-1, след третиране с LPS и АТР. a - Анализ на фенотипа на клетъчната смърт чрез оцветяване с PI (FL3-PI, оста x), съотнесено към еднородност на клетките (SSC-H, оста y) и схематично изобразяване на процента клетки (% cells), претърпели про-пироптоична клетъчна смърт (PI+) в двете условия – на нетретираните клетки и след стимулация с LPS+АТР. b - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1), спрямо настъпването на пироптоична клетъчна смърт чрез оцветяване с PI (FL-3) в двете условия. Четирите типа популации, които се отдиференцират са: негативна за каспазна активност и жива (Caspase-1-PI-), популация, в която се наблюдава каспазна активност, но клетките са все още живи (Caspase-1+PI-), клетки, в които се детектира активна каспаза-1 и са претърпели пироптоична клетъчна смърт (Caspase-1+PI+), и клетки, претърпели пироптоична клетъчна смърт, но не се наблюдава каспазна активност (Caspase-1-PI+).**

Наличието, обаче на активна каспаза-1 не само в пироптоични клетки, но и в интактни клетки, предполага друг тип клетъчна съдба. Съществуват данни за активиране на каспаза-3 по каспаза-1 зависим или каспаза-1 независим път (Taabazuing et al., 2017).



**Фиг. 2.** Проточна флоуцитометрия, проследяваща активирането на различен вид клетъчна смърт и наличието на каспаза-3, след третиране с LPS за 24 часа и ATP за 2 часа. **a** - Анализ на пироптоична клетъчната смърт чрез оцветяване с PI (FL3-PI, оста x) и на апоптоична клетъчна смърт, чрез оцветяване с Annexin (оста y). Настъпването на различен тип клетъчна смърт се проследява в две условия – на нетретираните клетки (nt) и след стимулация (LPS+ATP). Живите клетки са отрицателни, както за Annexin, така и за PI. Клетки, в които има активиран апоптоичен път, са позитивни по Annexin, а тези, при които има активиран пироптоичен път, са позитивни по PI. Популацията от клетки, която е двойно позитивна по Annexin и PI, се означава като претърпяла апоптоична-пироптоична клетъчна смърт. **b** - Схематично изобразяване на

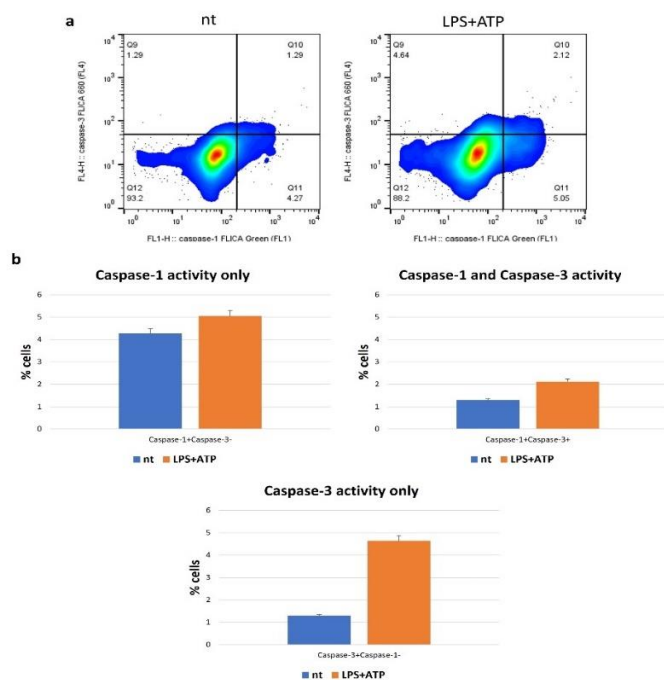
процента клетки (% cells), претърпели пироптотична (PI+), апоптична (Annexin+) или апоптична-пироптотична клетъчна смърт (Annexin+PI+), в двете условия. **c** - Анализ на активността на каспаза-3 (Caspase-3, FL-4), спрямо настъпването на пироптотична клетъчна смърт чрез оцветяване с PI (FL-3). В две условия, се разглеждат 4 популации от клетки. Популация, която е негативна за каспазна активност и е жива (Caspase-3-PI-), популация с каспазна активност, но клетките са все още живи (Caspase-3+PI-). Клетки, в които се детектира активна каспаза-1 и са претърпели пироптотична клетъчна смърт (Caspase-3+PI+) и претърпели пироптотична клетъчна смърт, но без да се наблюдава каспазна активност (Caspase-3-PI+). **d** - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-3 и са живи, спрямо тези, които са претърпели клетъчна смърт в двете условия – на нетретирани клетки и след стимулация с LPS+ATP.

По отношение на разпределението на типа клетъчна смърт се наблюдава, че преимуществено пътят се измества в полза на апоптотичния, в сравнение с пироптотичния (**Фиг. 2**). Интересно е, че се наблюдават и малък процент клетки, при които са активирани и двата пътя – апоптоза и пироптоза.

***Активация на каспаза-1 и каспаза-3 в условия на Nlr3 инфлазозна активация.***

Каноничните инфлазозми са мултипротеинови комплекси, които могат да активират както каспаза-1, така и каспаза-8. Каспаза-1 задвижва бърз лизис на клетки чрез пироптоза и отделяне на IL-1 $\beta$  и IL-18. В клетките с дефицит на каспаза-1, образуването на инфлазозма при инфекция с патоген, също може да доведе до настъпване на клетъчна смърт, чрез активиране на каспаза-3 и насочване към апоптоза. Като апикална каспаза, чрез своя DED домен, каспаза-8 може ефикасно да свърже Asc, след което да активира каспаза-3. При макрофаги с дефицит на каспаза-8, може да настъпи пироптоза и секреция на IL-1 $\beta$  от активирането на каспаза-1, през инфлазозмата AIM2 (Sagulenko et al., 2018).

В условия на активиран инфлазозмен път, чрез добавяне на LPS за 24 часа и ATP за 2 часа, наличието на активни каспази значително се завишава (**Фиг. 3**). Наличието на каспаза-3 в контекста на клетъчна смърт, след активиране на инфлазозмния път показва връзката ѝ с каноничния път на активиране на пироптозата.

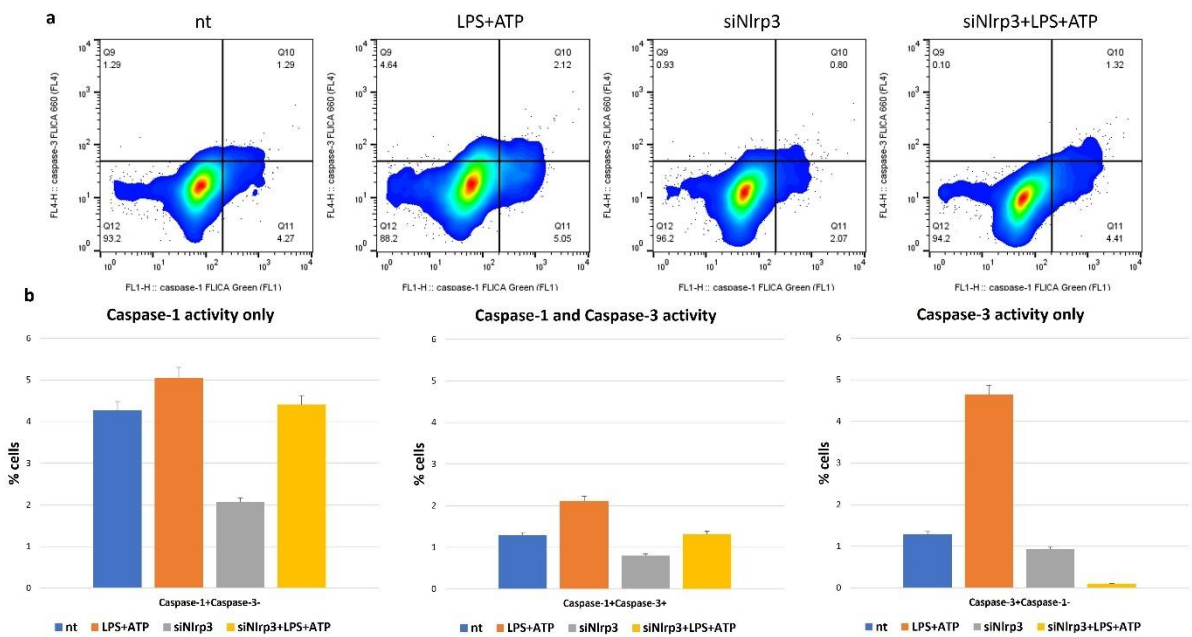


**Фиг. 3.** Флоуцитометрично проследяване активността на каспаза-1 и каспаза-3, след индуциране на инфламазомния път. **a** - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1), спрямо активността на каспаза-3 (FL-4) в две условия – на нетретирани клетки (nt) и след стимулация (LPS+ATP). Популацията от клетки, в която няма изявена каспазна активност (Caspase-1-Caspase-3-), популация, в която се наблюдава наличието само на активна каспаза-1 (Caspase-1+Caspase-3-).

Клетки, в които се детектират едновременно активна каспаза-1 и каспаза-3 (Caspase-1+Caspase-3+) и клетки, при които се наблюдава наличието само на активна каспаза-3 (Caspase-1-Caspase-3+). **b** - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1, каспаза-3 или едновременно и двете в условия на нетретирани клетки, и след стимулация с LPS+ATP.

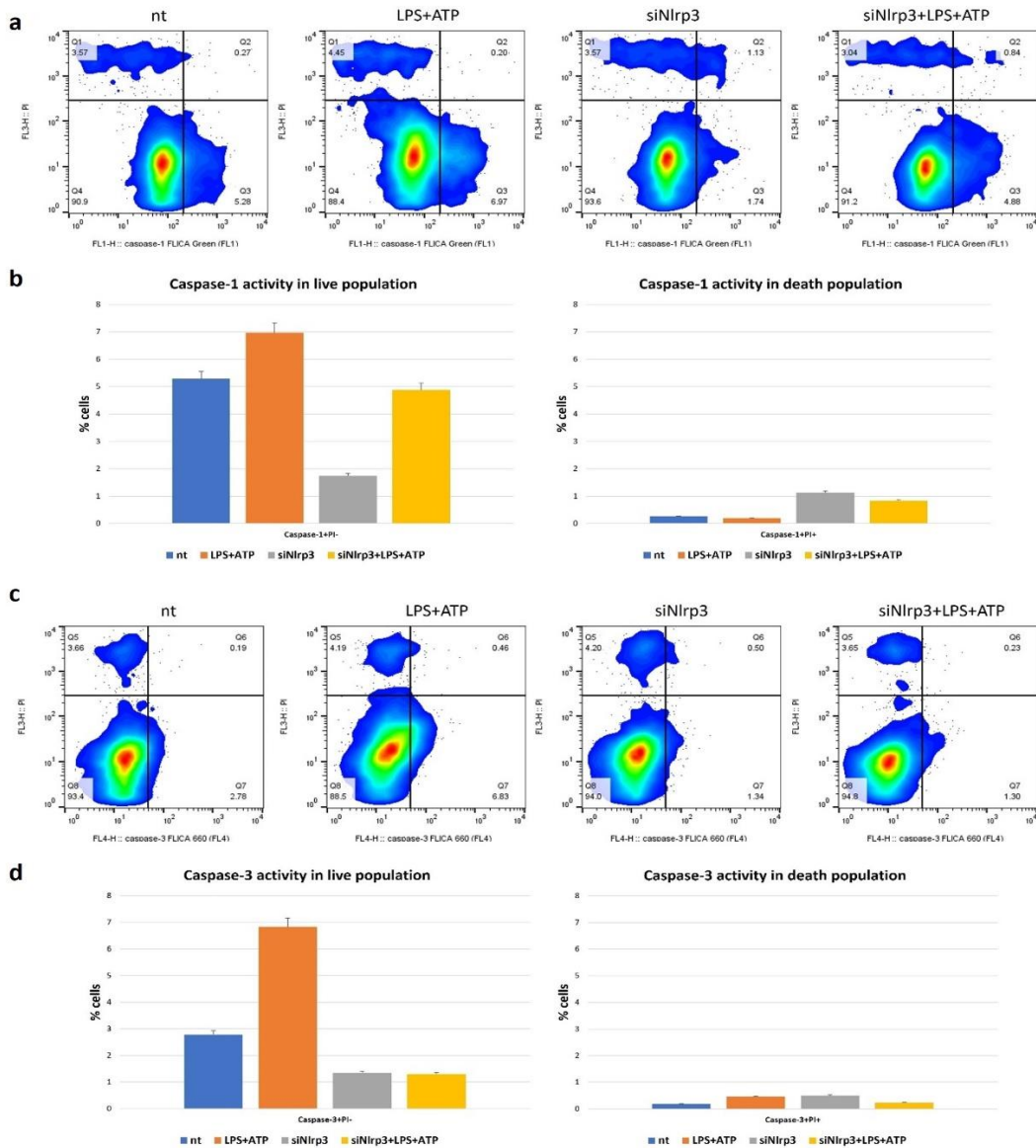
*Проследяване влиянието на експресията на инфламазомата Nlrp3 върху активацията на каспаза-1 и каспаза-3, чрез флуоресцентна детекция на активната им форма в клетки на Сертоли, след стимулация на рецептора TLR4 с LPS и активация с ATP*

Активирането на каспаза-1 и каспаза-3 от инфламазомния път поставя въпроса какъв ще е ефектът на инфламазомата върху тях. Активацията с LPS и ATP води до завишаване процента на клетки с активни каспази – самостоятелно или едновременно, като най-значително е завишаването при активацията на каспаза-3 (**Фиг. 4**). Трансфекцията със siRNAs за инфламазомата Nlrp3 води до занижаване процента на активни по каспаза-1 и -3 клетки с най-осезаем ефект върху активността на каспаза-3.



**Фиг. 4. Флоуцитометрично отчитане действието на инфламазомата Nlrp3 върху активността на каспаза-1 и каспаза-3. а** - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1), спрямо тази на каспаза-3 (FL-4), в четири условия – на нетретирани клетки (nt), след стимулация (LPS+ATP), в условия на трансфектирани клетки (siNlrp3) и след стимулация, в условия на трансфекция (siNlrp3+LPS+ATP). Популацията от клетки, в която няма изявена каспазна активност (Caspase-1-Caspase-3-), а тази популация, в която се наблюдава наличието само на активна каспаза-1 (Caspase-1+Caspase-3-). Клетките, в които се детектират едновременно активна каспаза-1 и каспаза-3 (Caspase-1+Caspase-3+), а клетките, при които се наблюдава наличието само на активна каспаза-3 (Caspase-1-Caspase-3+). **б** - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1, каспаза-3 или едновременно и двете в четирите условия.

Индукцията с LPS и ATP води до значителна каспазна активност, но когато клетките са все още интактни. Инфламазомата Nlrp3 потечирира активността на каспаза-1 само в интактните клетки (Фиг. 5b). Предварителното заглушаване на Nlrp3 води до значително занижаване на каспазната активност, която след това не се повлиява от активиращите сигнали LPS и ATP. Активацията води до завишаване каспазната активност и при клетките, претърпели клетъчна смърт, но заглушаването на инфламазомата Nlrp3, отменя този ефект при клетките, навлезли в пироптоза. В условия на активиран пироптогичен път, с последваща клетъчна смърт, заглушаването на инфламазомата води до най-висок процент клетки с активна каспаза-3 (Фиг. 5d).



**Фиг. 5. Флоуцитометрично отчитане действието на инфлазомата *Nlrp3* върху активността на каспаза-1 и на каспаза-3, в контекста на клетъчна смърт. а - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1) и с - на активността на каспаза-3 (FL-4), спрямо настъпването на пироптоична клетъчна смърт, чрез оцветяване с PI (FL-3) , в четири условия – на нетретирани клетки (nt), след стимулация (LPS+ATP), в условия на трансфектирани клетки (siNlrp3) и след стимулация, в условия на трансфекция (siNlrp3+LPS+ATP). Популацията, която е негативна за каспазна активност и е жива (Caspase-1-PI- / Caspase-3-PI-), популация, в която се наблюдава каспазна активност, но клетките са все още живи (Caspase-1+PI- / Caspase-3+PI-). Клетките, в които се детектира активна каспаза и са претърпели пироптоична клетъчна смърт (Caspase-1+PI+ / Caspase-3+PI+) и претърпели пироптоична клетъчна смърт, но без да се наблюдава каспазна активност (Caspase-1-PI+ / Caspase-3-PI+). Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1 (b) или каспаза-3 (d) и са живи, спрямо тези, които са претърпели клетъчна смърт, в четирите условия.**

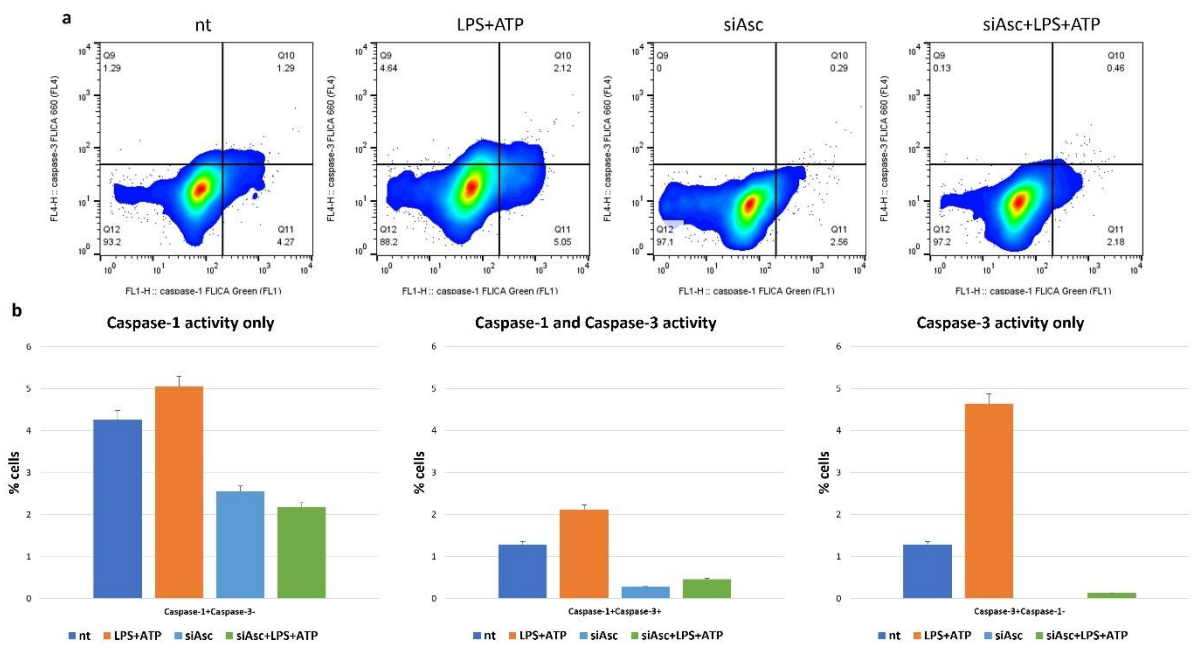


Възможността за регулация на каспаза-1 през инфлазомата AIM2 би обяснила получените от нас данни за наличие на каспазна активност в клетки, в които оста Nlrp3-Asc е блокирана. Но остава неясно защо се наблюдава активност на каспаза-1 в нашите сертолиевы клетки, когато е блокиран каноничният ѝ път на активация, през Nlrp3 и Asc. Като основен сензор за LPS често се приема TLR4. Установено е обаче, че каспаза-11 също може да има селективна роля при разпознаването на LPS в цитоплазмата, в резултат на което може да индуцира освобождаването на IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-18, съответно да медира пироптозата.

Чрез наличието на CARD домен в каспаза-11 се предполага, че протеин, съдържащ CARD, може да функционира като рецептор нагоре по веригата, който директно да свързва LPS, което е установено и при каспаза-4 и каспаза-5 (Man & Kanneganti, 2016). Имайки предвид възможността за директна активация на каспаза-11 от LPS, можем да предположим, че наличието на каспаза-1 би било в следствие от активирането на този алтернативен път.

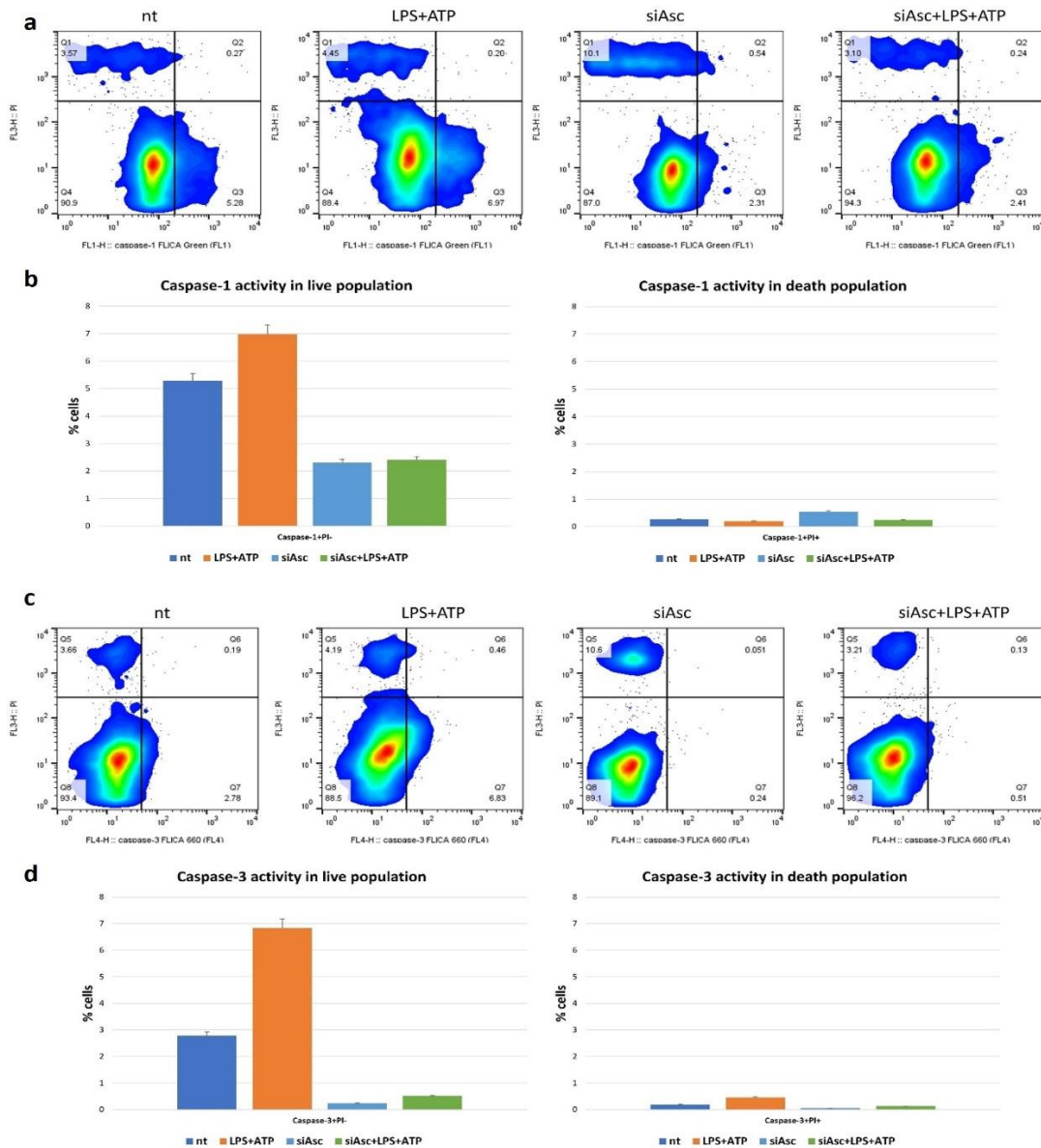
*Проследяване влиянието на експресията на адапторния протеин ASC върху активацията на каспаза-1 и каспаза-3, чрез флуоресцентна детекция на активната им форма в клетки на Сертоли, след стимулация на рецептора TLR4 с LPS и активация с ATP.*

Възможността за активиране на каспаза-1 от друга инфлазома показват и данните ни, в които се наблюдава каспазна активност, но при заглушен Asc. Трансфекцията със siRNAs за адапторния протеин ASC води до занижаване процента на активни по каспаза-1 и -3 клетки, а когато е само каспаза-3, не се наблюдава активност (Фиг. 6). Тези предположения биват подкрепени и от литературни данни в Balb/c мишки и макрофаги C57BL/6, в които след стимул от LPS и ATP се активира каспаза-1 от инфлазомата NLRP1b. Това се осъществява чрез нейното убиквитиниране, което се случва независимо от експресията на ASC. Процесът включва автопротеолиза на каспаза-1, отделяне на IL-1 $\beta$  и настъпване на пироптоза (Van Opendenbosch et al., 2014).



**Фиг. 6. Флоуцитометрично отчитане действието на инфлазомата Nlrp3 върху активността на каспаза-1 и каспаза-3. а** - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1), спрямо тази на каспаза-3 (FL-4), в четири условия – на нетретирани клетки (nt), след стимулация (LPS+ATP), в условия на трансфектирани клетки (siNlrp3) и след стимулация, в условия на трансфекция (siNlrp3+LPS+ATP). Популацията от клетки, в която няма изявена каспазна активност (Caspase-1-Caspase-3-), се наблюдава в Q12. Тази популация, в която се наблюдава наличието само на активна каспаза-1 (Caspase-1+Caspase-3-), се отделя в Q11. Клетките, в които се детектират едновременно активна каспаза-1 и каспаза-3 (Caspase-1+Caspase-3+), се намират в Q10. Клетките, при които се наблюдава наличието само на активна каспаза-3 (Caspase-1-Caspase-3+), се отделят в Q9. **б** - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1 или каспаза-3 самостоятелно, или едновременно и на двете, в четирите условия.

Когато се вземе предвид клетъчната смърт, предварителното заглушаване на ASC, при интактните клетки, води до два пъти по-малък процент на активност по каспаза-1, в сравнение с нетретирани клетки, а активацията с LPS+ATP не възстановява нивата (Фиг. 7b). Напълно обратен ефект се наблюдава при клетките, които са претърпели клетъчна смърт, където най-висок е процентът спрямо каспаза-1, когато има предварителна трансфекция със siRNAs за ASC, а активацията с LPS+ATP отменя този ефект. Ефектът на Asc върху активността на каспаза-3, чрез заглушаването му води до категорично блокиране на каспазната активност, независимо дали има активиращ сигнал (Фиг. 7d).



**Фиг. 7.** Флоуцитометрично отчитане действието на адапторния протеин Asc върху активността на каспаза-1 и на каспаза-3, в контекста на клетъчна смърт. **a** - Анализ на активността на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1) и **c** - на активността на каспаза-3 (FL-4), спрямо настъпването на пироптоична клетъчна смърт, чрез оцветяване с PI (FL-3), в четири условия – nt, след стимулация, в условия на трансфектирани клетки и след стимулация, в условия на трансфекция. Популациите, които се отдиференцират са: негативна за каспазна активност и жива (Caspase-1-PI- / Caspase-3-PI-), интактна популация с каспазна активност, (Caspase-1+PI- / Caspase-3+PI-), клетки, в които се детектира каспаза и са претърпели пироптоична клетъчна смърт (Caspase-1+PI+ / Caspase-3+PI+) и претърпели пироптоична клетъчна смърт, но без каспазна активност (Caspase-1-PI+ / Caspase-3-PI+). Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активизиране на каспаза-1 (**b**) или каспаза-3 (**d**) и са живи, спрямо тези, които са претърпели клетъчна смърт, в четирите условия.

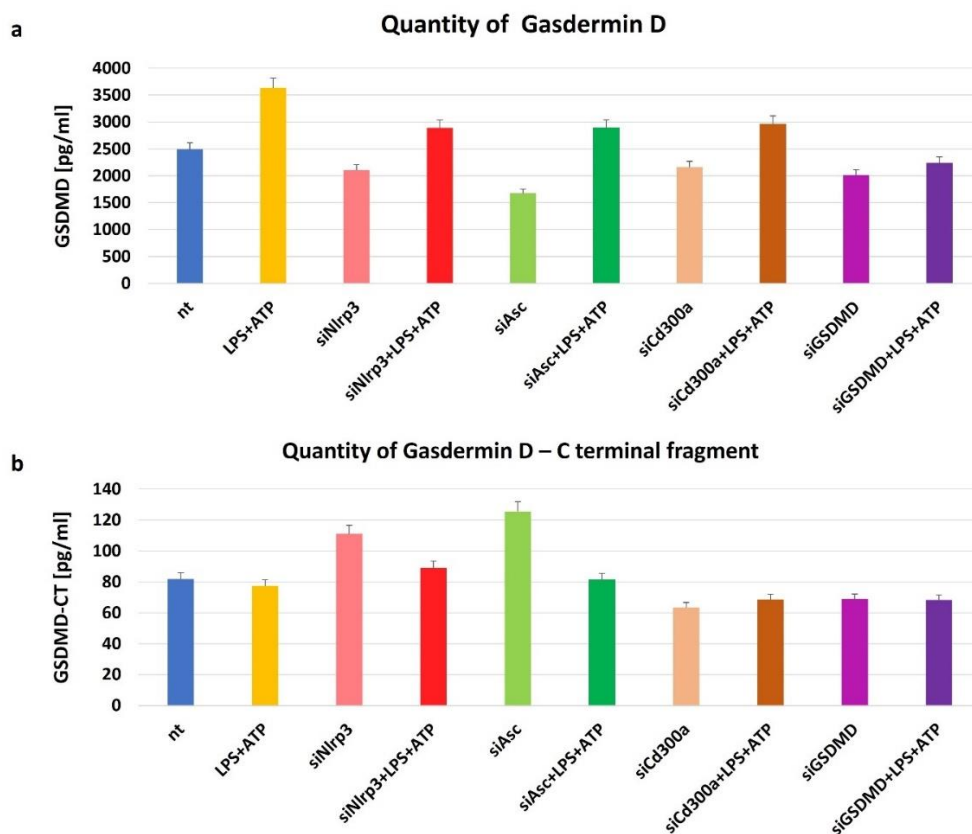
Съществуват данни за освобождаване на по-ниски дози IL-1 $\beta$ , когато каспаза-8 е блокирана, но са налични стимули като LPS прайминг, последвано от АТР или нигерицин. Това определя роля на каспаза-8 като алтернативен път за възпалителен отговор. Но когато, по някакъв механизъм е блокиран пироптоичния път надолу и не е възможно да се активира каспаза-8, каспаза-1 също може да активира каспаза-3 (Sagulenko et al., 2018). Освен това, апоптоичният път при клетки, в които липсва GSDMD, може да се инициира от каспаза-1, по пътя на NLRP3 и ASC (He et al., 2015). Това активиране на каспаза-3 от каспаза-1 показва, че инфламазомите активират мрежа от каспази, стимулиращи както пироптоична, така и апоптоична клетъчна смърт. Когато бързата пироптоза е блокирана, настъпва апоптоична забавена клетъчна смърт, под действието на инфламазомно активирани каспаза-1 или каспаза-8 (Sagulenko et al., 2018). Според направените от нас изследвания, се установява, че в клетките на Сертоли е преимуществено активиран апоптоичния път. За неговото осъществяване играе важна роля каспаза-3. Освен това, нейната активност се повлиява по инфламазомно-зависим механизъм и наличието както на Nlrp3, така и на Asc. Освен това, данни за възходящата роля на каспаза-1 от каспаза-3 и -7 е установена in vivo в макрофаги, където премахването на каспаза-1, при условия на активация с LPS и АТР, не води до активация на каспаза-7. По този начин е доказана каскадната връзка NLR-каспаза-1-каспаза-7 в макрофаги, с наличието на алтернативен път за активиране на каспаза-3 и -7, като отговор на бактериални стимули (Lamkanfi et al., 2008).

***Връзка на изпълнителя на пироптоичната клетъчна смърт GSDMD с каспаза-1 и каспаза-3, насочващи клетката към различен тип клетъчна смърт.***

След като изяснихме наличието на два алтернативни пътя на клетъчна смърт и хетерогенността в популациите на клетките на Сертоли, вниманието ни бе насочено към резултатите, в които клетки с активна каспаза-3, все пак претърпяват пироптоична клетъчна смърт.

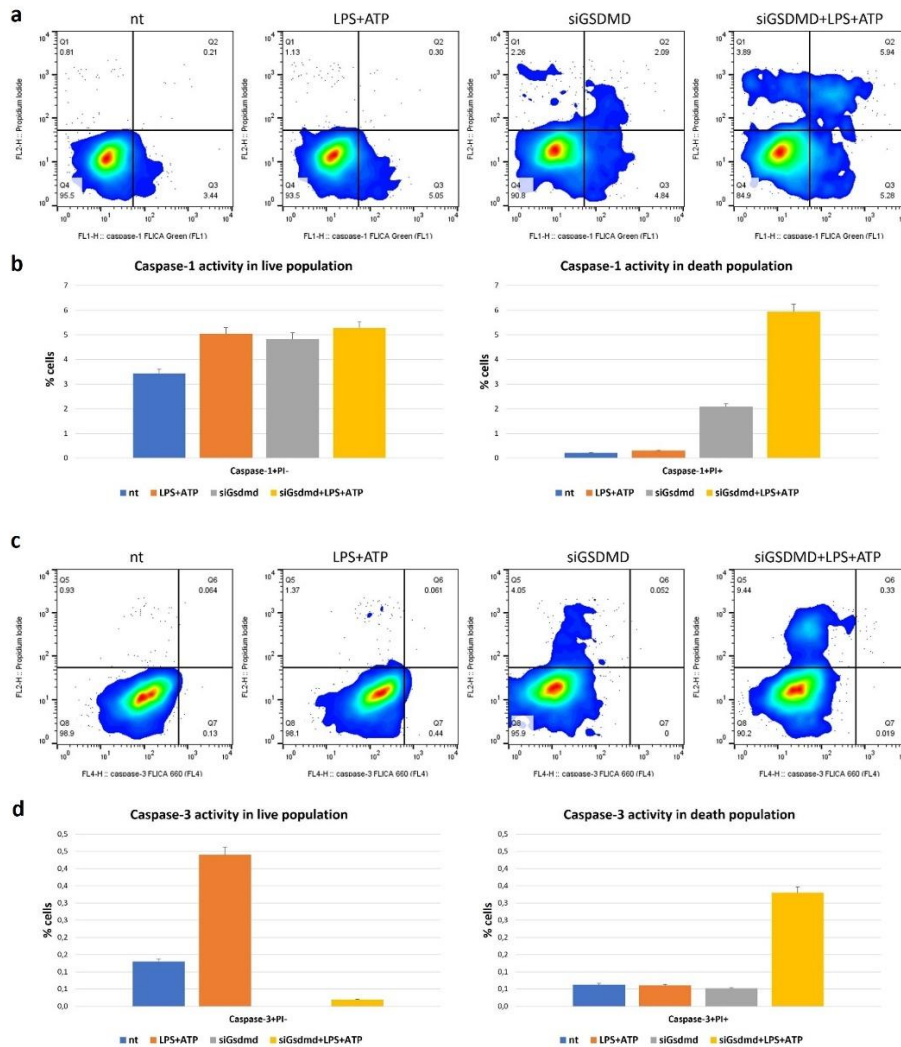
За наличието на тоталния GSDMD, инфламазомния път играе съществена роля и блокирането на участници в него (Nlrp3, Asc), чрез генно заглушаване, води до занижаване на неговите нива (**Фиг. 8а**). Такова влияние върху експресията се наблюдава и при блокирането на рецептора CD300a без активиращ сигнал и с последващ такъв. Заглушаването на самия GSDMD предотвратява регулирането на формата на

Gasdermin D в нормални условия и в такива, при които има активиращ сигнал през TLR4. Активацията с LPS+ATP води до най-високи нива GSDMD, което завишаване се наблюдава дори и в условия на генно заглушаване със siRNAs. Това показва значимостта на активиращите сигнали за експресията на протеина GSDMD.



**Фиг. 8.** Сандвич ELISA за оценка на общото количество на Gasdermin D (GSDMD) и на разцепената С-терминална субединица на Gasdermin D (GSDMD-CT) в клетки на Сертоли. Количествено определяне на протеиновите нива в pg/ml на тоталния GSDMD (a) и на срязаната му форма (b), условия на нетретирани клетки, след стимулация с LPS и ATP, след генно заглушаване на Nlrp3, Asc, CD300a или GSDMD, и в условия на генно заглушаване, с последваща индукция с LPS+ATP.

Интересно поведение има срязаната форма на GSDMD (GSDMD-CT), за която инфлазомния път сякаш има по-скоро потискащ ефект (Фиг. 8b). При блокиран инфлазомен път, последващата активация понижава значително наличието на срязаната форма, докато разцепената форма на Gasdermin D е дори допълнително намалена, когато е налично заглушаване на CD300a, в сравнение с базалните нива на разцепване, което предполага, че CD300a е необходим за поддържане на нивата на проформата на Gasdermin D и в крайна сметка за неговото разцепване и активиране.



**Фиг. 9. Флуоцитометрично отчитане влиянието на GSDMD върху активността на каспаза-1, в контекста на клетъчна смърт.** Анализ на активността на каспаза-1 (FL-1) – **a** и на каспаза-3 (FL-4) - **c**, чрез специфичен флуоресцентен субстрат (FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit - ImmunoChemistry Technologies / Magic Red® Caspase-3/7 Assay Kit - ImmunoChemistry Technologies), спрямо настъпването на пироптоична клетъчна смърт, чрез оцветяване с PI (FL-2), в четири условия – на нетретирани клетки (nt), след стимулация (LPS+ATP), в условия на трансфектирани клетки (siGSDMD) и след стимулация, в условия на трансфекция (siGSDMD+LPS+ATP). Популацията, която е негативна за каспазна активност и е жива (Caspase-1-PI- / Caspase-3-PI-), популацията, в която се наблюдава каспазна активност, но клетките са все още живи (Caspase-1+PI- / Caspase-3+PI-). Клетките, в които се открива активна каспаза и са претърпели пироптоична клетъчна смърт (Caspase-1+PI+ / Caspase-3+PI+), а тези, които са претърпели пироптоична клетъчна смърт, но не се наблюдава каспазна активност (Caspase-1-PI+ / Caspase-3-PI+). Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1 (**b**) или каспаза-3 (**d**) и са живи, спрямо тези, които са претърпели клетъчна смърт в четирите условия.

В литературата е изследвано активирането на каспаза-1 в клетки, в които липсва GSDMD, водещо до високи нива на активност на каспаза-3/7, и каспаза-8, но не е изяснено дали тези апоптотични каспази предизвикват лизис на клетки, когато липсва GSDMD (Heilig et al., 2020). За установяване връзката на GSDMD с активността на каспаза-1 и каспаза-3, респективно на двата основни пътя на клетъчна смърт – пироптоза и апоптоза, проследихме как повлиява генното заглушаване на GSDMD върху активността на каспазите. Нашите данни показват двупосочната регулация на GSDMD с каспазите. Тя се изразява със занижаване активността на каспаза-1 и завишаване на каспаза-3 (Фиг. 9).

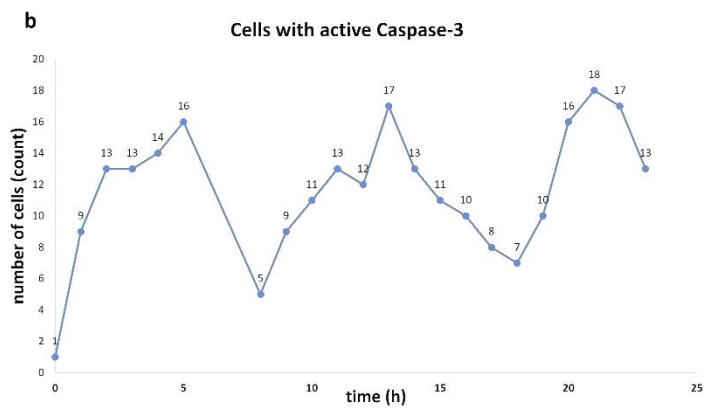
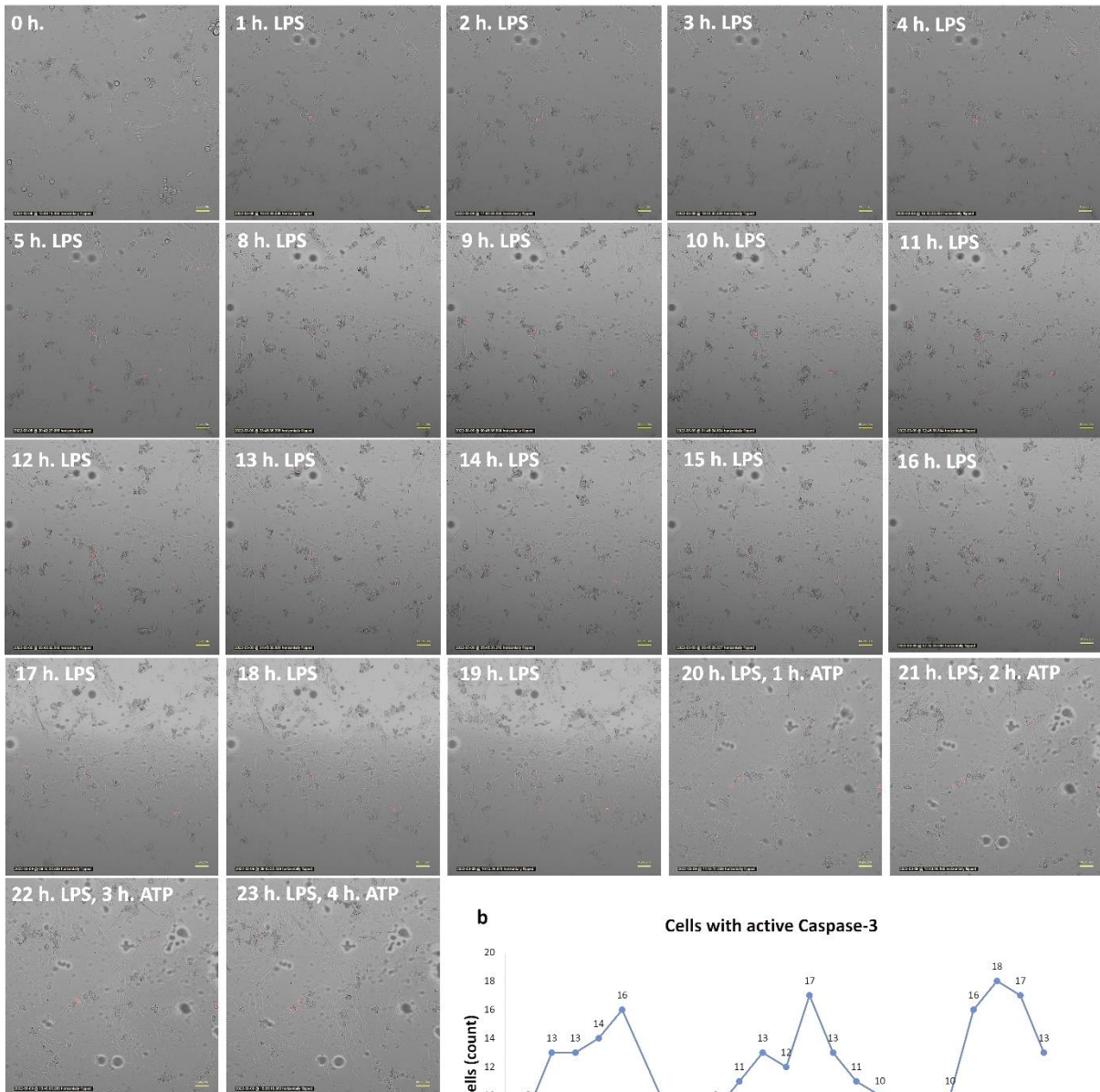
*Активиране на апоптоза в клетки на Сертоли в различен времеви интервал.*

Интерес за нас представляваше проследяване на поведението на клетките, тяхната морфология и активацията на каспаза-3 във времето, след добавяне на активиращи стимули – LPS и АТР (Фиг. 10). Изследването показва, че съществува динамика в активирането на каспаза-3, подчинена на TLR4, поради добавянето на активиращ сигнал LPS. Каспазната активност се завишава значително, когато е добавен и АТР, именно тогава се наблюдават и морфологични промени в клетките (Фиг. 11).

Подобно явление е наблюдавано в макрофаги, където дефицитни по GSDMD клетки образуват апоптотични мехурчета и тела, но само временно, след което преминат бързо към некротичен фенотип, който се характеризира с балониране на мембраната. Така при липса на GSDMD, в клетките може да се осъществи лизис чрез каспаза-1, която индиректно да активира каспаза-8 и каспаза-9, чрез разцепване на Bid, а то от своя страна, да задейства бързо активиране на каспаза-3 и незабавен преход във вторична некроза (Lamkanfi et al., 2008).

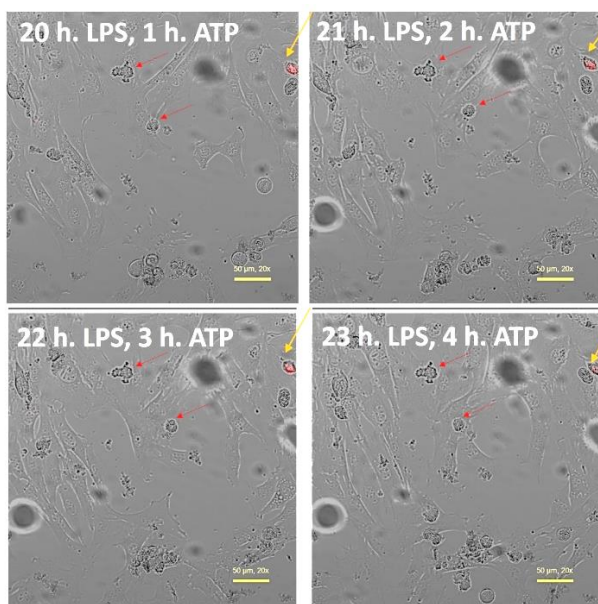


a



**Фиг. 10.** Проследяване активирането на каспаза-3 в различен времеви интервал. **a** - Микроскопски снимки на клетки 15P-1, заснети в интервал от 1 час. Червеният флуоресцентен канал е насложен върху светлинното поле, за проследяване на точното място на активна каспаза-3 и морфологичните промени, които настъпват с клетките. **b** - Графично представяне на броя клетки, в които има активна каспаза-3 във времето на стимулация с LPS и ATP.

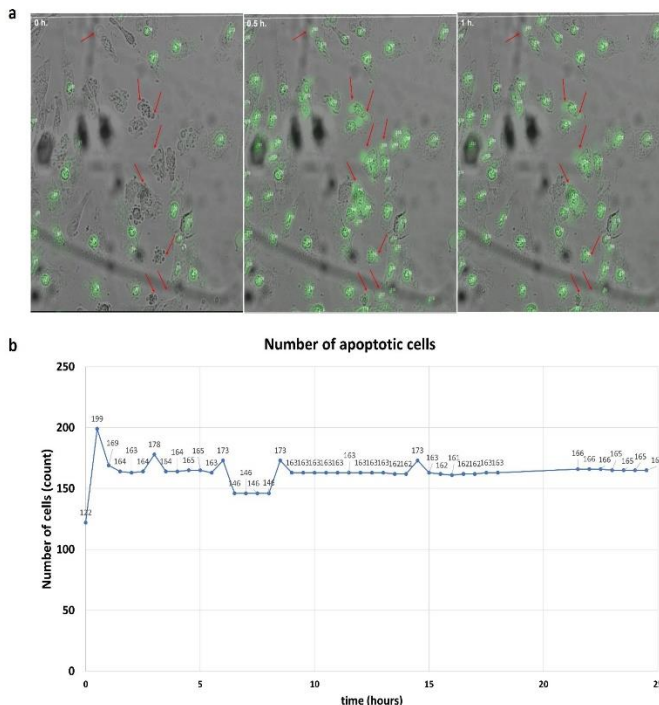




**Фиг. 11. Морфологични промени, наблюдавани в клетките на Сертоли, след добавяне на АТР. С жълти стрелки са посочени клетки, в които се наблюдава червен флуоресцентен сигнал за активна каспаза-3, а с червени стрелки са посочени клетките, в които се наблюдават морфологичните промени, настъпили в клетките.**

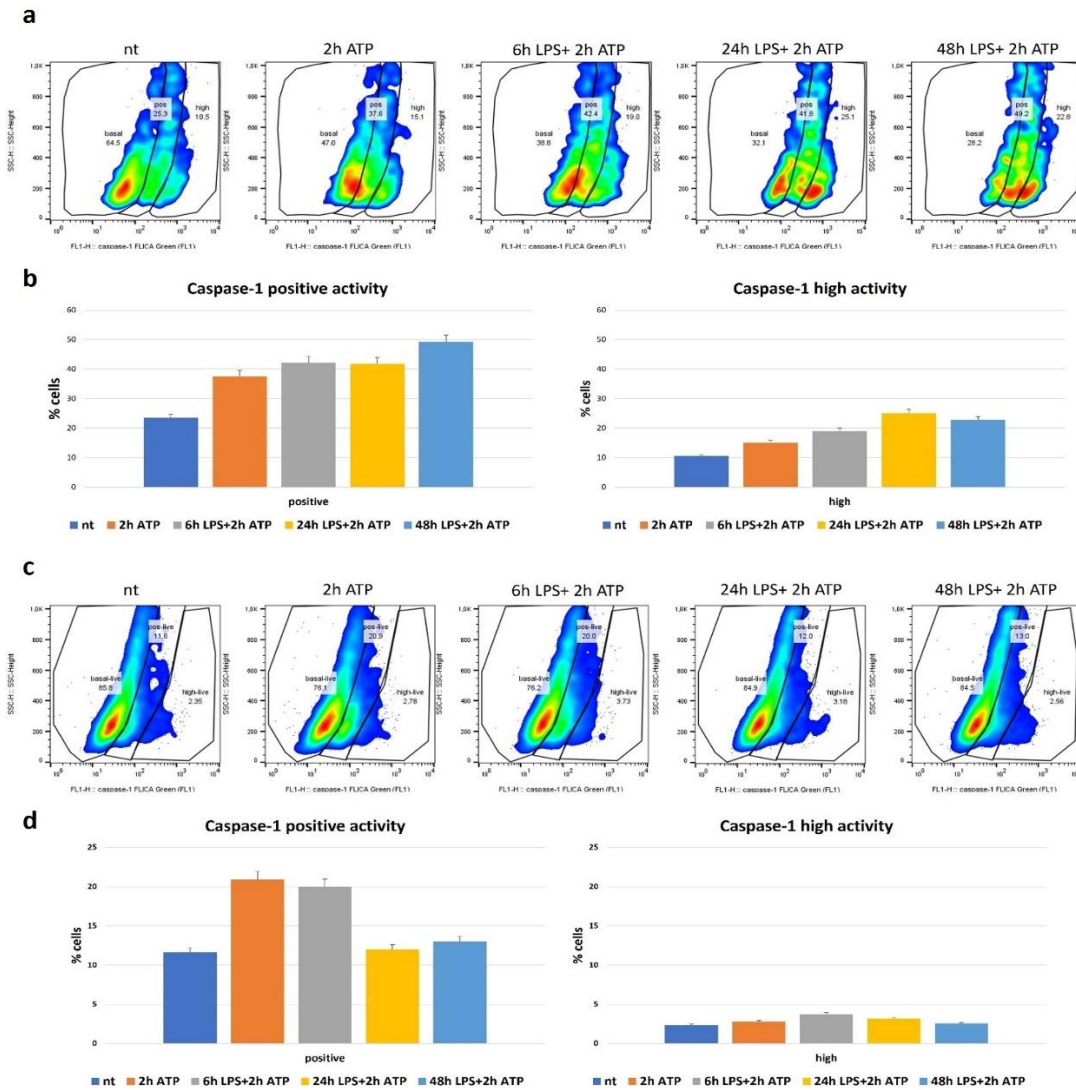
Феноменът бе проследен в клетки на Сертоли, след добавяне на двата сигнала във времето, което показва бърза апоптотична активност в клетките и ясно появяване на „балони“ по мембраната (Фиг. 12).

**Фиг. 12. Проследяване настъпването на апоптоза в различен времеви интервал. Микроскопски снимки на клетки 15P-1, заснети в интервал от половин час. Зеленият флуоресцентен канал е насложен върху светлинното поле, за проследяване на точното място на морфологичните промени, които настъпват. а - Проследяване настъпването на морфологични промени след увеличение. С червени стрелки са посочени клетки, попадали в това поле, в които се наблюдават видими морфологични промени. б - Графично представяне на броя клетки, в които настъпва апоптоза във времето, след стимулация с LPS и АТР.**



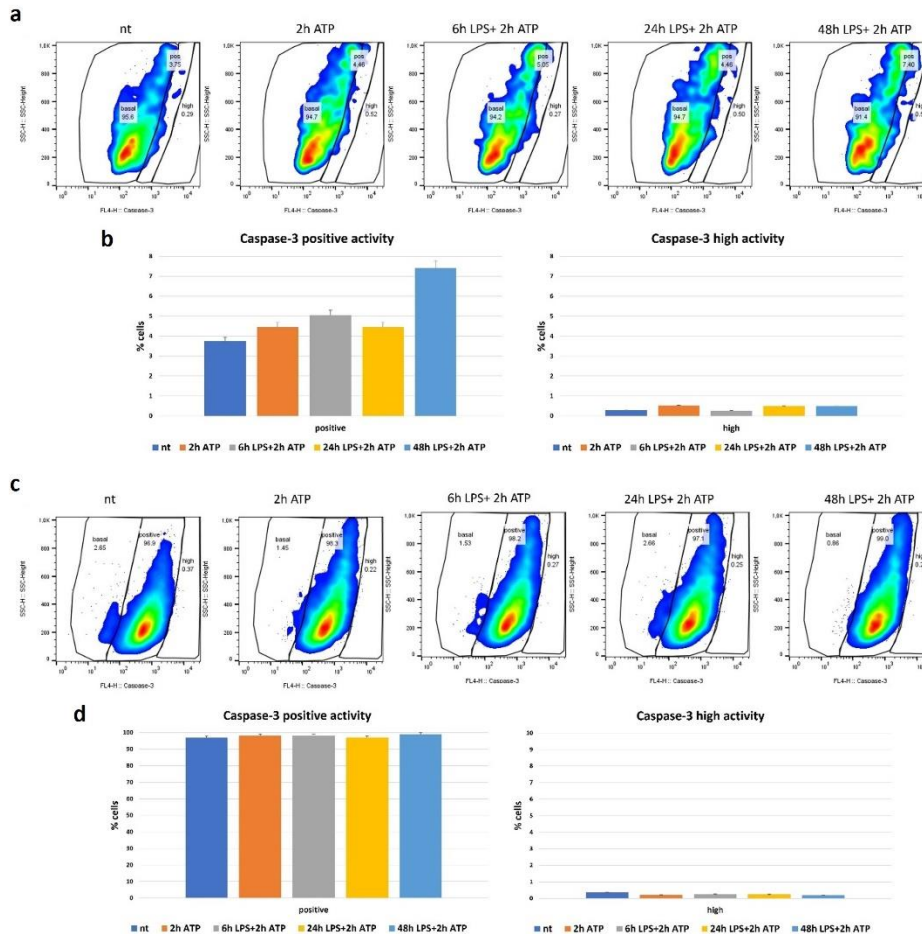
### Активация на каспазите в различни времеви точки

Съществуват данни за ефекта на продължителната активация на пътищата за възпаление, според които активацията с LPS или други стимули (12 до 24 часа) води до негативна регулация на Nlrp3. До 12-ия час от третиране с LPS нарастват и експресиите на Asc и каспаза-1, след което спадат (den Hartigh & Fink, 2018; González-Benítez et al., 2008).



**Фиг. 13.** Флоуцитометрично отчитане активността на каспаза-1 в популация от клетки, претърпели клетъчна смърт (а и б) и в интактни клетки (с и d), в различна продължителност на стимулация с LPS. а и с - Анализ на популациите клетки с различна активност на каспаза-1 (Caspase-1, FL-1) в клетките, в пет условия – nt, 2 ч. ATP, 6 ч. LPS + 2 ч. ATP, 24 ч. LPS + 2 ч. ATP и 48ч. LPS + 2 ч. ATP. б и d - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-1 в различна степен – позитивни (positive) и силно позитивни (high).

Подобна зависимост наблюдаваме и в проведените от нас експерименти, в които проследихме активността на каспаза-1 и каспаза-3 след добавяне на LPS за различно време (от 6 до 48 часа) (Фиг. 13 и Фиг. 14).



**Фиг. 14.** Флоуцитометрично отчитане активността на каспаза-3 в популацията от клетки, претърпели клетъчна смърт (а и b) и в интактни клетки (с и d), в различна продължителност на стимулация с LPS. а и с - Анализ на популациите клетки с различна активност на каспаза-3 (Caspase-3, FL-4) в пет условия – nt, 2 ч. ATP, 6 ч. LPS + 2 ч. ATP, 24 ч. LPS + 2 ч. ATP и 48 ч. LPS + 2 ч. ATP. b и d - Схематично изобразяване на процента клетки (% cells), в които се наблюдава активиране на каспаза-3 в различна степен – позитивни (positive) и силно позитивни (high).

Ние установяваме, че по-продължителната стимулация води до завишаване на клетъчната смърт независимо дали е активна каспаза-1 или каспаза-3. Установяваме по-късната активация на каспаза-3 на 48-ия час, водеща до настъпване на вторична некроза (Фиг. 14b). Но когато не може да се задвижи бърз клетъчен лизис, под действието на каспаза-1, в първите часове на активация (до 24 часа) се наблюдава висока каспазна активност, след което тя значително спада (Фиг. 13).

Превключването на типа клетъчна смърт е установено скоро в литературата, с изясняване на възможността на каспаза-3 да активира GSMDE, насочвайки пътя към пироптоза. GSDME представлява протеин, който също толкова ефективно, колкото GSDMD може да се локализира в клетъчната мембрана и да формира пори. Клетъчната съдба, до голяма степен може да се определи и от нивата на GSDME в клетката – когато е в ниски нива, клетката се насочва към апоптоза, а когато е във високи нива, към пироптоза. Недостатъчната експресия на GSDME в клетките позволява на TNF- $\alpha$  да активира каспаза-3, която срязвайки апоптотичния субстратен протеин поли-ADP-рибоза полимераза (PARP) предизвиква апоптотична клетъчна смърт. В силно експресиращи GSDME клетки, активирана каспаза-3 срязва GSDME, а не PARP, чрез което инициира пироптоза (Liao et al., 2022). Активирането на пироптоза може да се разглежда и като алтернативен механизъм, когато апоптотични клетки не бъдат ефективно и своевременно отстранени от фагоцитни клетки.

### ***Нанопорово секвениране на сертолиеви клетки от линия 15P-1***

Чрез нанопорово секвениране установихме, че индукцията на рецептора NOD1 води до промени в транскриптома на клетките на Сертоли, от които най-значимо е повишението на рецептора за извънклетъчна увреда CD300a (Фиг. 15).

ie-DAP upregulated transcript	UNIPROT Protein product
Sec24b	Q80ZX0
Gbp7	Q8N8V2
Cd300a	Q6SJQ0
Otud5	Q96G74
Il1rap1	P59823
Dync1li2	Q6PDL0
Wasf3	Q8VHI6
Herc6	F2Z461

**Фиг. 15. Транскрипти на гени, които са завишени след активация с iE-DAP.**

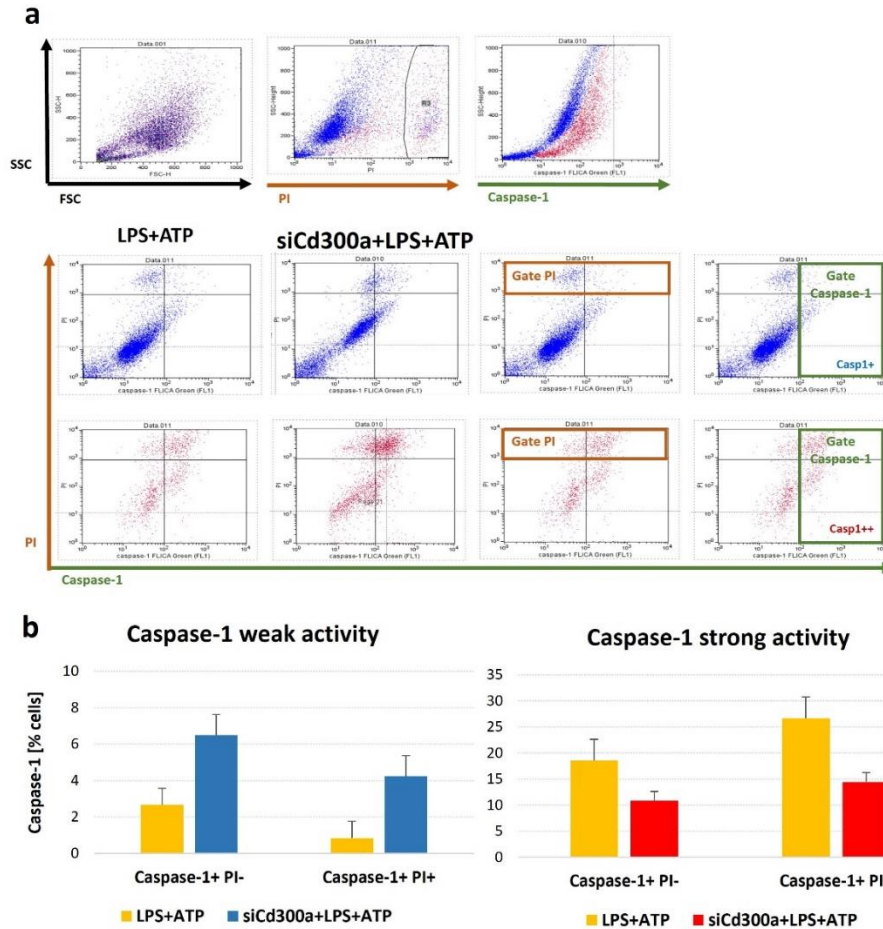
CD300a е повърхностен гликопротеин, който принадлежи към семейството CD300 на имунорецепторите. Той се изразява на различни левкоцити, като моноцити, неутрофили, мастни клетки, клетки естествени убийци (NK) и някои Т- и В- лимфоцити. CD300a действа като инхибиторен рецептор, който модулира имунните отговори чрез отрицателна регулация на активацията и функцията на тези клетки. CD300a се свързва с фосфатидилсерин и фосфатидилетаноламин, които се излагат на повърхността на апоптотични клетки и някои патогени. Чрез разпознаване на тези лиганди, CD300a може

да опосредства почистването на умиращите клетки и контрола на микробните инфекции. CD300a също така взаимодейства с пътя на сигнализация на Toll-подобните рецептори (TLR) и инхибира продукцията на про-инфламаторни цитокини, като интерлевкин-6 и туморен некрозен фактор. CD300a може да играе роля в предотвратяването на прекомерното възпаление и повредата на тъканите. Структурата, експресията и функцията на CD300a са изследвани подробно чрез използване на моноклонални антитела, knockout мишки и функционални тестове, но до момента няма данни за експресията му в клетки на тестиса, нито данни за функционалната му роля в клетките на Сертоли (Borrego, 2013; Zenarruzabeitia et al., 2015). Биологическият смисъл на активирането на инфлазомата би могъл да се свърже с детекция на значителна по обем клетъчна смърт от страна на гаметите и/или околните сертолиевы клетки, както и значителна клетъчна увреда. Това би изисквало намеса и активиране на защитните функции на имунната система, в иначе функционално и структурно недостъпната зона, дължаща се на кръвно-тестисната бариера.

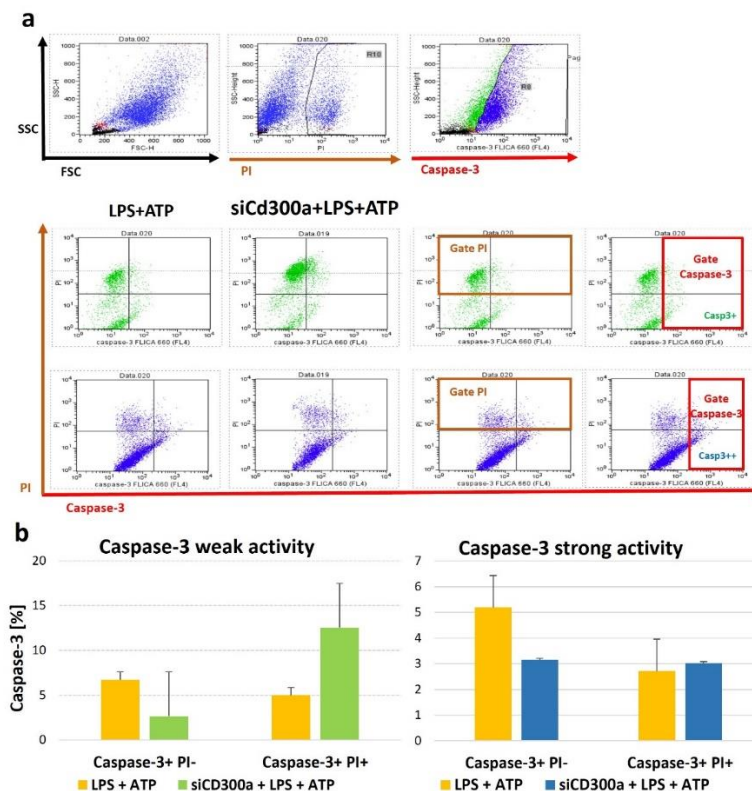
***Ефект на CD300a върху активираните каспаза-1 и каспаза-3 в сертолиевы клетки.***

В литературата често се споменава инхибиращия му ефект върху TLR4 медирания възпалителен отговор (Kim et al., 2012; Martínez-Barriocanal et al., 2010; Migalovich-Sheikhet et al., 2012), но не и върху събитията, контролирани от TLR3 (Kim et al., 2012). Публикувани са и данни за отрицателния регулаторен механизъм на TLR3 сигнализирането в клетките на Сертоли, които могат да участват в контролирането на вродените имунни отговори на тестисите към патогени (Sun et al., 2010). За изясняване ролята на CD300a, в контекста на възпаление в сертолиевы клетки, проследихме влиянието му върху клетъчната съдба и установихме двупосочната му роля върху активността не само на каспаза-1 (Фиг. 16), но и на каспаза-3 (Фиг. 17).





**Фиг. 16. Проточна флоуцитометрия, представяща действието на CD300a върху активността на каспаза-1, според силата на активация и клетъчната съдба. а - 1-ви ред:** Разпределение на клетките според големина (FSC) и еднородност (SSC); пропидиев йодид (PI, FL3) срещу еднородност; Caspase-1 FLICA (FL1) срещу SSC – дефиниране две Caspase-1 позитивни популации – Caspase-1 слабо позитивна популация (в синьо) и каспаза-1 силно позитивна популация (в зелено). **Втори и трети ред –** разпределение на клетките според активността на каспаза-1 и клетъчна съдба – живи/мъртви (PI-FL3). **На 2-ри ред:** дефиниране на Casp1+ (weak activity), в условия на третиране с LPS+ATP без генно заглушаване на CD300a и с предварително заглушаване. След третиранията са посочени и обособените гейтове за мъртвите клетки, и за Caspase-1 позитивните. **На 3-ри ред:** дефиниране на Casp1++ (strong activity), в същите третирания и съответни гейтове за мъртви клетки, и за каспаза-1 положителни. **b –** Схематично изобразяване на процента позитивни по каспаза-1 клетки, според интензивността на каспаза-1 – слаба активност (синьо) и силна активност (зелено) в контекста на клетъчна смърт.



**Фиг. 17. Проточна флоуцитометрия, представяща действието на CD300a върху активността на каспаза-3, според силата на активация и клетъчната съдба. а - 1-ви ред:** Разпределение на клетките според големина (FSC) и еднородност (SSC); пропидиев йодид (PI, FL3) срещу еднородност; Caspase-3 FLICA (FL4) срещу SSC – дефиниране две Caspase-3 позитивни популации – Caspase-3 слабо позитивна популация (в зелено) и каспаза-3 силно позитивна популация (в синьо). **Втори и трети ред –** разпределение на клетките според активността на каспаза-1 и клетъчна съдба – живи/мъртви (PI-FL3). **На 2-ри ред:** дефиниране на Casp3+ (weak activity), в условия на третиране с LPS+ATP без генно заглушаване на CD300a и с предварително заглушаване. След третиранията са посочени и обособените гейтове за мъртвите клетки, и за Caspase-3 позитивните. **На 3-ри ред:** дефиниране на Casp3++ (strong activity), в същите третирания и съответни гейтове за мъртви клетки, и за каспаза-1 положителни. **б –** Схематично изобразяване на процента позитивни по каспаза-3 клетки, според интензивността на каспаза-3 – слаба активност (синьо) и силна активност (зелено) в контекста на клетъчна смърт.

CD300a проявява ограничаващ ефект върху клетъчната популация, която загива чрез пироптоза, ограничавайки до определена степен силната експресия на каспаза-1 и стимулирайки активирането на каспаза-3. Подобно явление е наблюдавано в неутрофили, където CD300a забавя настъпването на възпалителна реакция, индуцирайки настъпването на апоптоза по каспаза-8 зависим път (Valiate et al., 2021). В същото време,

поддържа про- и активираните форми на GSDMD (Tsvetkova et al., 2022). Но механизмите на действие на CD300a е необходимо да бъдат допълнително проучени.

Друг силно свърх-експресиран ген в клетките на Сертоли, след индукция с iE-DAP, който установихме посредством транскриптомното изследване е генът Sec24b (Фиг. 18). Генът Sec24b (SEC24 Homolog B, COPII Coat Complex Component) кодира компонент от комплекса COPII, който е отговорен за транспортирането на протеини от ендоплазмения ретикулум до апарата на Голджи.

Pathway identifier	Pathway name	Entities p Value	Entities FDR
R-HSA-1253288	Downregulation of ERBB4 signaling	3.18E-05	0.008652
R-HSA-8847993	ERBB2 Activates <b>PTK6</b> Signaling	1.79E-04	0.01009
R-HSA-6785631	ERBB2 Regulates Cell Motility	2.10E-04	0.01009
R-HSA-1250347	SHC1 events in ERBB4 signaling	2.44E-04	0.01009
R-HSA-1963640	GRB2 events in ERBB2 signaling	2.44E-04	0.01009
R-HSA-2219530	Constitutive Signaling by Aberrant PI3K in Cancer	2.66E-04	0.01009
R-HSA-1236394	Signaling by ERBB4	4.68E-04	0.01592
R-HSA-189200	Cellular hexose transport	6.47E-04	0.019074
R-HSA-6811558	PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling	7.06E-04	0.019074
R-HSA-199418	<b>Negative regulation of the PI3K/AKT network (? Autophagy activation)</b>	9.45E-04	0.020799
R-HSA-2219528	<b>PI3K/AKT Signaling</b> in Cancer	9.45E-04	0.020799
R-HSA-1251985	Nuclear signaling by ERBB4	0.001129	0.022581
R-HSA-1250196	SHC1 events in ERBB2 signaling	0.001226	0.023302
R-HSA-8863795	Downregulation of ERBB2 signaling	0.001329	0.02392
R-HSA-1250342	PI3K events in ERBB4 signaling	0.003668	0.06235
R-HSA-8866910	<b>TFAP2 (AP-2)</b> family regulates transcription of growth factors and their receptors	0.007026	0.09218
R-HSA-1227986	Signaling by ERBB2	0.007516	0.09218
R-HSA-8848021	Signaling by PTK6	0.007516	0.09218
R-HSA-9006927	Signaling by Non-Receptor Tyrosine Kinases	0.007516	0.09218
R-HSA-1963642	PI3K events in ERBB2 signaling	0.007682	0.09218
R-HSA-373756	SDK interactions	0.011756	0.141074
R-HSA-5656364	Defective SLC5A1 causes congenital glucose/galactose malabsorption (GGM)	0.017583	0.193412
R-HSA-5689896	Ovarian tumor domain proteases	0.0271	0.298101
R-HSA-380108	Chemokine receptors bind chemokines	0.033138	0.331385
R-HSA-9007892	Interleukin-38 signaling	0.03486	0.344799
R-HSA-1257604	PIP3 activates <b>AKT</b> signaling	0.036565	0.344799
R-HSA-8864260	Transcriptional regulation by the <b>AP-2 (TFAP2)</b> family of transcription factors	0.038311	0.344799

**Фиг. 18.** Гени и пътища в сертолиевите клетки, получени след анализ на секвенирането. Данните са извадени от Reactome и посочват идентификатор на пътища и участие в сигнални процеси.



Мутациите в този ген са свързани с дефекти на невралната тръба при мишки. Фероптозата на микроглията се регулира от SEC24B и допринася за невродегенерация (Ryan et al., 2023). Фероптозата е вид не-апоптотична програмирана клетъчна смърт, която води до прекомерна липидна пероксидация в различни клетки, медирана от натрупването на желязо. Фероптозата се различава от другите форми на клетъчна смърт и се свързва с различни заболявания. Желязото е от съществено значение за сперматогенезата и мъжката репродуктивна функция. По отношение на морфологията, основните характеристики на фероптозата са митохондриална атрофия, кондензирана плътност на митохондриалната мембрана и загуба на митохондриални кристи. От биохимична гледна точка, фероптозата се индуцира от натрупването на желязо и увеличаването на реактивните кислородни видове (ROS), произведени от липидна пероксидация (Yuan et al., 2023). Натрупването на ROS може да причини увреждане на сперматозоидите чрез атакуване на плазмената мембрана и увреждане на ДНК. Острата фероптоза причинява окислително увреждане на ДНК на сперматозоидите и оксидативен стрес на тестисите, като по този начин причинява мъжка репродуктивна дисфункция (Y. Liu et al., 2022). Установено е, че фероптозата може да причини клетъчна смърт в клетките на Сертоли, свързана с лишаване от кислород-глюкоза и последваща индуцирана реоксигенация (L. Li et al., 2018). В условия на лишаване от кислород-глюкоза и реоксигенация, предизвикващо исхемично-реперфузионно увреждане в Сертоли клетъчна линия TM4, е установено че нивата на ROS, на желязо и липиди са повишени, а митохондриите намаляват по размер и увеличават плътността на мембраната, феномен, показателен за фероптоза (L. Li et al., 2018). Тези констатации са в съгласие с нашите данни за митофагия при условия на ниска глюкоза и TLR4 стимулация (LPS PAMP сигнал), показвайки преминаване от митофагичен флукс към макроавтофагичен флукс. По този начин, в случаи на намален кислород и глюкоза и повишена ROS, увреждаща митохондриите, процесът на изчистване на увредените митохондрии всъщност се потиска, когато пътят на TLR4 също е активиран, създавайки условия за повишена ROS-индуцирана клетъчна смърт. Повишаването на SEC24B в клетките на Сертоли след NOD1-стимулация, което също води до активиране на NF- $\kappa$ B надолу по веригата, и е синергичен път към TLR4 (S. Nayrabyan et al., 2016), може потенциално да увеличи шансовете за ROS-индуцирана фероптотична или пироптотична клетъчна смърт, т.к. нокаутът на SEC24B предотвратява фероптозата в миелоидните клетки, включително микроглията (Ryan et al., 2023).

Няколко от биоинформативно обогатените сигнални пътища след третиране с iE-DAP са свързани с членовете на семейството на рецепторите на епидермалния растежен фактор - ERBB4 и ERBB2. Отговорът на клетките на Сертоли към iE-DAP стимулацията задейства каскада от сигнални пътища, по-специално включващи понижаване на ERBB4 и активиране на ERBB2-медираните пътища (**Фиг. 18**). ERBB4, рецепторна тирозин киназа, известна също като HER4, е член на семейството на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR). ERBB4 сигнализирането, често свързано с регулирането на клетъчната диференциация и пролиферация, изглежда е регулирано в посока намаление, което предполага възможен механизъм, чрез който клетките на Сертоли модулират сигнализацията на растежните фактори, за да поддържат хомеостазата на тестисите след третиране с молекулен сигнал за патоген като iE-DAP. Тази регулация, водеща до потискане на ERBB4, може да бъде инструмент за предотвратяване на прекомерни пролиферативни сигнали, които могат да бъдат вредни в строго регулираната среда на тестисите, където контролираната активност на растежните фактори е от съществено значение за нормалната сперматогенеза и развитието на зародишните клетки. ErbB4 координира организацията на семенните тубули в развиващия се тестис, като контролира адхезията на клетките на Сертоли и зародишните клетки. Мишки със ErbB4-нокаут осъществяват специфично само в клетките на Сертоли, имат компрометирана 3-измерна организация на семенните тубули на тестисите, което влияе върху тяхната плодовитост. По-конкретно, дефекти на адхезията се наблюдават в отсъствието на ErbB4, които се характеризират с промени в експресията на ламинин-1, N-кадхерин, клаудин-3 и някои компоненти на клетъчно-клетъчно свързване между клетките на Сертоли и зародишните клетки (Naillat et al., 2014). Може да се очаква, че индуцираното от сигнализацията през NOD1 потискане на ERBB4 води до промени и в нивата на клаудин-3 (Naillat et al., 2014), докато противоположно на това е установено, че активирането на NOD1 индуцира други клаудини в клетки на Сертоли, като клаудин-5 и клаудин-11 (S. B. Nayabedian et al., 2015). Като цяло е много вероятно активирането на NOD1 да доведе до реструктуриране на контактните клетки на Сертоли - зародишните клетки. Понижаването на ERBB4 сигнализирането може да бъде замесено в предотвратяването на неконтролирана клетъчна пролиферация на Сертоли, което е от решаващо значение за поддържане на подходящото съотношение между Сертоли и зародишни клетки, необходимо за оптимален сперматогенен изход. Дали това е полезно за плодовитостта или обратното остава да бъде допълнително проучено.

В координация с ERBB4, активирането на сигнализирането на ERBB2, което влияе върху клетъчната подвижност и участва в активирането на РТК6 и сигнални събития надолу по веригата, сочи към динамична реорганизация на клетъчните дейности на Сертоли в отговор на стрес или микробни компоненти, разпознати от NOD1 рецепторите. Такова активиране може да подобри реорганизацията на цитоскелета, необходима за функцията на клетките на Сертоли, включително поддържането на кръвно-тестисната бариера и улесняването на движението и узряването на зародишните клетки. Активирането на РТК6 от ERBB2 може потенциално да модулира цитоскелетната динамика на клетките на Сертоли, като повлияе на способността им да фагоцитират остатъчни тела по време на спермиогенезата и по този начин косвено да повлияе на качеството и плодовитостта на спермата. Сложното взаимодействие между пътищата на ERBB2 и ERBB4 в клетките на Сертоли при излагане на iE-DAP отразява сложна регулаторна мрежа, която фино настройва клетъчните отговори, критични за запазване на мъжкия репродуктивен капацитет, като същевременно управлява потенциални патогенни заплахи.

Обогатяването на сигналния път „SHC1 събития в сигнализирането на ERBB4“, показва, че адапторния протеин SHC1 може да свърже активирането на ERBB4 със сигнализацията на MAPK/ERK пътя. Може да се предположи, че това би имало роля във функцията на клетките на Сертоли, вероятно във фината настройка на кръвно-тестисната бариера или в отговора към локално сигнализиране чрез цитокини, което е критично за статуса на имунната привилегия на тестисите.

Обогатени бяха и пътища като „PIP5P, PP2A и IER3 които „Регулират PI3K/АКТ сигнализацията“ и „Отрицателна регулация на мрежата PI3K/АКТ, и активиране на автофагия“. PIP5P (фосфатидилинозитол 5-фосфат) и PP2A (протеин фосфатаза 2A) са отрицателни регулатори на PI3K/АКТ пътя. PIP5P може да инхибира PI3K пътя, докато PP2A дефосфорилира и инактивира АКТ. IER3 (незабавен ранен отговор 3) е ген за реакция на стрес, който също може да модулира този път. Пътят на PI3K/АКТ се регулира отрицателно от различни механизми, включително PTEN и инозитол полифосфат-4-фосфатаза. Когато този път е инхибиран, това може да доведе до активиране на автофагия, процес на клетъчно разграждане, който е важен за поддържане на клетъчната хомеостаза и може да допринесе за оцеляването на клетките при стресови условия. Освен това, строго регулираният PI3K/АКТ път в клетките на Сертоли е от съществено значение за клетъчното оцеляване и енергийния метаболизъм. В средата на тестисите регулацията

на този път е от първостепенно значение, тъй като дисрегулацията му може да доведе до апоптоза на клетките на Сертоли или неуспех да се осигури адекватна подкрепа за развиващите се зародишни клетки, което би завършило с нарушена сперматогенеза и субфертилитет или безплодие. При индукция на синергичния на NOD1 път TLR4, редица клетъчно-адхезивни протеини участващи във формирането на клетъчни контакти при клетките на Сертоли се потискат. Този път се опосредства от каскадата PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B, която активира инфламаторни цитокини като TNF-alpha, IL-1beta, IL-10, които на свой ред потискат клетъчно-адхезивните протеини ZO-1, occludin, CX-43,  $\beta$ -catenin, и N-cadherin. Наскоро бе установено, че нервния растежен фактор (NGF) действа през рецептора си tropomyosin receptor kinase A (TrkA) и има превантиращ ефект срещу действието на LPS-TLR4- PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B пътя в клетките на Сертоли по отношение увреждането на клетъчно-адхезивните им свойства, като блокира именно PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B частта (Lv et al., 2023). Нашите данни от транскриптомното изследване показват, че синергичните по отношение на NF- $\kappa$ B активацията пътища на TLR4 и NOD1 имат и разлики по отношение на последващата модулация на сигналите през PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B, като TLR4 ги активира, докато NOD1 действа потискащо и вероятно протективно.

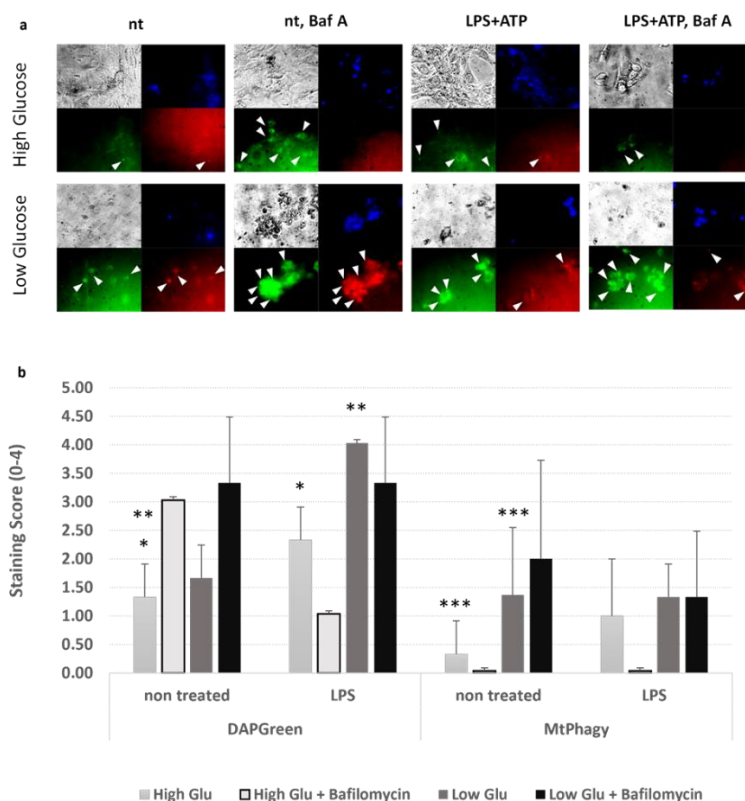
В заключение, сигналните пътища ERBB и PI3K/AKT, макар и широко характеризирани в контекста на редица патологични състояния, вкл. неоплазиите, също са неразделна част от физиологията на клетките на Сертоли и функцията на тестисите. Техните роли се простират отвъд обикновената клетъчна пролиферация, обхващайки регулирането на клетъчната подвижност, оцеляването и метаболитната подкрепа, всички от които са от съществено значение за сложния процес на сперматогенезата. Разбирането на дуалистичния характер на тези пътища както в онкогенезата, така и в нормалната физиология може да предостави нови прозрения в патофизиологията на заболяванията на тестисите и потенциални терапевтични цели за нарушения на фертилитета.

Механизмите на клетъчна смърт са изключително сложни и взаимосвързани. Чрез строга регулация се определя клетъчната съдба, а както става ясно от горепосоченото, пътищата често включват общи участници. Определянето на клетъчната съдба в сертолиевите клетки е изключително важно за развитието и функционирането на зародишните клетки, в процеса на сперматогенеза. Сигналните пътища на MAPK (mitogen-activated protein kinases) и AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) влияят върху доставката на лактат в сертолиевите клетки, а сигналният път на

МАРК заема основна роля в регулирането на самообновяването на сперматогониалните стволови клетки (Ni et al., 2019).

### *Наблюдение на настъпването на макроавтофагия в сертолиеви клетки*

Автофагията може да има двупосочна функция - да разгражда увредените митохондрии и каспази или да осигурява мембранно-свързани вътреклетъчни субстрати, които каспазите използват в инициирането на апоптозата. Bcl-1 и Atg4D се разцепват от каспази, а Atg5 се разцепва от калпаин-1 и калпаин-2. Тези събития не само инхибират автофагията, но и засилват апоптозата. С-терминалният фрагмент на Bcl-1 и N-терминалният на Atg5 директно индуцират освобождаването на цитохром с от митохондриите. Вътрешният апоптотичен път може да бъде иницииран от различни вътреклетъчни стимули, като оксидативен стрес, увреждане на ДНК и хипоксия, които могат да индуцират пермеабилзация на външната митохондриална мембрана. Членовете на семейството на Bcl-2, могат да се разделят на две категории - проапоптотични и антиапоптотични. Bax, Bid, Bak, Bad, Noxa и PUMA са проапоптотични, а Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1 и A1. По време на апоптоза, антиапоптотичните Bax и Bak претърпяват димеризация и се локализират във външната митохондриална мембрана, задействайки вътрешния апоптотичен път. След митохондриална пермеабилзация, цитохром с се освобождава в цитозола, където се свързва с апоптотичен протеин активиращ фактор-1 (Araf-1), а той иницира образуването на апоптозома. Апоптозомата може да свърже и да активира каспаза-9, а тя да активира каспаза-3, събитие водещо до насочване на клетката към апоптоза. Външният път на активиране на апоптозата се иницира от свързването на рецептор на смърт към неговия лиганд, което води до взаимодействие с адапторния протеин FADD към DISC, с последващо освобождаване на активна каспаза-8, също медираща апоптозата. Инхибиторните протеини на каспаза 8 (с-FLIP) взаимодействат с Atg3, като по този начин предотвратяват взаимодействието между Atg3 и LC3 и инхибират автофагията (Mukhopadhyay et al., 2014). Каспаза-1 може да се активира от NOD-подобни рецептори (NLRs), като NLRP3 и NLRC4, и от инфламазомата AIM.



**Фиг. 19.** Проследяване на процеса макроавтофагия в условия на гладуване и стимулация с LPS и ATP. Клетъчна линия 15P-1 беше подложена на 24-часово провокиране с LPS в сравнение с нетретираните контроли, при условия на висока и ниска глюкоза, без или с предварително третиране с бафиломицин A1 за 2 часа. **a** - Флуоресцентното багрило DOJINDO DAPGreen се използва за наблюдение на иницирането и образуването на автофагозома, както и неговото сливане с лизозоми, тъй като неговата флуоресценция зависи от включването му в двойна хидрофобна автофагозомна мембрана. Флуоресцентното багрило DOJINDO MtPhagy се използва за наблюдение на специфична митофагия, тъй като неговата флуоресценция зависи от рН на околната среда по време на образуването на автолизозома и трансформацията на багрилото в митохондриалните мембрани. Показани са представителни фигури на третираните с DAPGreen и MtPhagy контролни клетки, и третираните с LPS клетки, в условия на висока/ниска глюкоза без или с предварително третиране с Bafilomycin A1. **b** - Всяко състояние беше анализирано чрез оценка на полуколичествен резултат (0, без оцветяване; 1-3 нива на оцветяване) за най-малко три зрителни полета. Отклоненията показват SEM. Данните са представителни за независими експерименти с три технически повторения, използващи клетъчна линия Sertoli за възрастни 15P-1.

При бактериална инфекция в тестикуларни макрофаги, транскрипцията на провъзпалителни цитокини, може да бъде предизвикана и от MAPK. Ключов фактор в този процес е прокинетицин 2 (PK2), представляващ малък секреторен протеин, който се

свързва със своите специфични рецептори, за да медира сигналната трансдукция с цел осъществяване на възпалителен отговор, чрез завишаване експресията на Nlrp3 и IL-1 $\beta$ . Отделеният IL-1 $\beta$  в супернатантите засяга клетките на Лайдиг, чрез потискане на експресията на гени, кодиращи ензими, които участват в производството на тестостерон, а по този начин възпалението повлиява мъжкото безплодие (Y. Li et al., 2019).

Тъй като TLR4 и NF- $\kappa$ B участват в сигнализирането на инфламазомата и решаващ механизъм за неговото регулиране надолу се приписва на автофагията, ние допълнително проучихме както активирането на TLR4 засяга макроавтофагията и митофагията (**Фиг. 19**). В нашия случай, активацията с LPS за 24 часа на TLR4 доведе до очаквано увеличение на макроавтофагията, но митофагията беше намалена.

Пироптозата се счита за първа линия на защита срещу опасност. Когато клетките са заразени от патогени, те често причиняват увреждане на клетките и освобождават провъзпалителни медиатори, като IL-1 $\beta$  и HMGB1, с което да привлекат имунни клетки, включително макрофаги. Пироптозата може да предпази тялото от инфекция и нараняване, но до известна степен. Прекомерното активиране на този път, като системно прекарани инфекции, води до натрупването на множество цитокини, което да индуцира определени заболявания, причиняващи сериозни увреждания на тялото, като сепсис, пневмония, болест на Крон и фертилитет (L. Li et al., 2022; Liao et al., 2022; Rogers et al., 2017). В световен мащаб са открити няколко механизма за блокиране на пироптозата. Първото съединение, за което е описано, че блокира пироптоза и освобождаването на IL-1 $\beta$ , е пуникалагинът - сложен антиоксидантен полифенол, открит в нара. Той не повлиява активацията на инфламазомите Nlrp3 или AIM2, но блокира течливостта на плазмената мембрана и може да попречи на локализирането на GSDMD-NT в нея, неговата олигомеризация и образуване на пори. Предполага се, че пуникалагинът може да повлиява и активацията на NLRP1 и NLRC4. Други съединения са директно насочени към GSDMD. Установено е, че цистеин-реактивно лекарство - некросулфонамид (NSA), също инхибира пироптозата в човешки и миши клетки като се свързва с GSDMD и инхибира олигомеризацията на GSDMD-NT в плазмената мембрана, без да повлиява сигнализацията през TLR, активирането на инфламазомата, разцепване на GSDMD или цитокиновата експресия. Но NSA не блокира клетъчната смърт, настъпила от активността на GSDME-NT (Broz et al., 2020). Действието на GSDME може да се предотврати, като се блокира пътят му на активация, в който вземат участие каспаза-3 или освобождаването на гранзим В. Разработени са два клетъчно пропускливи инхибитора: Ac-DMPD-СМК и

Ac-DMLD-СМК, за които е установено, че могат да инхибират активността на каспаза-3 (Xu et al., 2021). Работи се и върху модификация, с помощта на фумарова киселина за добавяне на 2-(сукцинил) върху GSDME, с което да се инхибира образуването на олигомери и да се блокира пироптозата (L. Li et al., 2022).



## 5. ИЗВОДИ

1. Третирането на клетките с LPS и АТР води до активиране както на каспаза-1, така и на каспаза-3, в резултат на което клетките се насочват към апоптоза или пироптоза, с преимуществено насочване към апоптоза.
2. Най-вероятно активирането на каспаза-1 се дължи на функционирането на повече от една инфламазоми, тъй като клетките, които претърпяват клетъчна смърт, загиват при Nlrp3-Asc зависим път на активация на каспаза-1, а при живите клетки активността е по независим от тази ос път. Активацията на каспаза-3 е изцяло зависима от оста Nlrp3-Asc.
3. CD300a е двупосочен регулатор на активацията на каспаза-1, като наличието му ограничава настъпването на пироптоза по каспаза-1 зависим път, а липсата му води до ограничаване силната каспазна активност в живите клетки. Действието му върху активността на каспаза-3 е също двупосочно – стимулира активирането на каспаза-3 в живите клетки и ограничава активността ѝ в насочените към пироптоза клетки.
4. Активирането на инфламазомния път Nlrp3-Asc потенцира експресията на тотален GSDMD (неактивен тетрамер), но не и повишаване на активната му срязана форма (С-терминален фрагмент). Експресията на рецепторът CD300a е нужна за нормалната експресия на тоталния GSDMD (неактивен тетрамер) и за активацията му.
5. GSDMD влияе върху каспаза-1 и каспаза-3 по различен начин – с инхибиторен ефект върху активността на каспаза-1 и активиращ върху каспаза-3.
6. Индуцираното от LPS сигнализиране, намалява специфичната митофагия в полза на неспецифичната макроавтофагия, в стресови условия с намалени нутриенти (глюкоза).

## 6. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Установено е, че активацията на пироптоичния инфлазомния сигнален път (каспаза-1) води до превключване към по-малко деструктивния апоптотичен път на програмирана клетъчна смърт (каспаза-3), чрез директна активация на каспаза-3 от каспаза-1 по Nlrp3/Asc-зависим механизъм
2. Установено е наличието на рецептора CD300a в клетките на Сертоли и неговата позитивна регулация от пътищата на вродена имунна сигнализация, разпознаващи молекулни сигнали за патогени, и връзката му с клетъчната съдба в контекста на типа на клетъчна смърт и каспазна активност.
3. Установен е механизъм на обратна регулация, предпазващ клетките на Сертоли, от страна на ефекторната молекула GSDMD спрямо активността на основните каспаза-1 и каспаза-3, отговорни за програмираната клетъчна смърт.

## **7. СПИСЪК С НАУЧНИТЕ СТАТИИ, ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. Ilka Tsvetkova, Radostina Tsvetankova, Krassimira Todorova, Soren Hayrabedyan “The Effect of CD300A Receptor on Caspase-1 Activity in the Context of Cell Death and on Its Activators Nlrp3 and Asc in Sertoli Cells”, *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences*, 75(12), 1830–1839, Dec. 2022. <https://doi.org/10.7546/CRABS.2022.12.15>
2. Elina Avramaska, Ilka Tsvetkova, Krassimira Todorova & Soren Hayrabedyan (2023) TLR4 signalling protects Sertoli cells from cell stress via reprogramming inflammasome and autophagy pathways in MAPK1/ERK2 dependent way, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37:1, DOI: 10.1080/13102818.2023.2268749

## **8. СПИСЪК С УЧАСТИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ, ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. Ilka Tsvetkova, “Role of NLRP3 and NLRC4 inflammasome signaling crosstalk in Sertoli cells on cell fate and its importance in male pathology and fertility”, 6th Black Sea International Immunology School (BSIIS2019), 2019, Teteven, Bulgaria – oral presentation
2. Krassimira Todorova, Ilka Tsvetkova, Soren Hayrabedyan, “Sertoli cells have non-canonical functional inflammasome network, including Nlrp3 and Nlrc4, being able to potentially perturb the testis niche immune tolerance by differentially inflicting caspase-1-dependent cell death”, 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR 2019), 2019, Nara, Japan - poster
3. Ilka Tsvetanova Tsvetkova, Krassimira Olegova Todorova, Soren Bohos Hayrabedyan, “Inflammasome induced caspase interplay in determine Sertoli cell fate with implications for men fertility”, 6th European Congress of Immunology, 1–4 September 2021, virtual – poster

### **Ръководство и участие в проекти, във връзка с дисертацията:**

Проект КП-06-КОСТ/24 „Роля на автофагията за възникване на мъжки инфертилитет и развитие на простатен карцином“ 2020, р-л проф. дбн Сорен Хайрабедян (участник в проект)

## Благодарности

Бих искала да изкажа най-искрените си благодарности към проф. д-р Сорен Хайрабемян и проф. Красимира Тодорова. Изключително съм им благодарна за наставленията и търпението, отделеното време и насоките, които получих от тях през всички години, прекарани в лабораторията. Стремешът към знания, усърдна работа, професионализъм и критичност се засилват все повече, когато представляват личен пример. Няма по-силна мотивация за млад учен от достигането, дори на малка част от успехите, на толкова видни учени и ментори, работещи със сърце, отдаденост и желание.

Изключително съм благодарна и на сплотения екип в лабораторията, на подкрепата и помощта от Радостина и Андрей във всеки етап.

Сърдечни благодарности на моето семейството, от което получих непрестанна подкрепа през всички години, разбиране за пропуснатите моменти и търпение.

Благодарности и на моя спътник в живота за разбирането, моралната и емоционална подкрепа, ценните съвети и преминаване през всички емоции, съпътстващи изготвянето на дисертационния труд, още от самото начало.