



1869

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ  
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. К. БРАТАНОВ”**

**Секция „Имунобиология на репродукцията”**

*Силвина Запрянова Запрянова*

**Роля на протеините на топлинния стрес в процесите на  
сперматогенеза и апоптоза**

***АВТОРЕФЕРАТ***

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”  
по научна специалност: “Имунология” шифър 01.06.23

Научен ръководител:

*Доц. Павел Рашев*

**София 2017**

***Посвещавам настоящия дисертационен труд за присъждане  
на образователната и научна степен „Доктор”  
на моя дядо Стою Запрянов Груев.***

***Обичам те, дядо!***

Лабораторните експерименти в настоящия дисертационен труд са проведени в секция “Имунобиология на репродукцията” при **Институт по Биология и Имунология на Размножаването „Акад. Кирил Братанов“ (ИБИР), БАН.**

Трансмисионната електронна микроскопия е извършена в **Институт по Експериментална Морфология, Патология и Антропология с Музей (ИЕМПАМ), БАН**, под ръководството на Доц. Йорданка Мартинова.

Дисертационният труд беше изготвен с финансовата подкрепа на:

**Проект ТК-Б-1606/2006** „Локализация и функция на стресови протеини в тестикуларни полови клетки при спонтанна и термоиндуцирана апоптоза”, с ръководител Доц. Маргарита Моллова (ИБИР)

**Проект BG051PO001-3.3.06-0059** „Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии”, с ръководител Доц. Милена Мурджева (ИБИР). Проект по оперативна програма „Развитие на човешките ресурси” 2007-2013, съфинансирана от ЕС.

Дисертационният труд е онагледен с 52 фигури и 7 таблици. Библиографията включва 297 литературни източника на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... 2017 г. 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:**

Доц. Павел Рашев – научен ръководител, вътрешен член

Доц. Таня Димова – вътрешен член

Проф. Нина Атанасова (ИЕМПАМ-БАН)– външен член

Проф. д-р Ивета Коева (МУ-Пловдив) – външен член

Проф. Недка Тривонова (МУ-София) – външен член

**Резервни членове:**

Доц. Милена Мурджева – вътрешен член

Доц. Ралица Живкова (МУ-София) – външен член

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.

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

## II. СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРЪЩЕНИЯ И СИМВОЛИ

### Списък на използвани съкращения и символи на латиница

PAS – оцветяване по Шиф с перйодна киселина

IGF – инсулин растежен фактор

NGF – невронен растежен фактор

GDNF – невротрофичен растежен фактор от глиална клетъчна линия

SCF – фактор на стволови клетки

FSH – фоликулостимулиращ хормон

OCT4-октамер свързващ транскрипционен фактор

SOX3-SRY-свързан HMG-box

EP-CAM –епително-клетъчна адхезивна молекула

STRA8-стимулиран от ретиноева киселина 8

MSCI - meiotic sex chromosome inactivation

SSCs – сперматогониални стволови клетки

PGCs – примордиални герминативни клетки

CSF1 – колония стимулиращ фактор 1

GnRH – гонадотропин-релийзинг хормон

LH –лутенизиращ хормон

AR-андрогенен рецептор

CFTP-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

AQP-9 – аквапорин 9

cAMP-цикличен аденозинмонофосфат

COX-1-циклооксигеназа-1

PGE2 - простагландин E2

TRPC3 – транзитен рецепторен потенциал

PKA-протеин киназа A

GPCRs - G-свързани протеинови рецептори

PLA2 – фосфолипаза A

SBD - Субстрат-свързващия домен

NF-κB - ядрен фактор-κB

TNF-α-тумор-некротичен фактор-α

IL-интерлевкин

CD14-кльстер на диференциация

ЕПР – ендоплазматичен ретикулум

HSR-отговор спрямо топлинен стрес

HSF1-транскрипционен фактор на топлинен стрес

HSEs-елементи на топлинен стрес

DBD - ДНК – свързващ домен

NLS – ядрен локализационен сигнал

cHSF3 - птичи HSF3

ErK1-MAP киназа

CaMKIV-калмодулин-зависима протеин киназаIV

PLK1-фосфолипаза K1

SAPK – стрес-активирана протеин киназа

JNK - Jun киназа

PDGF – отделян от тромбоцитите растежен фактор

PI3-K – фосфатидил инозитол 3-киназа

Akt/PKB – протеин киназа B

Ask1 - apoptosis signal-regulating kinase 1

EGF-R –рецептор за епидермален растежен фактор

Herc4 –убиквитин-протеин лигаза

ERK-extracellular signal-regulated kinases

Smac/Diablo-second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI

TGF-β-трансформиращ растежен фактор бета

TCTEL1-субединица на цитоплазмения и флагеларния динеин

PIP2 –фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат

CTS – съединително-тъканна преграда

R38 MAPK - митоген активирана протеин киназа

VEGF - васкуларен ендотелен растежен фактор

FGF2 - фибробластен растежен фактор 2

EGF - епидермален растежен фактор

ATP – аденозин трифосфат

ATPase–аденозин трифосфатаза

TJP1 – протеин 1 на плътните контакти

Rhox - reproductive homeobox X-linked

Lbx - ladybird-like homeobox

Shh - sonic hedgehog  
RVD - регулирано намаляване на клетъчния обем  
GRP - глюкоза-регулирущи протеини  
HSP70–протеин на топлинен стрес 70  
ADAM-a disintegrin and metalloproteinase  
CRISP-богат на цистеин секреторен протеин  
P26hи P34h-спермални протеини  
ICSI-интрацитоплазмена спермална инжекция  
GRP-глюкоза-регулирущи протеини  
mtHSP75-митохондриален HSP75  
CDC2 - циклин-зависима киназа 2  
sHSP – нискомолекулни протеини на топлинния стрес  
PKC - протеинкиназа C  
PKA - протеинкиназа A  
NLS - ядрен локализационен сигнал  
NBD - нуклеотид свързващ домен  
ADP-аденозин дифосфат  
AIF – апоптоза индуциращ фактор  
Araf-1-апоптотичен протеаза активиращ фактор 1  
CAD – каспаза активирана ДНаза  
ICAD - инхибитор на CAD

**Списък на използвани съкращения и символи на кирилица**

ДНК –дезоксирибонуклеинова киселина  
КТБ - кръвно – тестикуларна бариера  
СК –Сертолиеви клетки  
КЕБ - кръвно-епидидималната бариера  
БК - базални клетки  
АК - апикални клетки  
ТК - тясни клетки  
КК - клиър клетки  
ХК - хало клетки  
РНК-рибонуклеинова киселина

## ВЪВЕДЕНИЕ

В процесите на пролиферация, диференциация и апоптоза в тестиса при бозайници участват стресови протеини, които се експресират не само в резултат на физиологични стимули, но и в отговор на различни фактори, като хипертермия, хипоксия, наличие на тежки метали, недостиг на растежни фактори, присъствие на свободни радикали, инфекциозни агенти и други. Тъй като сперматогенезата е продължителен и силно чувствителен процес, който при повечето бозайници протича извън коремната кухина, повишаването на температурата може да провокира денатурация на протеините в диференциращите се полови клетки. Възникналият в скротума температурен стрес причинява атрофия на тестисите, сперматогенен арест и продукция на занижен брой сперматозоиди и/или такива с увредена ДНК - проблеми свързани с мъжкия инфертилитет. Половите клетки, които не успяват да репарират наличните в тях повреди, загиват чрез апоптоза, индуцирана от високата температура. Отговорът на клетките, спрямо неблагоприятните условия е синтезата на протеини на топлинния стрес (Heat shock proteins-Hsp), спадащи към различни семейства, които осигуряват устойчивост спрямо пагубния ефект на хипертермията.

Данните от литературата показват, че експресията на гените за нискомолекулните стрес протеини (sHSPs) в мъжките полови клетки е слабо проучена. Това ни дава основание да предположим, че нискомолекулните представители, по-специално  $\alpha$ B-crystallin, участват в регулацията на основните процеси на диференциация и матурация на клетките в тестиса и епидидимиса, и имат отношение към механизмите, поддържащи нормалната хомеостаза в мъжкия репродуктивен тракт.

В този смисъл специален интерес представляват молекулярните механизми и елементи на контрол на термо-индуцираната апоптоза, както и шаперон-медираните явления, при регулиране на оплождането на бозайници, които са все още недостатъчно добре проучени. Нашата хипотеза е, че при хипертермия HSPs-медираните процеси и апоптотични фактори повлияват съдбата на мъжките герминативни клетки в две направления – възстановяване или програмирана смърт.

Научните разработки в областта на изследване влиянието на високата температура върху репродуктивните органи, експресията на протеините на топлинния стрес и изучаване на молекулярните механизми на термо-индуцираната апоптоза в тестиса биха допринесли за установяване на специфичната им роля във физиологията на тестиса и мъжкия инфертилитет.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проучи участието на протеини на топлинния стрес и някои про- и анти-апоптотични фактори (Bax, Bcl-2, p53 и pro-caspase-3) в механизмите на клетъчна диференциация, матурация и апоптоза в тестиси и епидидимиси от мишка. Като обект на изследване са подбрани:

1. По-слабо проученият в тестикуларна тъкан представител на фамилията високомолекулни стресови протеини HSP70.
2. Непроученият в тестикуларна тъкан представител на фамилията нискомолекулни стресови протеини  $\alpha$ -crystallines –  $\alpha$ B-crystallin.

### 2. Задачи

За осъществяване на поставената цел си поставихме следните задачи:

1. Индуциране на топлинен стрес чрез *in vivo* и *in vitro* процедури и проследяване на ефекта му по време на пролиферацията, диференциацията и зреенето на мъжките полови клетки в тестиси и епидидимиси на мишки.
2. Морфологична и ултраструктурна характеристика на тестиси и епидидимиси от мишки в условия на термо-индуциран стрес.
3. Установяване на протеиновата локализация *in situ* на HSP70 и  $\alpha$ B-crystallin в тестиси и епидидимиси в условия на спонтанна и термо-индуцирана апоптоза.
4. Доказване присъствието на конститутивна (HSP73) и индуцируема (HSP72) изоформи на HSP70 в тестиси и епидидимиси от мишка и човек.
5. Изследване на генната експресия на протеините на топлинния стрес *hsp70* и  *$\alpha$ B-crystallin*, както и на някои маркери за апоптоза: *bcl-2*, *bax*, *p53*, *pro-caspase-3*, в условия на спонтанна и термо-индуцирана апоптоза.
6. Проследяване на протеиновата локализация на някои про-апоптотични (Bax, p53, caspase-3) и анти-апоптотични (Bcl-2) фактори, както и маркиране на клетки с апоптотични ядра (F7-26), при нормални условия и след термо-индуциран стрес.
7. Проучване на експресията и локализацията на HSP70 и някои апоптотични маркери в тестиси на инфертилни пациенти с крипторхизъм (естествен модел на апоптоза).

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За целите на лабораторните експерименти бяха използвани мъжки конвенционални мишки, линия Balb/c, разпределени в три възрастови групи: 6-дневни (препубертални), 18-дневни (пубертални) и 60-дневни (полово зрели). Броят на животните включени във всяка възрастова група беше 30.

Като обекти на изследването бяха използвани репродуктивни органи-семенници от трите възрастови групи мишки и надсеменници само от полово зрели индивиди, както и зрели сперматозоиди, изолирани от опашката на епидидимиса и семепроводите. Тъканните проби бяха разпределени в две групи: експериментална група - инкубирани при висока температура с цел индуциране на топлинен шок и контролна група - инкубирани при условия, необходими за нормалното образуване на мъжките гамети в половите жлези.

Лабораторните експерименти в настоящия дисертационен труд са проведени в секция “Имунобиология на репродукцията” при Институт по биология и имунология на размножаването-БАН. Всички процедури и третираня са извършени в съответствие с наредба №25 от 10.06.2003 на Министерството на земеделието и горите за етично отношение към лабораторните животни.

Експерименталните подходи включваха следните методи:

1. Методи за индуциране на топлинен стрес при мишка ин виво и ин витро
2. Ин виво процедура за индуциране на топлинен шок на полово зрели (60-ти ден) мишки
3. Ин витро процедура за индуциране на топлинен шок при 6-, 18- и 60-дневни мишки
4. Трансмисионна електронна микроскопия
5. Обработка, фиксиране и изготвяне на парафинови срези.
6. Обзорно хистологично изследване
7. Имунопероксидазни и имунофлуоресцентни методи
8. Количествено определяне на генната експресия (qRT-PCR)
9. SDS-PAGE (натриев додецил сулфат – полиакриламидна гел електрофореза), 2-D електрофореза и имуноблот (Western blot)



## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### 1. Хистологична характеристика на тестиси и епидидимиси от изследваните групи животни

При *6-дневните (препубертални)* мишки тестисите са изградени от семиниферни корди, без лумен, които съдържат пре-сперматогонии, разположени в центъра на кордите и незрели Сертолиеви клетки, които тапицират периферията на кордите. На тази възраст в тестиса протича активна пролиферация на полови и Сертолиеви клетки и е налице първи пик на спонтанна апоптоза.

При *18-дневните (пубертални)* мишки половите клетки навлизат в първа мейотична профaza. Оформя се лумен и в каналчетата присъстват пахитенни сперматоцити.

При *60-дневните (полово зрели)* мишки цикълът на сперматогенеза е напълно завършен. В центъра на семенните каналчета има добре оформен лумен и, в посока към базалната мембрана, се откриват всички стадии на сперматогенния процес.

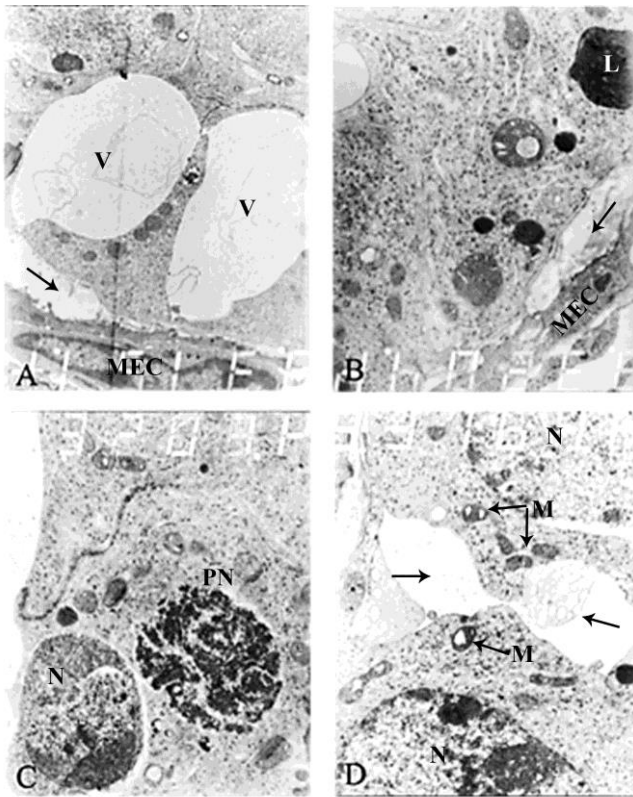
Епидидимисът при полово зрели мишки се състои от три основни сегмента – глава (*caput*), тяло (*corpus*) и опашка (*cauda*). Всеки сегмент съдържа еднореден многослоен епител, изграден от няколко клетъчни типа. Сперматозоидите се разполагат в лумена на канала, във всяка анатомична част.

Проведеното обзорно хистологично изследване на тестиси и епидидимиси не разкрива настъпилите изменения в репродуктивните органи, в условия на хипертермия. За по-прецизна ултраструктурна характеристика на тъканите приложихме електронно-микроскопски метод.

### 2. Ултраструктурна характеристика на тестис и епидидимис на мишка след еднократно топлинно въздействие

За да проследим ефекта на топлинния стрес, изследвахме ранните ултраструктурни изменения в тестиси и епидидимиси на полово зрели мишки. В резултат на еднократно топлинно третиране, повечето от семенните каналчета на експерименталните мишки бяха със запазена (нормална) структура. В някои от тях, обаче, се наблюдаваха различни по степен нарушения, независимо от цикъла на семиниферния епител. В цитоплазмата на някои Сертолиеви клетки бяха отчетени множество фагозоми, лизозоми и големи вакуоли (Фиг.1-А), както и нарушени контакти между тези клетки и базалната ламина (Фиг.1-А и Фиг.1-В). Бяха установени

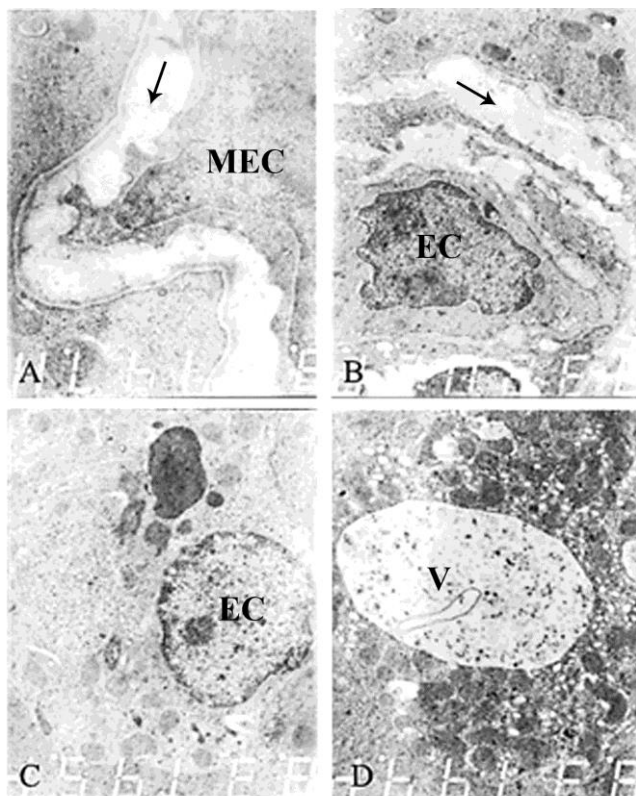
и нарушени контакти между половите клетки, разположени върху базалната мембрана (Фиг. 1-С и Фиг.1-D).



Фиг.1. Ултраструктурна характеристика на тестиси от полово зрели мишки. Означения: V-вакуоли; MEC-миоепителна клетка; L-лизозома; PN-пикнотично ядро; M-митохондрии; N-ядро; →-нарушени контакти между СК и базалната мембрана (А и В); →-нарушени контакти между полови клетки (D). Увеличение: 8000x

В епидидимидиса на опитните и контролните животни не бяха регистрирани различия между отделните клетъчни типове. След еднократното топлинно третиране епидидимисът беше със запазена, нормална ултраструктура. Наблюдавани бяха известни разширения на мембраните в базалния сегмент (Фиг.2-А и В). Ядрата на принципалните клетки, разположени върху базалната мембрана бяха добре запазени (Фиг.2-В и С). Наблюдава се вакуолизация на цитоплазмата на базалните клетки и отлагания на липидни капчици (Фиг.2-D).

Увреждащият ефект на топлинния стрес върху сперматогенезата при бозайници е описан в множество публикации. Някои автори допускат, че наблюдаваните структурни аномалии са съпроводени с нарушаване на  $Ca^{2+}$  -медираната сигнална трансдукция, тъй като има данни, че функцията на гена за калмодулин-зависима протеин киназа IV (CaMKIV), регулиращ транскрипционните процеси в мъжките полови клетки. Установената от нас вакуолизация на митохондриалния матрикс, най-вероятно свидетелства за увеличена пермеабилзация на митохондриалните мембрани.



Фиг.2. Ултраструктурна характеристика на епидидимиси от полово зрели мишки. Означения: MEC-миоепителна клетка; ЕС-епителна клетка; V-вакуоли; → - разширения между мембраните в базалния сегмент. Увеличение: 8000x

Това може да доведе до освобождаване в цитозола на разтворими апоптогенни молекули, отключващи както каспаза-зависима (медирана от cytochrom c), така и каспаза-независима, медирана от апоптоза-индуциращ фактор (AIF), каскада на апоптозата. Най-значимите изменения бяха свързани с нарушения на базалната мембрана, което се приема за ранен морфологичен белег на активирана клетъчна смърт, в резултат от повишено освобождаване на лизозомния ензим катепсин В.

За да изясним дали описаните нарушения, в топлинно третирани миши тестиси и епидидимиси, се извършват в резултат на термо-индуцирана апоптоза, проведохме допълнителни изследвания върху генната експресия и имуноцитохимичната локализация на протеините на топлинния стрес.

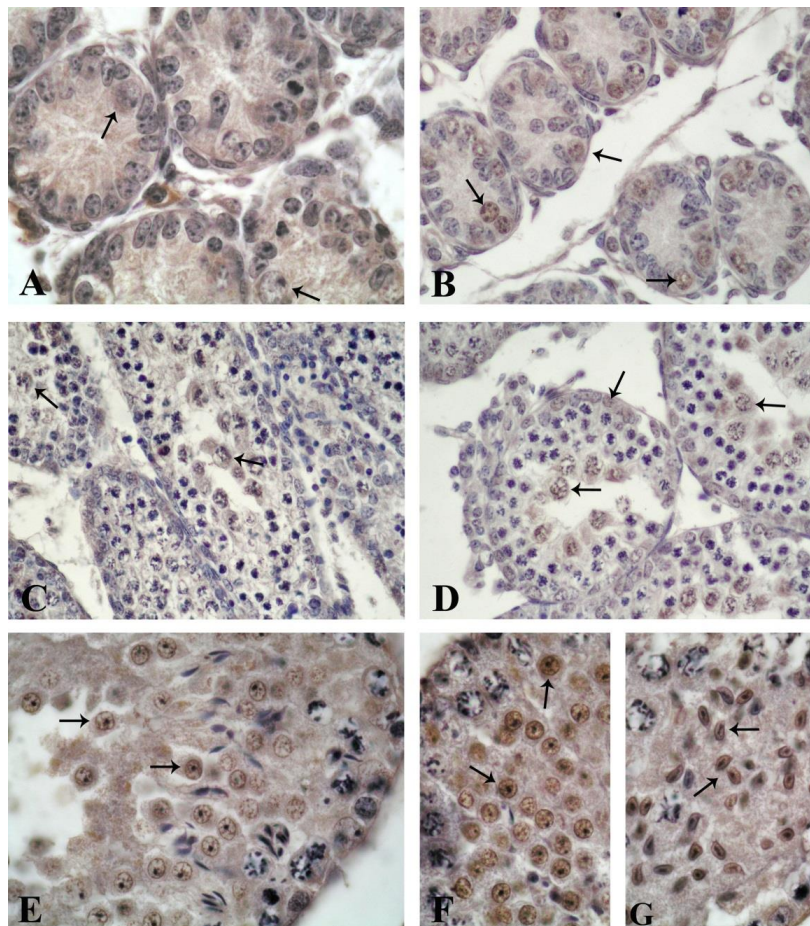
### 3. Локализация и физико-химична характеристика на HSP70

#### 3.1. Локализация на HSP70 в тестиси от мишки от трите възрастови групи, в условия на спонтанна и термо-индуцирана апоптоза.

Получените резултати показаха локализация на HSP70 в цитоплазмата и ядрата на сперматогониите в препуберталния тестис (6-ти ден) (Фиг. 3-А). След топлинен стрес, интензитетът на реакцията беше повишен, без промени в локализацията на протеина (Фиг. 3-В). Сертолиевите, перитубуларните и Лайдиговите клетки не бяха маркирани.

По време на пубертета (18-ти ден) експресия на HSP70 наблюдавахме в сперматогонии и пахитенни сперматоцити (късен пахитен към диплотен) (Фиг. 3-С). Ядрата на зиготенните сперматоцити не бяха маркирани. При опитната група животни беше регистрирано по-интензивно оцветяване (Фиг. 3-D). Перитубуларните, Сертолиевите и Лайдиговите клетки са негативни.

В полово зрелия тестис (60-ти ден) локализация на HSP70 беше отчетена в ядрата и цитоплазмата на кръглите сперматиди (Фиг.3-Е). Положителна реакция установихме още в ядрата на сперматогонии, пахитенните сперматоцити и някои елонгирани сперматиди в контролите проби. След топлинен стрес, силно изразена реакция се наблюдаваше в ядрата на кръглите сперматиди и цитоплазмата на пахитенните сперматоцити (късен пахитен) (Фиг.3-F, G). Сперматозоидите, перитубуларните клетки, зиготенните сперматоцити и Сертолиевите клетки бяха негативни.



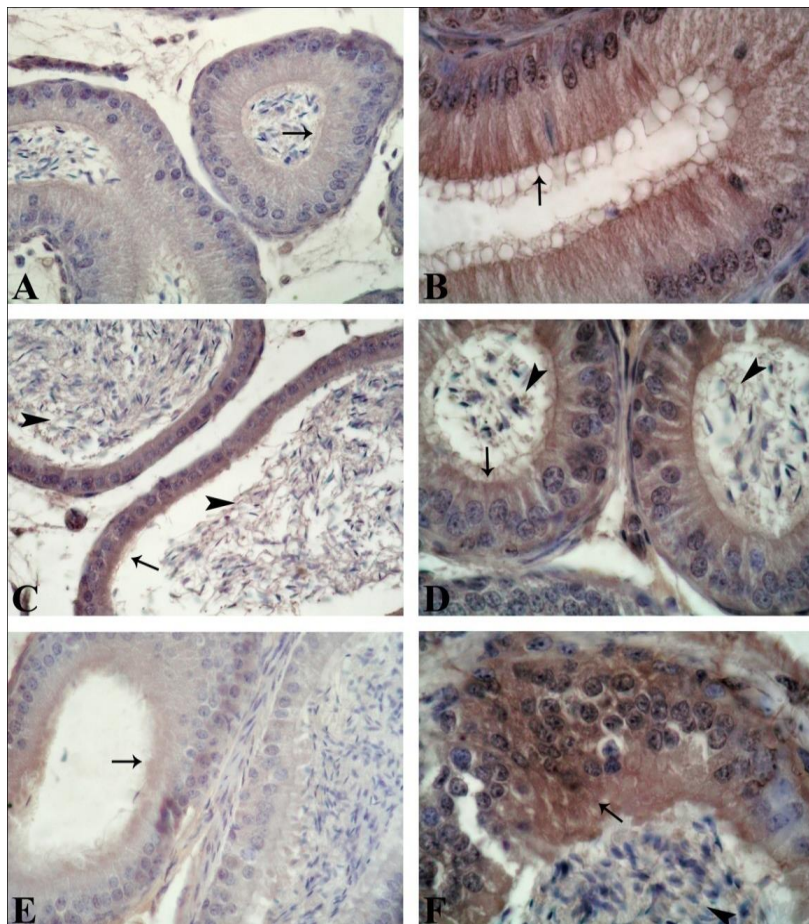
Фиг. 3. Локализация на HSP70 в миши тестис на 6-ти (A, B), 18-ти (C, D) и 60-ти (E, F, G) ден от раждането; A, C, E-контролни миши тестиси - 33°C; B, D, F, G-експериментални миши тестиси - 43°C. Означения: (A и B, стрелки) - сперматогонии; (C и D, стрелки) - пахитенни сперматоцити; (E и F, стрелки) - кръгли сперматиди; (G, стрелки) - елонгирани сперматиди. Увеличение, 40x

Ядрена локализация на HSP70 в резултат на топлинния стрес е наблюдавана в G1 или S фаза на HeLa клетки, което предполага участие на HSP70 във възстановяването

на ядрени увреждания, възникнали по време на клетъчния цикъл. Предполагаме, че ядрената транслокация на HSP70, в резултат на третирането, активира каскада от клетъчни сигнални пътища, водещи до реализиране на протективните функции на протеина.

### 3.2. Резултати от изследване на локализация на HSP70 в епидидимиси от полово зрели мишки.

При контролната група тъкани беше регистрирана слаба експресия на HSP70 в главата (Фиг.4-А) и в опашката (Фиг.4-С) на епидидимиса, докато в тялото (Фиг.4-Е) оцветяването беше по-силно. Реакцията е локализирана в цитоплазмата на епителните клетки във всички анатомични части (глава, тяло и опашка). След топлинното въздействие, реакцията беше със силен интензитет в апикалната част на епителните клетки, както и в микровилите. При сперматозоидите в лумена на тялото и опашката оцветяването бе локализирано в областта на акрозомата на сперматозоидите (Фиг.4-С, D, F).

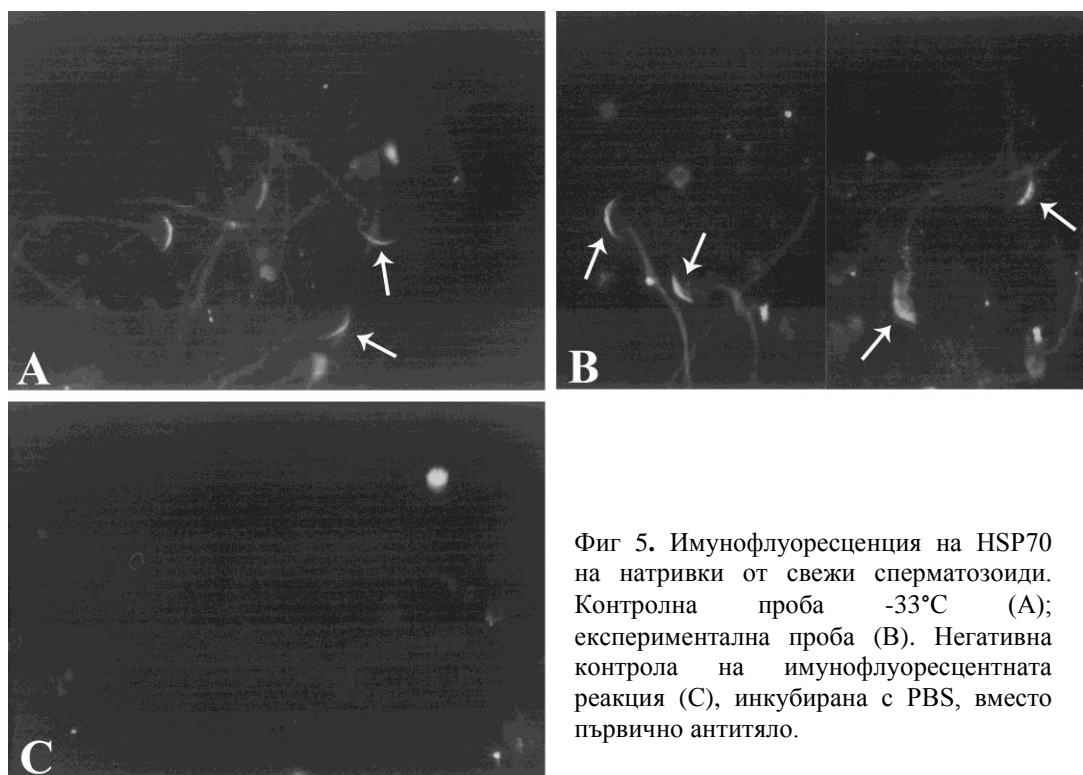


Фиг. 4. Локализация на HSP70 в миши епидидимис: А, С, Е-контролни групи 33°C; В, D, F-експериментални групи 43°C. А, В-глава на епидидимис; С, D-тяло; Е, F-опашка. Означения: → - епителни клетки; глава на стрела - сперматозоиди в лумена. Увеличение: А,С,Е-40x; В,Д,F- 100x

Резултатите ни дават основание да допуснем, че при нормални условия, липсата на ядрена локализация се дължи на присъствието само на конститутивната изоформа HSP73. По-задълбочени проучвания на други авторски колективи разкриват, че в епидидимиса HSP70 се експресира главно в цитоплазмата на принципалните клетки, но не и в базалните и клиър клетките, а в семепровода – в базалните, но не и в принципалните клетки. Острият топлинен стрес оказва вреден ефект върху репродуктивната система на възрастни мъжки мишки, а регион-специфичният и клетъчно-специфичният модел на експресия на HSP70 предполага важната му протективна роля в сперматогенезата и матурацията на сперматозоидите

### ***3.3. Имунофлуоресцентна локализацията на HSP70 в натривки от сперматозоиди от полово зрели мишки.***

Имунофлуоресцентният метод разкрива локализация на HSP70 в акрозомалния домен и в апикалната част на сперматозоидната главичка (Фиг.5-А). След топлинен шок, интензитетът на реакцията е по-силен, без промяна в локализацията (Фиг.5-В). Контролният препарат е инкубиран с PBS, вместо първо антитяло, като негативна контрола на реакцията (Фиг.5-С).



Фиг 5. Имунофлуоресценция на HSP70 на натривки от свежи сперматозоиди. Контролна проба -33°C (А); експериментална проба (В). Негативна контрола на имунофлуоресцентната реакция (С), инкубирана с PBS, вместо първично антитяло.

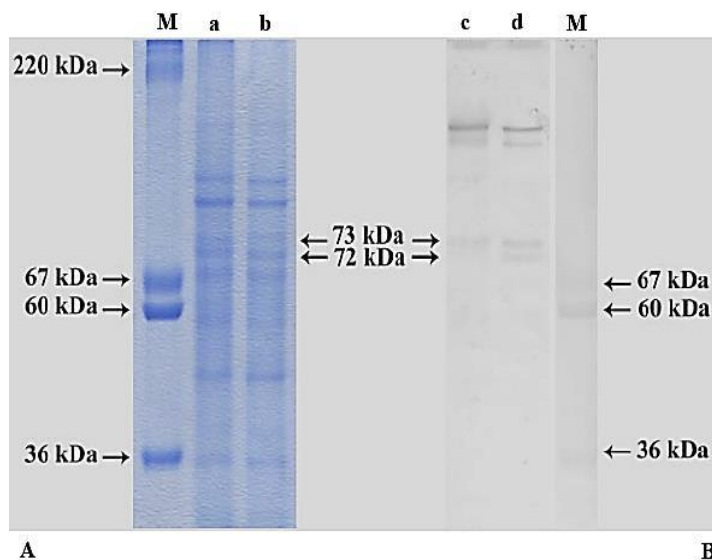
Тези данни са в съответствие с изследванията и на други автори. Huang и съавтори, 2000 доказват присъствието на конститутивна и индуцируема изоформи на HSP70 при сперматозоиди от нерез. Качествените показатели на спермата (концентрация, подвижност, процент нормални и абнормални сперматозоиди, процент на сперматозоиди с проксимална и дистална плазмени капчици) показват тенденция към значително влошаване в проби с по-ниски нива на HSP70. Резултатите показват, че нивата на HSP70 при сперматозоиди от нерез са значително занижени по време на топлия сезон и навярно са свързани с качеството на спермата.

### 3.4. Характеристика на изоформите на HSP70 при тестиси от мишка и човек

#### 3.4.1. Резултати от SDS-PAGE и Имуноблот

Тъй като поликлоналното антитяло срещу HSP70 не може да разграничи специфичната локализация на двете изоформи HSP73/HSP72, чрез приложения имунохистохимичен метод, използвахме биохимични методи за да установим специфичната им експресия в нашите проби.

В условия на хипертермичен стрес, в екстрактите на миши тестиси (Фиг.6-d), антитялото срещу HSP70 разпознава същата изоформа HSP73, като беше отчетен по-висок интензитет на специфичната реакция, спрямо тази в екстрактите от нетретираните тестиси (Фиг.6-с). За разлика от нетретираните тестиси, в екстрактите от стресираните беше наблюдавана появата на още една белтъчна ивица, съответстваща на индуцируемата изоформа - HSP72 (Фиг.6- d).

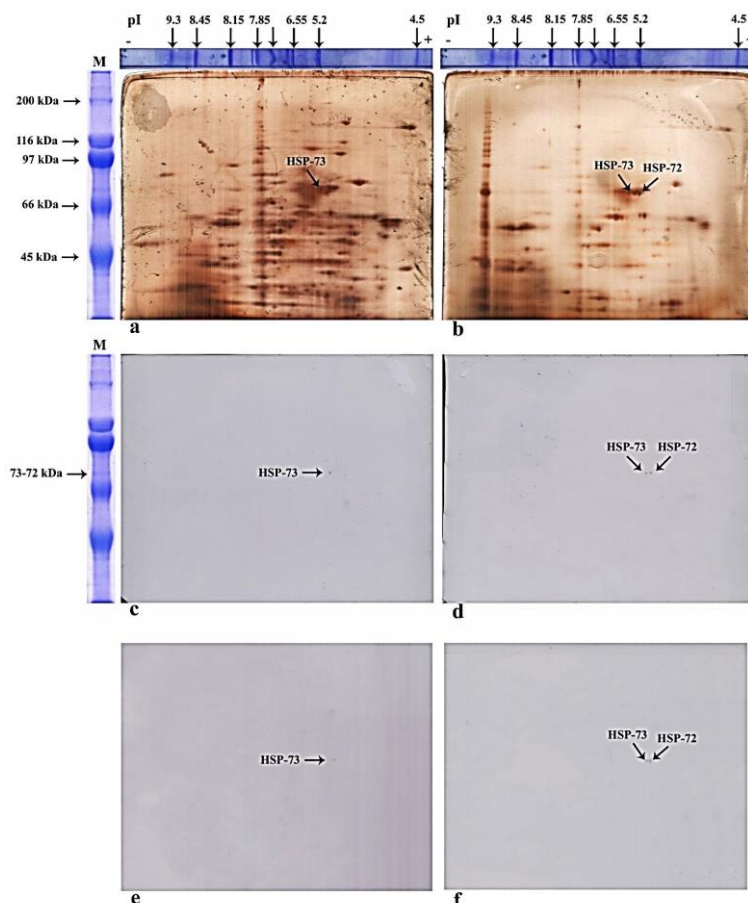


Фиг. 6. SDS-PAGE (A) и Имуноблот (B) на екстракти от нетретираните (a, c) и топлинно третираните миши тестиси (b, d). След хипертермия се повишава интензитетът на специфичната реакция на антитялото срещу изоформата HSP73. Отчетохме присъствие на допълнителен банд в експерименталната проба отговарящ на индуцируемата изоформа HSP72. (M) - маркер за молекулно тегло на протеини.

Този резултат е в съгласие с данните от Tavaia и съавтори, 1996, които установяват, че HSP73 е също толкова ефективна, колкото и HSP72 в реактивиране на топлинно-увредената луциферазна експресия в клетките на бозайниците. HSP73 навярно се мобилизира по отношение превенция на апоптозата в тестиса и подпомага процеса на възстановяване на протеините с конформационни изменения, в резултат на топлината. След приложен топлинен шок на тестиси от мишка, резултатите показаха детекция на протеинова ивица с приблизително молекулно тегло 72 kDa, съответстващ на индуцируемата изоформа (HSP72). Съществуват доказателства, че индуцируемият протеин се експресира само в условия на топлинно-индуцирана апоптоза, по клетъчно-специфичен модел, натрупва се в G1 и S фази на клетъчния цикъл и вероятно се свързва с протекция на процеса сперматогенеза.

### 3.4.2. Резултати от двумерната електрофореза с последващ имуноблот

При сравнение на протеиновия профил на екстракти от контролни и експериментални тестиси, най-значителни различия наблюдавахме сред белтъците, разпределени в областта между маркерите с молекулни тегла 97 и 45 kDa (Фиг.7-а и Фиг.7-б).



Фиг. 7. Двумерна електрофореза на протеинови екстракти от нетретиран (а) и топлинно третиран (б) миши тестис. Имуноблот на HSP72 и HSP73 в екстракти от не третиран (с) и топлинно третиран (д) миши тестис. Имуноблот на екстракти от контролни (е) и експериментални (ф) миши епидидимиси.

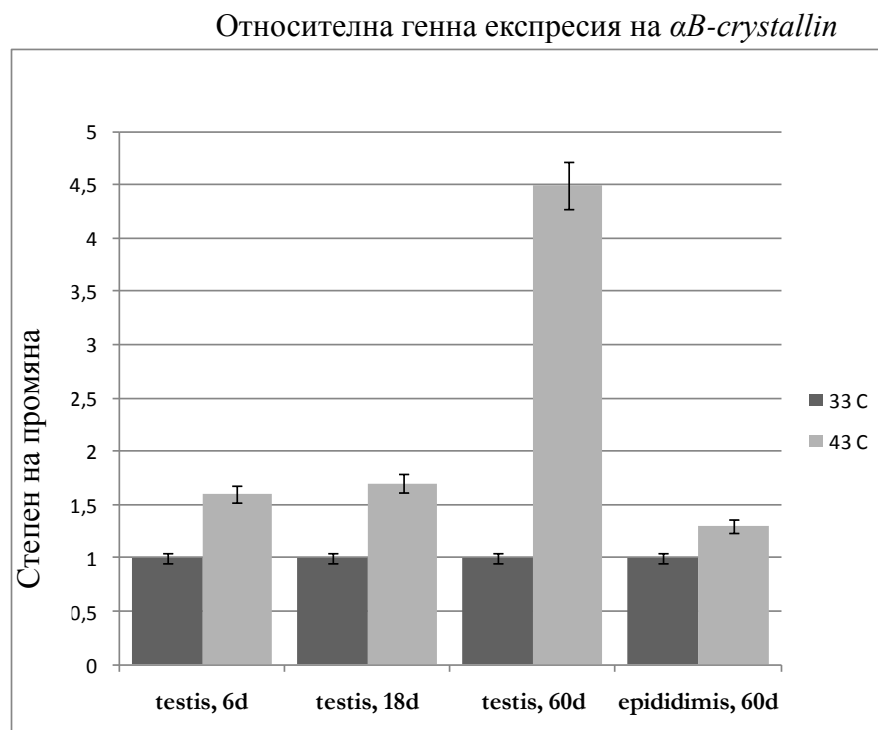


В топлинно третираните тестиси отчетохме силно редуциране на петната в диапазона между изоелектрична точка 8.15 и 4.5 (Фиг.7-b.). При последващ имуноблот, конститутивната изоформа на HSP73 бе регистрирана в нетретираните (Фиг.7-с) и в топлинно-третираните (Фиг.7-d) тестиси. Индуцируемата изоформа HSP72 присъства само в екстракти от топлинно третирани тестиси (Фиг. 7-d). Резултатите от имуноблот анализа на екстракти от миши епидидимиси показва същите данни, както при тестиса, а именно - присъствие на конститутивен протеин HSP73 в нетретираните проби (Фиг.7-е) и наличие на HSP72 и HSP73 в третираните (Фиг.7-f).

#### 4. Локализация и генната експресия на *$\alpha$ B-crystallin* в условия на хипертермия.

##### 4.1. Генна експресия на *$\alpha$ B-crystallin*

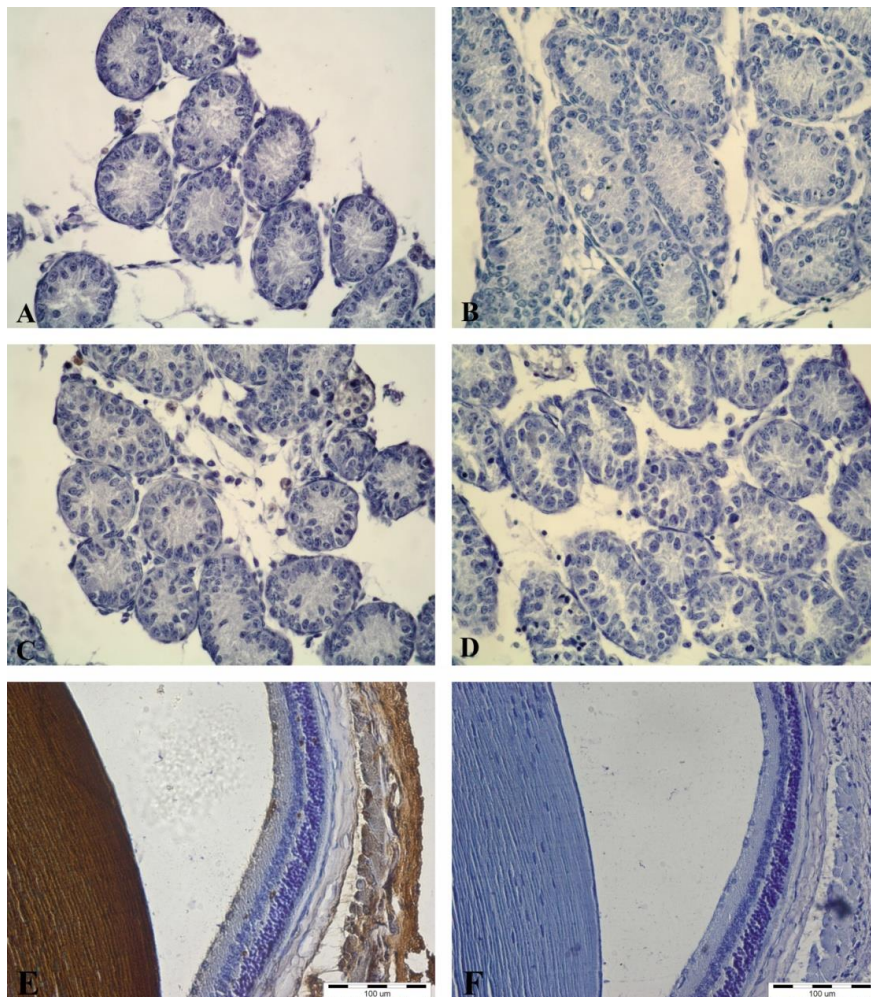
Тъй като в литературата съществуват данни, подкрепящи анти-апоптотичната роля на протеините на топлинния стрес в клетки, поставени при неблагоприятни и/или летални за тях обстоятелства на средата, беше проведен количествен PCR в реално време за установяване на нивата на мРНК на  *$\alpha$ B-crystallin*, в условия на хипертермия.



Фиг. 8. Относителна генна експресия на  *$\alpha$ B-crystallin* в пъти (n-fold), в котролни и топлинно третирани тестиси на мишки от трите възрасти и епидидимиси на полово зрели животни. Данните бяха нормализирани спрямо нивата на  *$\beta$ -actin* транскриптите в съответните проби и представени като *mean fold change*  $\pm$  *SD*, \*P < 0.05.

**4.2. Локализация на  $\alpha$ B-crystallin в тестиси от мишки от трите възрастни групи, в условия на спонтанна и термо-индуцирана апоптоза, посредством имунопероксидазен метод.**

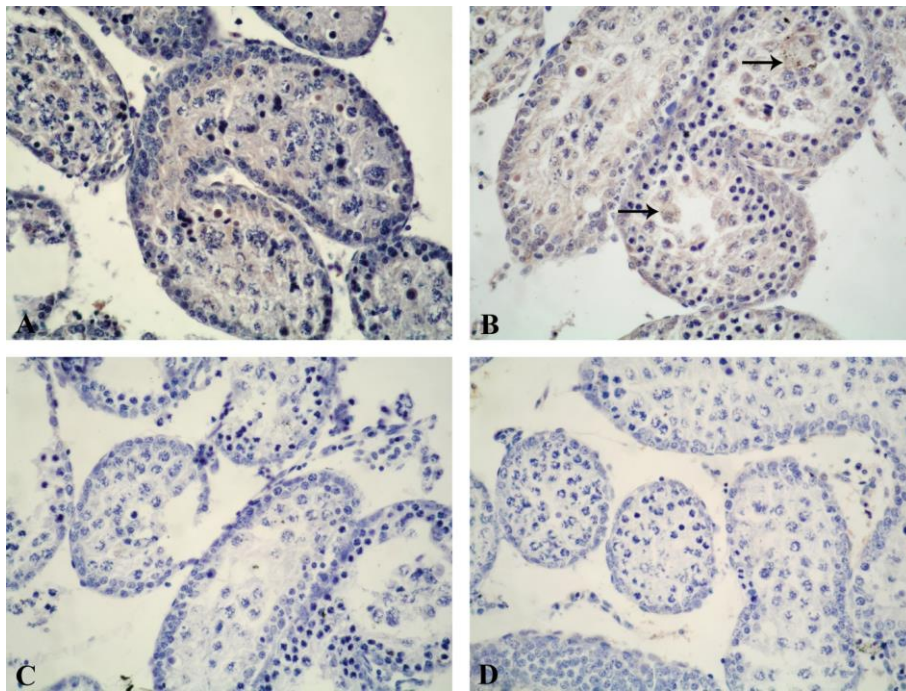
Получените резултати показаха, че в препуберталния тестис не беше отчетена експресия на  $\alpha$ B-crystallin нито в половите, нито в соматичните клетки и при двете групи животни – контролни (33°) (Фиг.9-А) и опитни (43°) (Фиг. 9-С). Негативните контроли на реакциите в нетретирани (Фиг.9-В) и третирани (Фиг. 9-Д) тестиси също бяха отрицателни. Като позитивна контрола на протеиновата експресия на  $\alpha$ B-crystallin използвахме око от възрастна мишка. Установихме интензивна експресия на  $\alpha$ B-crystallin в очната леща (Фиг. 9-Е).



Фиг. 9. Локализация на  $\alpha$ B-crystallin в 6-дневни миши тестиси. А и В – контролни миши тестиси - 33°С със (А) и без (В) първично антитяло; С и D – миши тестиси - 43°С със (С) и без (D) първично антитяло. Позитивна контрола на експресия на  $\alpha$ B-crystallin в очна леща на мишка (Е) и съответстваща негативна контрола, без първично антитяло (F). Увеличение, 40x

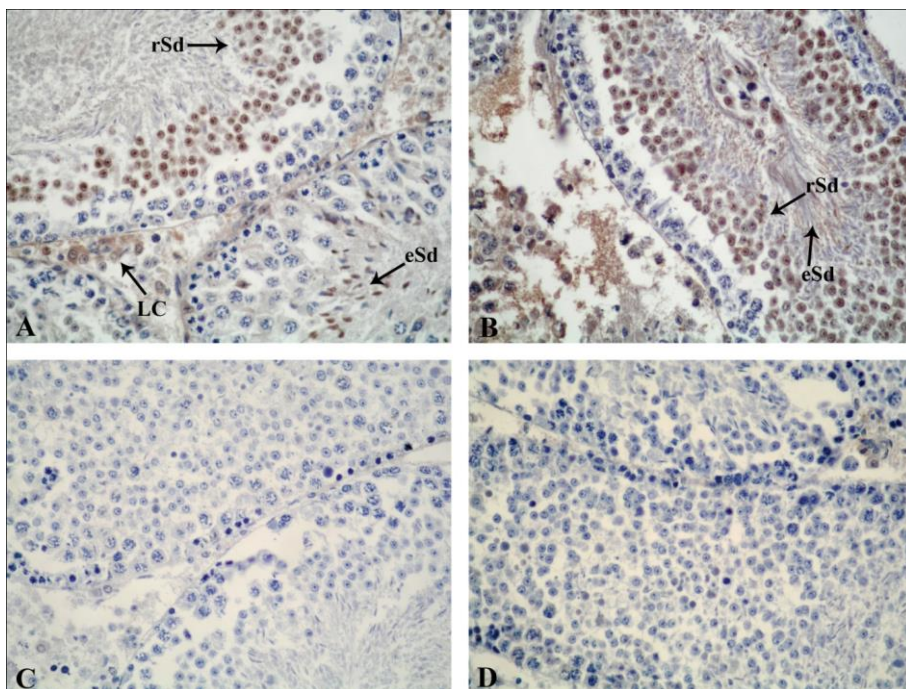
В периода на пубертета, в тестикуларната тъкан наблюдавахме много слаба реакция за  $\alpha$ B-crystallin (Фиг.10-А). След топлинен шок, оцветяването отново беше

слабо, локализирано в цитоплазмата на пахитенните сперматоцити, докато ядрата им бяха отрицателни (Фиг.10-В).



Фиг 10. Локализация на  $\alpha$ B-crystallin в 18-дневни миши тестиси. А и С – контролни миши тестиси - 33°C със (А) и без (С) първично анти тяло; В и D – миши тестиси - 43°C със (В) и без (D) първично анти тяло. Означения: (В, стрелки) – пахитенни сперматоцити. Увеличение, 40х

В полово зрелия миши тестис,  $\alpha$ B-crystallin беше локализиран в ядрата на кръглите сперматиди (rSd), в ядрата на част от удължените сперматиди (eSd), в опашките на сперматозоидите, както и в цитоплазмата на Лайдиговите клетки (LC) (Фиг.11-А). След инкубация на 43°C, реакцията беше по-интензивна, показател за засилена синтеза на протеина в екстремните условия (Фиг.11-В).

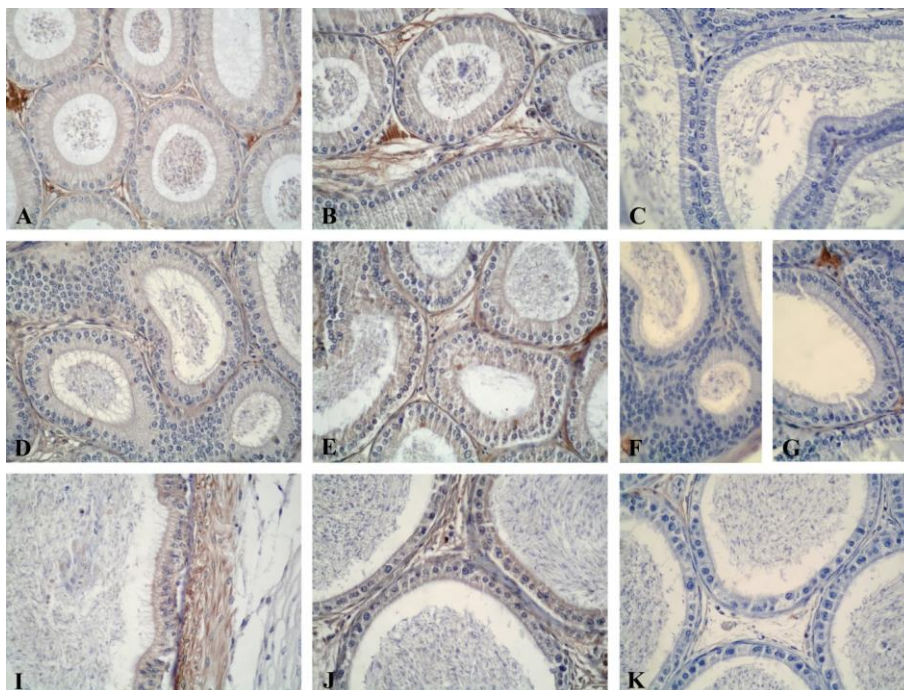


Фиг. 11. Локализация на  $\alpha$ B-crystallin в 60-дневни миши тестиси. А и С – контролни миши тестиси - 33°C със (А) и без (С) първично анти тяло; В и D – миши тестиси - 43°C със (В) и без (D) първично анти тяло. Означения: rSd - кръгли сперматиди, eSd - удължени сперматиди, LC - Лайдигови клетки. Увеличение - 40х

В нашите експерименти ние доказваме стадийно-специфична и клетъчно-специфична експресия на  $\alpha$ B-crystallin, която в зрелия семиниферен епител, вероятно е свързана с матурацията на сперматидите, а след хипертермия - с участието на протеина в клетъчния отговор спрямо приложени стрес. Данните от qPCR потвърждават силната генна експресия в полово зрелия тестис, особено след топлинното въздействие. В литературата липсват данни за експресията на  $\alpha$ B-Crystallin в репродуктивни органи. Масір и съавтори, 1997 съобщават, че генната експресия на  $\alpha$ B-Crystallin намалява от 6-ти до 8-ми ден по време на ембриогенеза при пилета. В групата на ниско-молекулните протеини на топлинния стрес тестис-специфични представители са HSPB9 и HSPB10, установени при човек, гризачи и коза.

#### **4.3. Резултати от изследване на локализация на $\alpha$ B-crystallin в епидидимиси от полово зрели мишки, посредством имунопероксидазен метод.**

В контролната група беше отчетена слаба реакция на антитялото срещу  $\alpha$ B-crystallin, локализирана в апикалната част на цитоплазмата на епителните клетки и в опашките на сперматозоидите в лумена на главата на епидидимиса (Фиг.12-А). При инкубиране на 43°C, реакцията бе по-силна, без промяна в локализацията (Фиг. 12-В).



Фиг. 12. Локализация на  $\alpha$ B-crystallin в епидидимиси на полово зрели мишки. А,Д,І-контролни групи 33°C; В,Е,Ж-експериментални групи 43°C. А,В-глава на епидидимис; Д,Е-тяло; І,Ж-опашка. Негативни контроли на реакциите, без първично антитяло - С,Ф,Г,К. Увеличение, 40x

В тялото на епидидимиса, положителна реакция беше наблюдавана в цитоплазмата на епителните клетки (Фиг. 12-Д), но със значително по-слаб интензитет

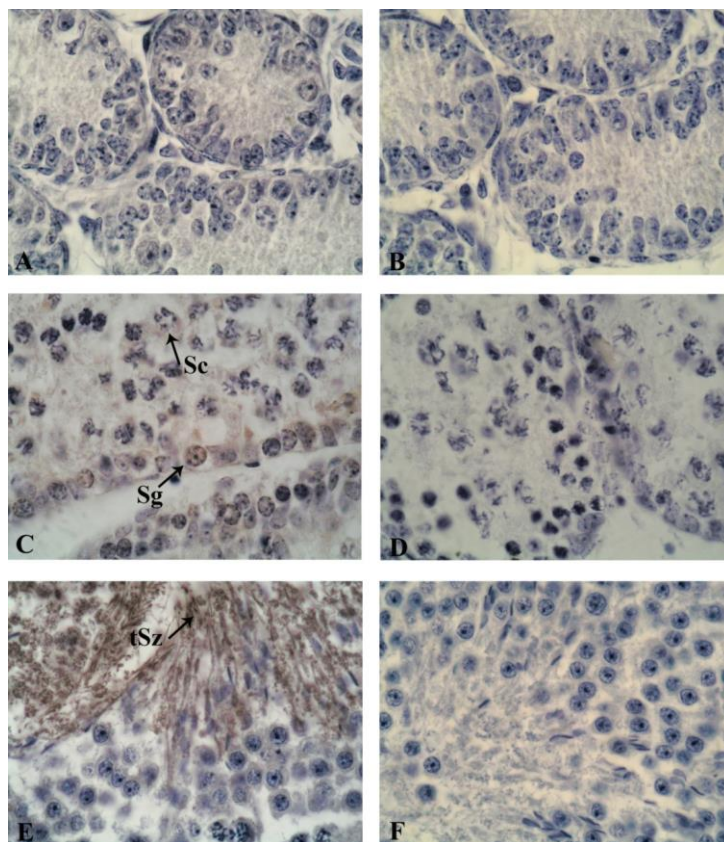
в сравнение с епитела и опашките на сперматозоидите от главата на епидидимиса. След инкубация на 43°C, отчетохме по-интензивна реакция (Фиг. 12-Е).

В опасната част на епидидимиса отново наблюдавахме локализация в цитоплазмата на епителните клетки, която беше с по-силен интензитет след приложението топлинен стрес (Фиг. 12-І, J).

В заключение, проведените имунопероксидазни и имунофлуоресцентни реакции, за установяване на локализацията на  $\alpha$ B-crystallin, ясно демонстрират повишени нива на този протеин в главата и опашката на епидидимиса, особено след стрес и относително по-слаба експресия в тялото, без оглед на ретирането.

#### ***4.4. Локализация на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) в тестиси от мишки, от трите възрастови групи, в условия на спонтанна и термо-индуцирана апоптоза, посредством имунопероксидазен метод.***

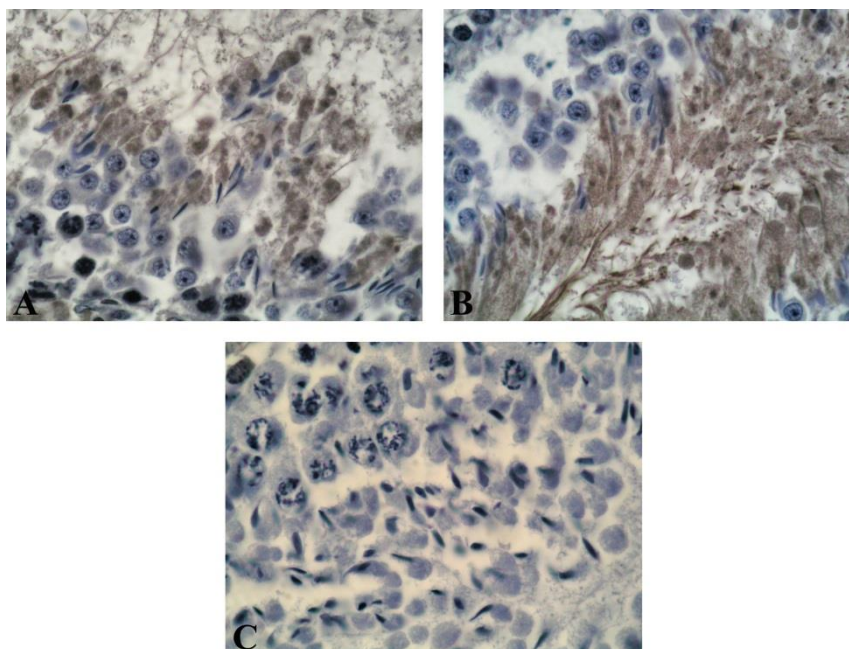
Резултатите от имунохистохимичното изследване за фосфорилирания p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) показаха стадийно- и клетъчно-специфична експресия и локализацията в тестисите (Фиг. 13).



Фиг. 13. Локализация на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) в контролни проби от тестиси на мишки на възраст 6-ти ден (A, B), 18-ти ден (C, D) и 60-ти ден (E, F). Снимки B, D и F са негативни контроли на реакциите, без първо анти тяло. Означения: Sg - сперматогонии, Sc – сперматоцити, tSz - опашка на сперматозоиди. Увеличение, 100x.

В препуберталната тъкан от контролната група не беше наблюдавана експресия на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) (Фиг.13-А). В пуберталния тестис беше отчетена локализация в единични сперматогонии и в цитоплазмата на пахитенните сперматоцити (Фиг. 13-С). В полово зрелия тестис, p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) беше регистриран в опашката на сперматозоидите (Фиг.13-Е) и в Лайдиговите клетки (данните не са представени).

След топлинното третиране, реакцията в 6- и 18- дневни миши тестиси беше идентична на тази, наблюдавана в контролните проби (данните не са представени). На възраст 60-ти ден, в тестите беше наблюдавана силна отчетлива реакция за p- $\alpha$ B-crystallin в опашката на елонгирани сперматиди, в късен стадий на матурация, в опашката на сперматозоидите и в резидуалните телца (Фиг.14-А и Фиг.14-В).



Фиг. 14. Локализация на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) в експериментални проби от тестиси на мишки на възраст 60-ти ден (А,В) Снимка С е негативна контрола на реакцията, без първо анти тяло. Увеличение 100х.

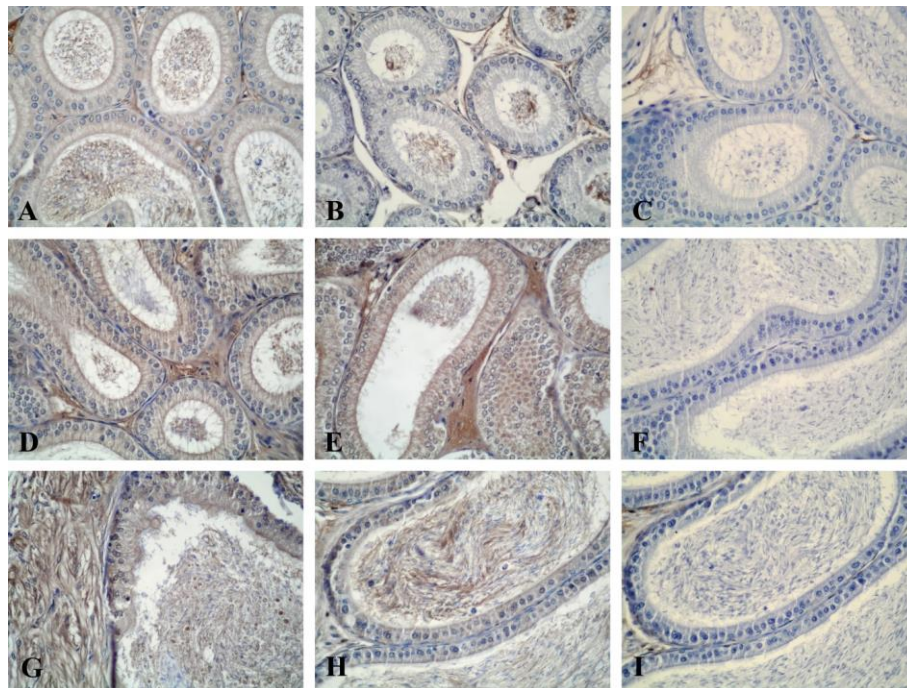
В заключение, резултатите показаха, че в сравнение с  $\alpha$ B-crystallin, фосфорилираният протеин не се експресира в ядрата на кръглите сперматиди, както при нормални условия, така и при стрес (Фиг.13 и Фиг.14).

Под действието на екстрацелуларен стрес, в клетките на бозайниците се индуцира фосфорилиране на  $\alpha$ B-Crystallin в три серинови остатъка Ser-19, Ser-45 Ser-59 .Фосфорилираните форми на  $\alpha$ B-crystallin играят важни роли в процесите на пролиферация и диференциация на клетките.  $\alpha$ B-crystallin се фосфорилира по развитийно-зависим начин в очна леща от плъх при Ser-45, като протеин киназната активност, отговорна за фосфорилирането в това място, също се повишава съществено,

по време на първите няколко седмици след раждането. Предполага се, че тази активност играе критична роля в клетките изложени на топлинен шок или оксидативен стрес, поради добре известната способност на тези увреждащи фактори да водят до колапс на F-актиновия цитоскелет. Дори леките смущения настъпили в клетъчния цитоскелет (микрофиламенти, микротубули и интермедиерни филаменти), водят до активиране на различни сигнални пътища отговорни за фосфорилиране на  $\alpha$ B-crystallin. Експресия на фосфорилираната форма също е отчетена по време на ремоделирането на актиновите филаменти – основни структури за процесите на клетъчна миграция и подвижност.

#### **4.5. Резултати от изследване на локализация на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) в епидидимиси от полово зрели мишки.**

Локализация на фосфорилиран  $\alpha$ B-crystallin беше установена в цитоплазмата на епителните клетки от трите хистологични части на епидидимиса, както и в опашната част на сперматозоидите (Фиг.15-А, D, G). След топлинен стрес беше наблюдавана по-интензивна експресия на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) (Фиг.15-В, Е, H).



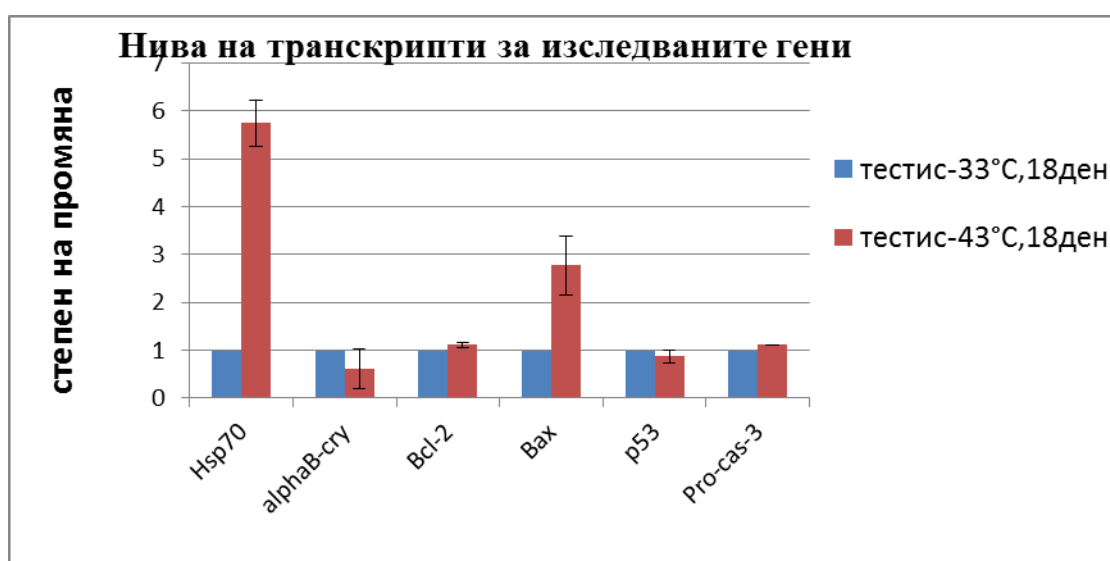
Фиг 15. Локализация на p- $\alpha$ B-crystallin (Ser-59) в епидидимиси на полово зрели мишки. А,D,G- контролни групи 33°C; В,Е,H-експериментални групи 43°C. А,В-глава на епидидимис; D,Е-тяло; G,H- опашка. Негативни контроли на реакциите, без първично антитяло - C,F,I. Увеличение, 40x

По отношение на епидидимиса, фосфорилираният  $\alpha$ B-crystallin показва най-интензивна реакция в тялото на епидидимиса, както преди, така и след топлинен стрес (Фиг.15-D и Фиг.15-E). Друг интересен резултат е, че епителът на главата и опашката е

по-слабо оцветен след приложения стрес, докато реакцията в опашките на сперматозоидите остава интензивна (Фиг.15-В и Фиг.15-Н).

##### 5. Изследване на генната експресия на протеините на топлинния стрес *hsp70* и *$\alpha$ B-crystallin*, както и на някои маркери за апоптоза: *Bcl-2*, *Bax*, *p-53*, *pro-caspase-3* в условия на хипертермия.

В тестиси на 18 дневни мишки, температурния стрес индуцира 5,74 и 2,77 пъти по-високи нива на *hsp70* и *bax* транскриптите. По отношение на  *$\alpha$ B-crystallin* *bcl-2*, *pro-caspase-3* и *p53* не бяха доказани достоверни разлики (Фиг.16).



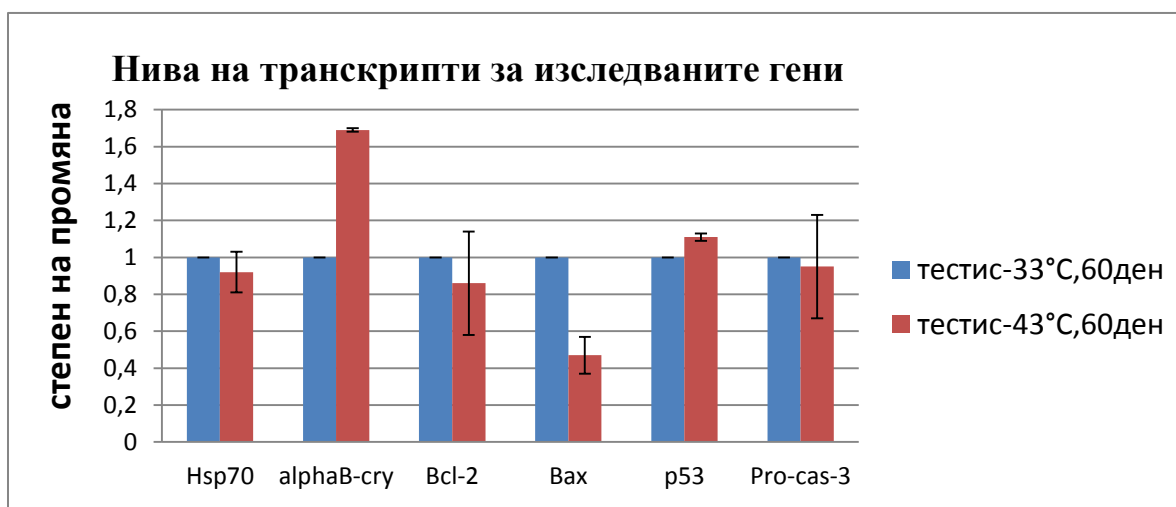
Фиг. 16. Относителна генна експресия на *hsp70*,  *$\alpha$ B-crystallin*, *bcl-2*, *bax*, *p53* и *pro-caspase-3* в тестиси от 18-дневни мишки. В пубертални мишки тестиси, топлинният стрес индуцира завишени нива на мРНК за *hsp70* и *bax*.

Този резултат показва, че в отговор на подаден сигнал за апоптоза в клетките се задейства механизъм за репарация. Резултатите от имунохистохимията също имат потвърдителен характер по отношение на интензивната протеинова експресия на HSP70 и Bax в тестиси и епидидимиси от половозреели мишки, особено след стрес. Известно е, че само половин час след топлинния стрес, приложен върху тестиси, се индуцира транслокация на про-апоптотичния фактор Bax от цитоплазмата в периферията на ядрото на апоптотичните клетки, съпроводена с освобождаване на cytochrom c в цитозола. Това от своя страна е свързано с активиране на инициаторна каспаза-9 и последващо активиране на екзекуторни каспази-3, -6 и -7, които осъществяват апоптотичната смърт на клетката. Възможно е повишената генна експресия на HSP70 да блокира топлинно-индуцираната апоптоза, чрез директно



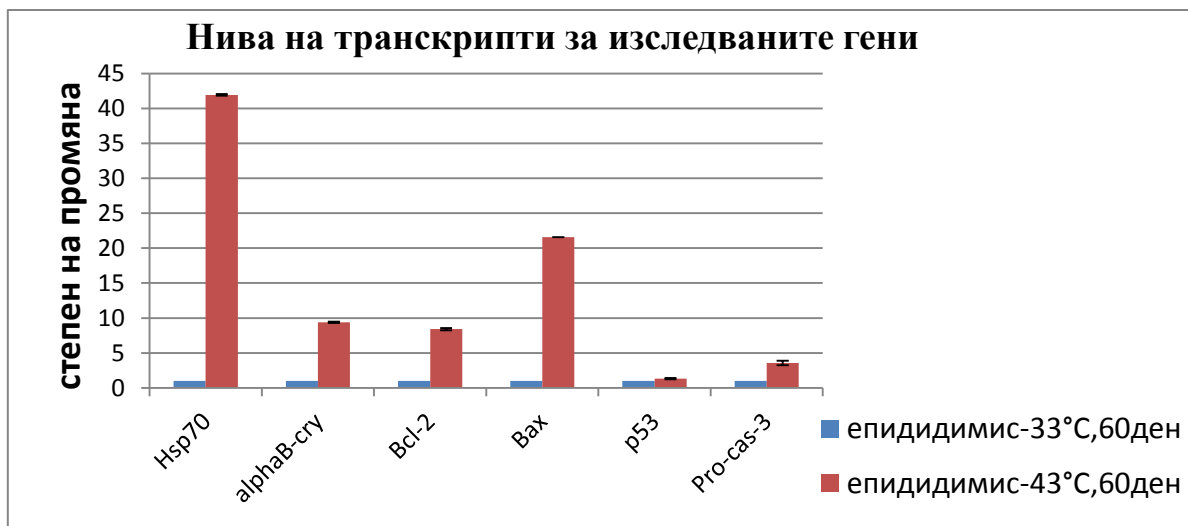
инхибиране на Вах и освобождаване на про-апоптотични фактори от митохондриите или чрез потискане на JNK-сигнален път, който активира Вах в експерименти с UV-индуцирана апоптоза на сърдечна мускулатура.

В полово зрели миши тестиси, стресът индуцира най-висока генна експресия на *αB-crystallin*, 1,69 пъти спрямо не третираните проби. Транскриптите на *p53* бяха увеличени 1,11 пъти в топлинно третирания тестис, а за *hsp70* *bcl-2*, *bax*, *pro-caspase-3* не беше доказана достоверна разлика в нивата на мРНК (Фиг.17).



Фиг.17 Относителна генна експресия на *hsp70*, *αB-crystallin*, *bcl-2*, *bax*, *p53* и *pro-caspase-3* в тестиси от полово зрели мишки. Нивата на *αB-crystallin* транскриптите в полово зрелия миши тестис бяха повишени значително, в резултат на топлинния стрес.

В полово зрели миши епидидимиси, в резултат на температурен стрес, най-силно беше повлияна генната експресия за *hsp70* и *bax*, като нивата на мРНК бяха повишени, съответно с 41,93 и 21,56 пъти спрямо контролните проби. *αB-crystallin* транскриптите също показаха завишени нива на експресия в топлинно третирани епидидимиси спрямо контролните - 9,38 пъти. В условия на хипертермия експресията на гените за анти-апоптотичния и про-апоптотичния маркери *bcl-2* и *pro-caspase-3* беше увеличена, съответно с 8,4 и 3,56 пъти. Както в тестиси, така и в епидидимиси на полово зрели мишки *p53* транскриптите бяха слабо повлияни от високата температура и при тях не бе отчетена достоверна разлика в нивата на мРНК (Фиг.18).



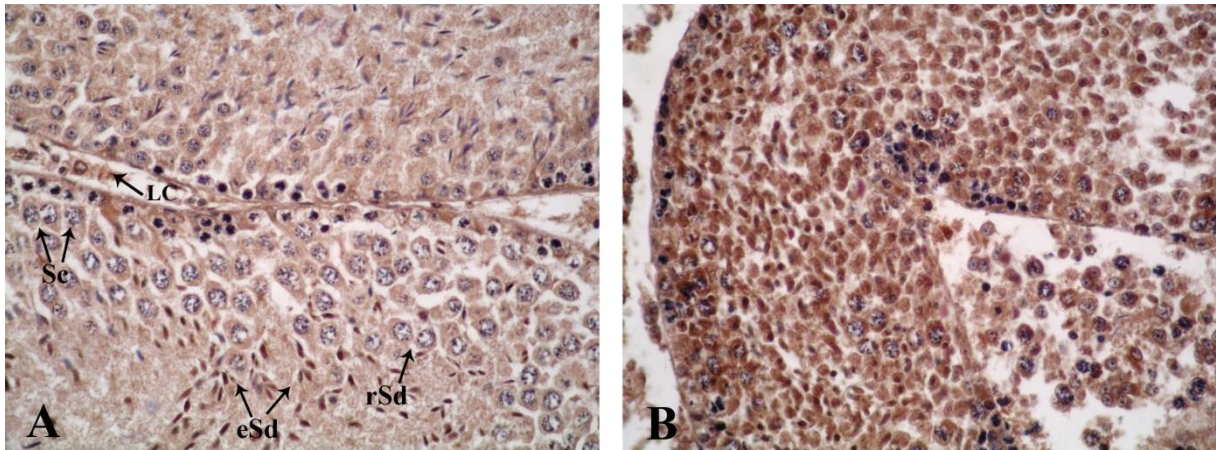
Фиг. 18. Относителна генна експресия на *hsp70*, *αB-crystallin*, *bcl-2*, *bax*, *p53* и *pro-caspase-3* в епидидимиси от полово зрели мишки. Нивата на *hsp70* и *bax* транскриптите показаха достоверна разлика в топлинно третирания епидидимис спрямо нетретирания.

От проведените от нас експерименти върху генната експресия установихме, че повишената температура индуцира по-високи нива на всички изследвани гени, което определя този орган като силно чувствителен на топлинен стрес. Температурата регулира генната експресия и функцията на епидидимиса. Апоптозата при половите клетки засяга съществено ранните (I-IV) и късните (XII-XIV) стадии на сперматогенезата и се активира в рамките на 6-тия час, след хипертермия при плъхове и се предшества от редистрибуция на Вах от цитоплазмата в перинуклеарното пространство в рамките на 0,5-тия час. За разлика от Вах, Bcl-2 е разпределен в цитоплазмата и ядрото на онези клетъчни типове, чувствителни към топлинно-индуцираната апоптоза. Bcl-2 се повишава значително след 6-тия час от третирането.

## 6. Проследяване на локализацията на някои проапоптотични (Вах, p-53, caspase-3) и антиапоптотични (Bcl-2) маркери, както и маркиране на апоптотични ядра (F7-26) в тестиси на полово зрели мишки.

### 6.1. Локализация на Вах в тестиси на полово зрели мишки

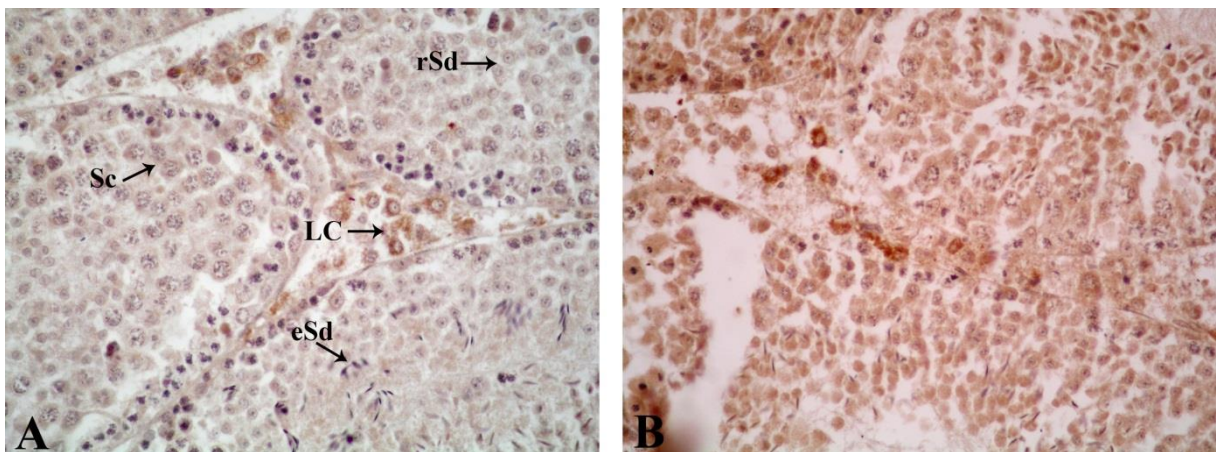
Локализация на Вах беше наблюдавана в цитоплазмата на Лайдиговите, Сертолиевите и половите клетки, както и в ядрата на част от удължените сперматиди. Като цяло, ядрата на половите клетки са отрицателни (Фиг.19-А). В условия на топлинен стрес беше установена цитоплазматична реакция във всички типове полови и соматични клетки (Фиг.19-В).



Фиг 19. Локализация на про-апоптотичен протеин Bax в тестиси от полово зрели мишки с (А) и без стрес (В). Означения: Sc – сперматоцити; rSd - кръгли сперматиди; eSd - елонгирани сперматиди; LC - Лайдигови клетки. Увеличение, 40x

### 6.2. Локализация на Bcl-2 в тестиси на полово зрели мишки

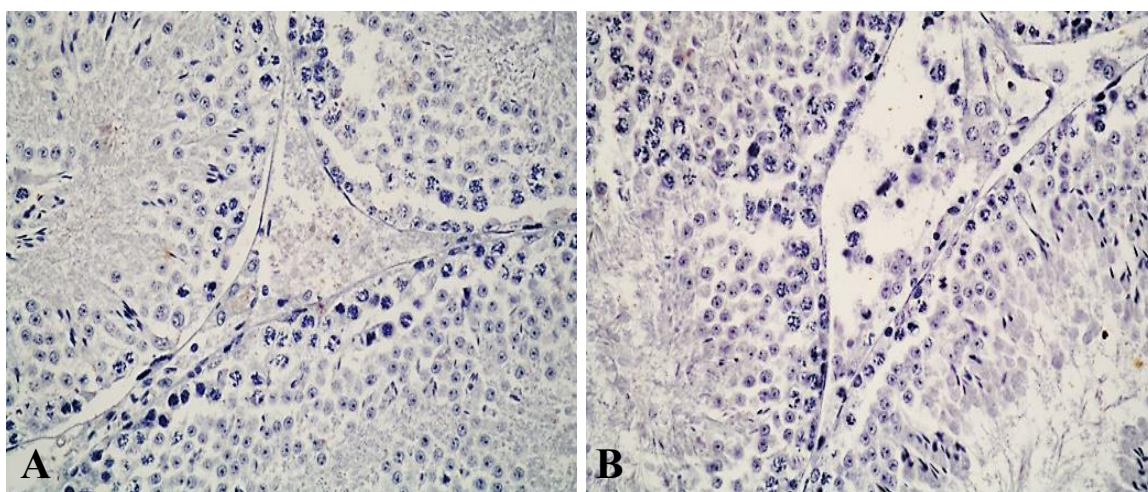
Локализация на Bcl-2 в контролната група наблюдавахме в цитоплазмата на половите клетки. Удължените сперматиди са отрицателни. Силно положителна реакция регистрирахме в цитоплазмата на Лайдиговите клетки (Фиг.20-А). След приложението на стрес, беше наблюдавана силна цитоплазматна и ядрена реакция в соматичните и герминативните клетки, с изключение на ядрата на удължените сперматиди (Фиг.20-В).



Фиг. 20. Локализация на анти-апоптотичен протеин Bcl-2 в тестиси от полово зрели мишки, с (А) и без стрес (В). Означения: Sc – сперматоцити; rSd - кръгли сперматиди; eSd - елонгирани сперматиди; LC - Лайдигови клетки. Увеличение, 40x

### 6.3. Локализация на caspase-3 в тестиси на полово зрели мишки

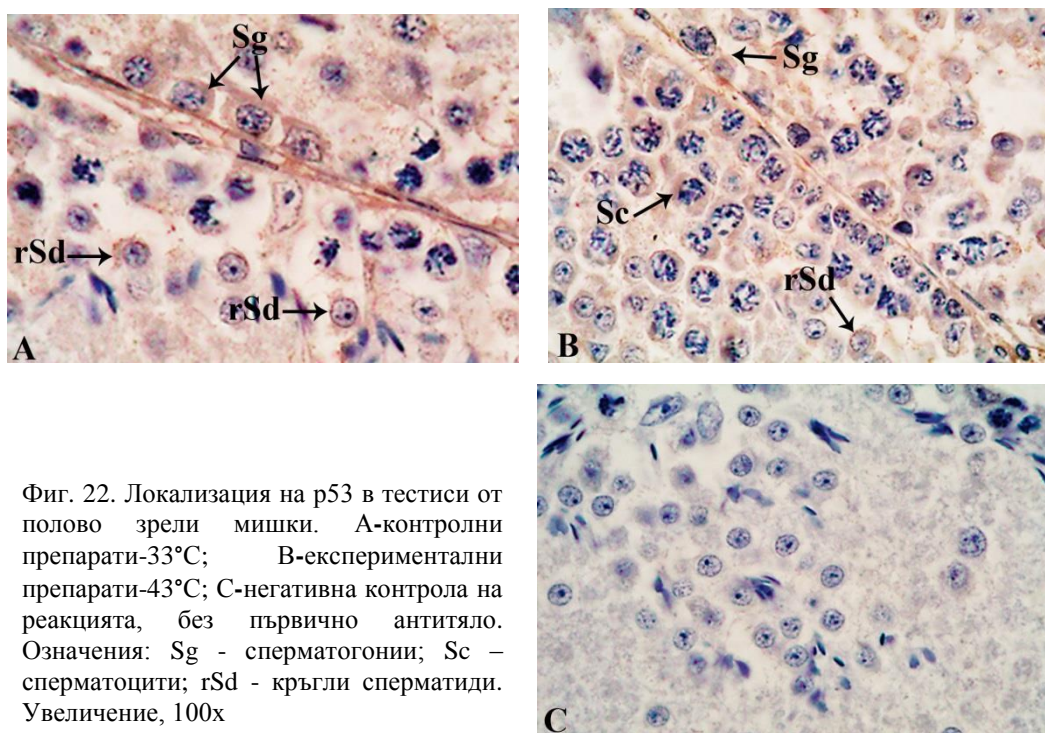
Експресия и локализация на ефекторната каспаза-3 (p11) не беше регистрирана както в контролната (Фиг.21-А), така и в експерименталната тестикуларна тъкан (Фиг.21-В).



Фиг 21. Локализация на caspase-3 (p11) в тестиси от полово зрели мишки. А-контролна тъкан, 33°C; В-експериментална тъкан, 43°C. Увеличение, 40x

#### 6.4. Локализация на p53 в тестиси на полово зрели мишки

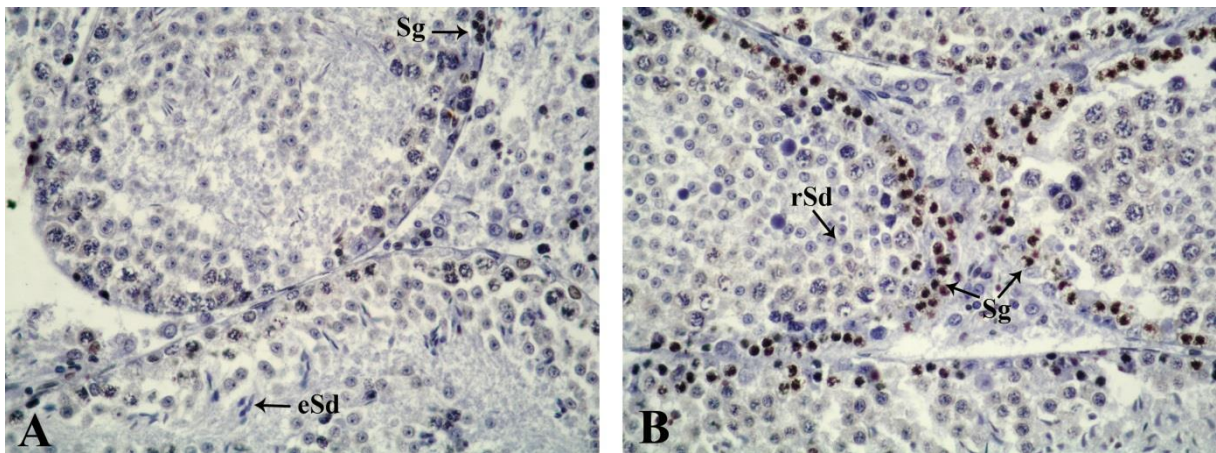
В тестикуларната тъкан от контролната група наблюдавахме маркиране за p53 в цитоплазмата на някои сперматогонии, докато ядрата бяха негативни. Локализация на p53 беше отчетена в цитоплазмата и по ядрената мембрана на кръглите сперматиди (Фиг.22-А). Стресът индуцира експресия в цитоплазмата на почти всички полови клетки, включително сперматогонии, сперматоцити и кръгли сперматиди (Фиг.22-В).



Фиг. 22. Локализация на p53 в тестиси от полово зрели мишки. А-контролни препарати-33°C; В-експериментални препарати-43°C; С-негативна контрола на реакцията, без първично антитяло. Означения: Sg - сперматогонии; Sc – сперматоцити; rSd - кръгли сперматиди. Увеличение, 100x

### 6.5. Локализация на F7-26 в тестиси на полово зрели мишки

Резултатите показаха маркирани ядра на някои сперматогонии от контролната група тестиси, което свидетелства за наличие на апоптотичен процес (Фиг.23-А). След топлинния шок отчетохме апоптотични ядра на сперматогонии, на сперматоцити в късен зиготен и в пахитен. Сперматидите не бяха маркирани (Фиг.23-В).



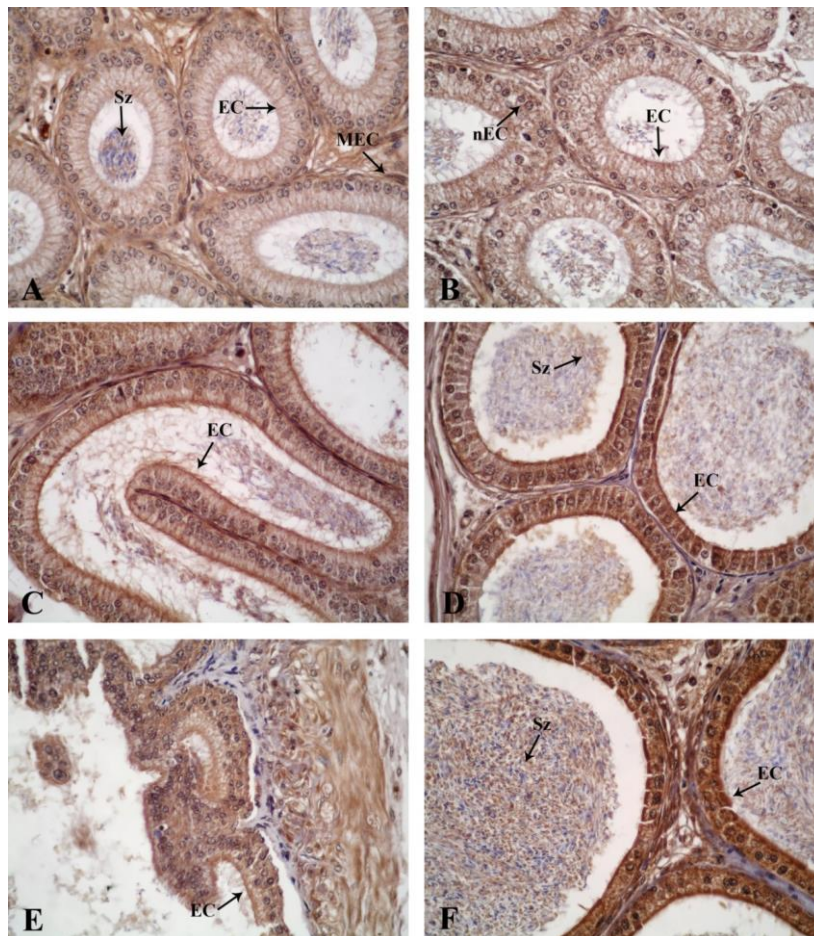
Фиг 23. Експресия на F7-26, антияло разпознаващо едноверижни разкъсвания в молекулата на ДНК (anti-ssDNA), обозначаващи апоптотичен процес, в тестиси на полово зрели мишки. Означения: Sg - сперматогонии; rSd - кръгли сперматиди; eSd – елонгирани сперматиди. Увеличение, 40x

Морфологичният израз на апоптозата е именно фрагментацията на ядрения хроматин, ето защо за маркиране на апоптотични ядра в тестиси и епидидимиси сме приложили моноклонално антияло (F7-26), насочено срещу едноверижни участци в молекулата на ДНК, в резултат на увреждания и идентифициращо клетки в апоптоза

Gorczyca и колектив, 1993, наблюдават разриви в двойноверижната ДНК в абнормни човешки сперматозоиди и изказват предположение, че те се дължат на активирани ендонуклеази, при наличие на апоптотичен процес, както в соматичните клетки, като по този начин се елиминират дефектните полови клетки. Бихме могли да предположим, че силното маркиране на апоптотични ядра в тестисите и тялото на епидидимиса, съпроводено с липсата на експресия на активна каспаза-3, в нашите експерименти, е свързано с осъществяване на каспаза-независима апоптоза, както и, че еднократното топлинно третиране за 1 час на 43°C (in vitro), не провокира достигане на езекуторната фаза в биохимичния цикъл на апоптозата. Възможно е, каспаза-независимият механизъм да се осъществява чрез отделяне на AIF от митохондриите, който навлиза директно в ядрото и причинява кондензация на хроматина и фрагментация на ДНК, още повече, че нашите резултати показват силно увреждане на тези субклетъчни органели на ултраструктурно ниво.

### 6.6. Локализация на Вах в епидидимис на полово зрели мишки

В контролната група мишки, положителната реакция за Вах беше локализирана в цитоплазмата на епителните клетки на главата, тялото и опашката на епидидимисите (Фиг. 24-А,С и Е). Отрицателна бе в сперматозоидите в лумена на канала, както и в ядрата на епителните клетки. След топлинен стрес, реакцията беше по-силна (Фиг. 24-В, D и F). Най-силно маркиране наблюдавахме в тялото и особено в опашката на епидидимиса след стрес (Фиг.24-F).

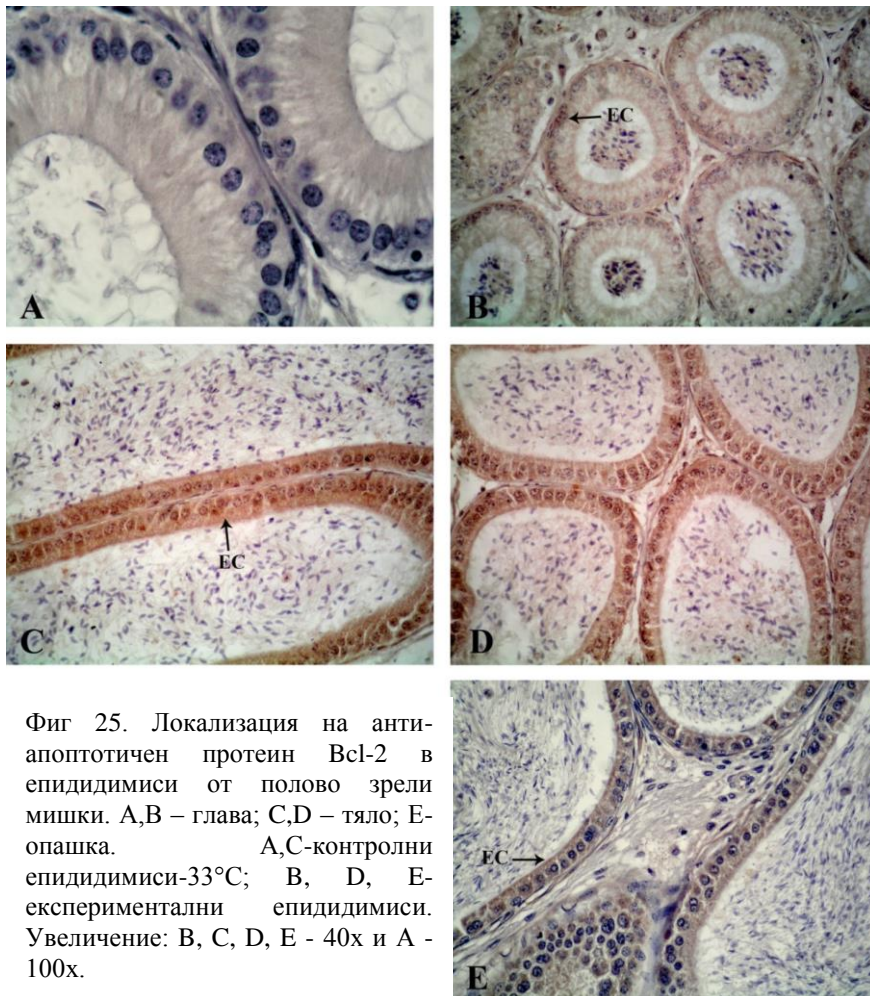


Фиг 24. Локализация на про-апоптотичен протеин Вах в епидидимиси от полово зрели мишки. Означения: ЕС - епителни клетки; nEC - ядра на епителни клетки; MEC - миоепителни клетки; Sz – сперматозоиди. Увеличение, 40x

### 6.7. Локализация на Bcl-2 в епидидимиси на полово зрели мишки

Анти-апоптотичният протеин Bcl-2 беше локализиран в цитоплазмата на епителните клетки от тялото (Фиг.25-С) и опашката (данните не са представени) на епидидимиса. В цитоплазмата на клетките, изграждащи главата, не установихме реакция в не третираниите тъкани (Фиг.25-А). След стрес, реакцията беше с предимно цитоплазматна локализация в епитела, докато сперматозоидите бяха отрицателни. Анти-

апоптотичният протеин Bcl-2 беше с най-силен интензитет в тялото на надсеменника, без оглед на третирането (Фиг.25-С и Фиг.25-D).

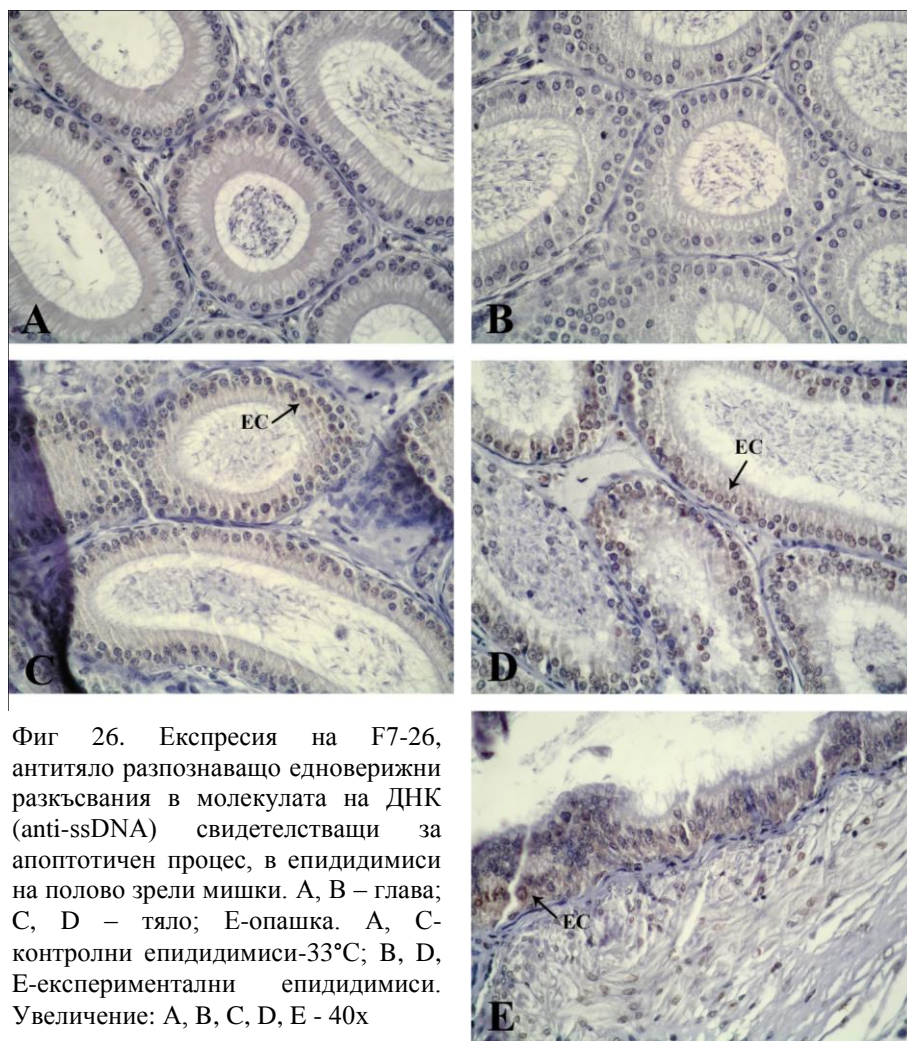


Фиг 25. Локализация на анти-апоптотичен протеин Bcl-2 в епидидимиси от полово зрели мишки. А,В – глава; С,Д – тяло; Е – опашка. А,С-контролни епидидимиси-33°C; В, Д, Е-експериментални епидидимиси. Увеличение: В, С, D, Е - 40x и А - 100x.

#### 6.8. Локализация на F7-26 в епидидимис на полово зрели мишки

В тялото на епидидимиса бе установена отчетлива реакция на антитялото F7-26, насочено срещу апоптотични ядра, особено след прилагане на стреса (Фиг.26-D). Под влияние на хипертермията, в опашката на епидидимиса също регистрирахме апоптоза (Фиг.26-E). Маркирани са ядрата на епителните клетки. В главата на епидидимиса не отчетохме апоптотични ядра в изследваните групи препарати (Фиг.26-A и Фиг.26-B).

Най-силно маркиране на апоптотични ядра наблюдавахме в тялото на епидидимиса, както и в опашката, като тези резултати корелират с установената интензивна експресия на про-апоптотичния фактор Вах в същите сегменти.



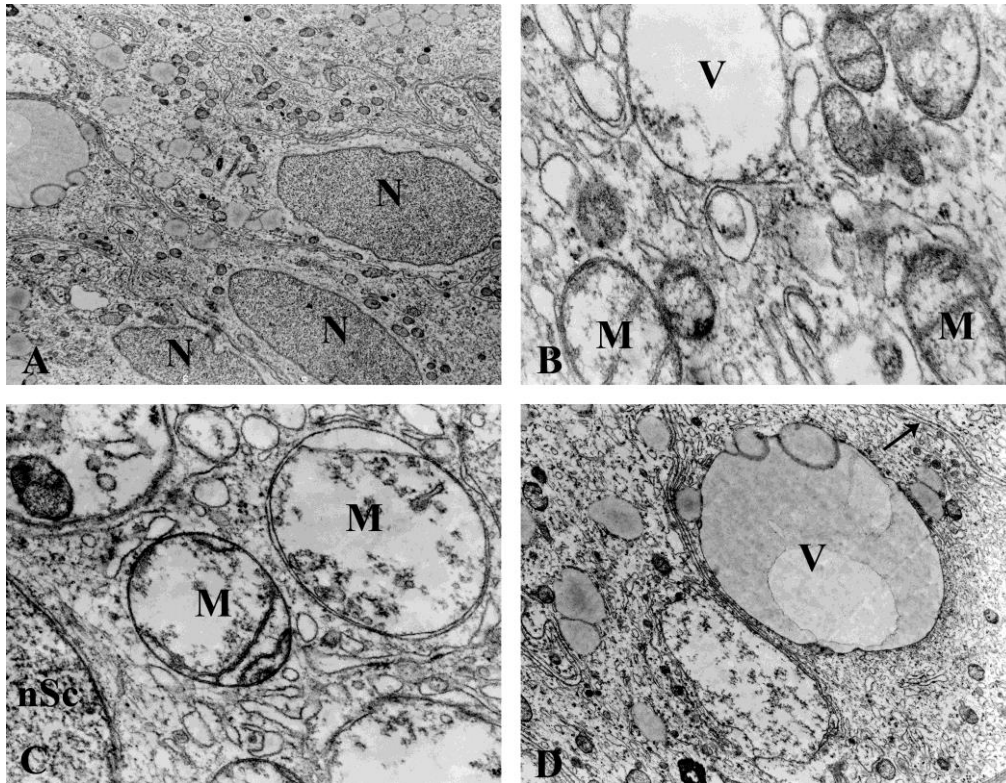
Фиг 26. Експресия на F7-26, антитяло разпознаващо едноверижни разкъсвания в молекулата на ДНК (anti-ssDNA) свидетелстващи за апоптотичен процес, в епидидимиси на полово зрели мишки. А, В – глава; С, D – тяло; Е-опашка. А, С- контролни епидидимиси-33°C; В, D, Е-експериментални епидидимиси. Увеличение: А, В, С, D, Е - 40х

## 7. Локализация на апоптотични маркери в тестиси на инфертилни пациенти с крипторхизъм (естествен модел на апоптоза)

### 7.1. Електронно-микроскопски анализ на тестиси от пациенти с крипторхизъм

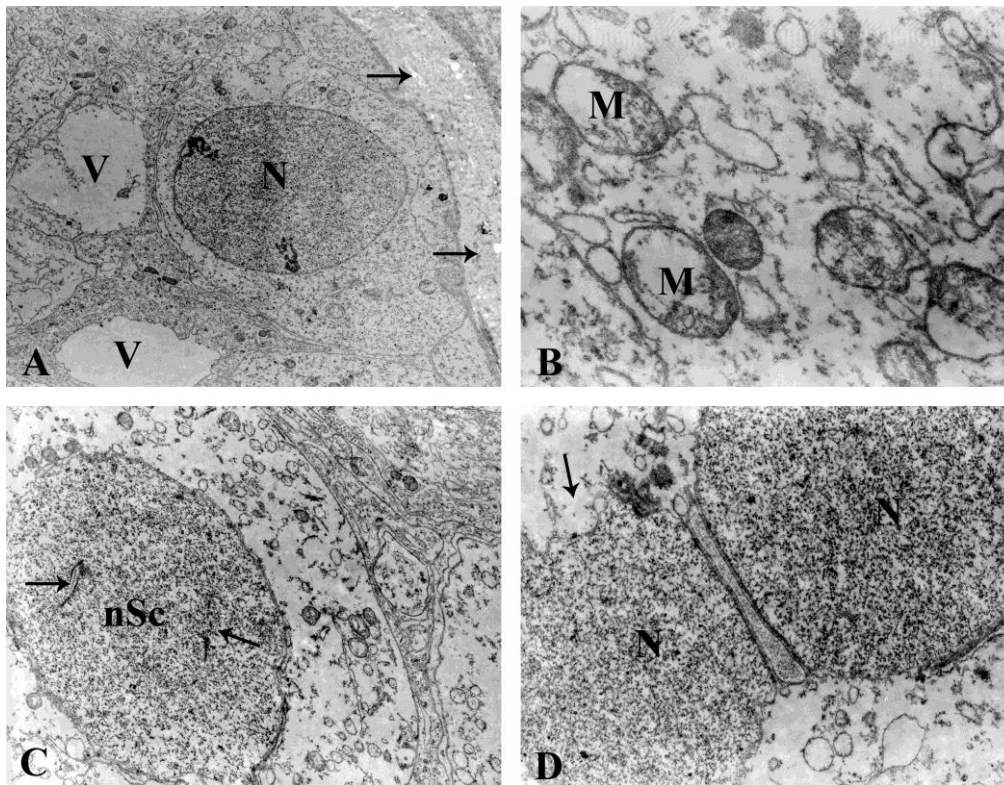
Ултраструктурните изследвания на крипторхичен тестис от пациент със Сертолиев синдром показаха семиниферни каналчета, съдържащи Сертолиевы клетки от незрял тип (Фиг.27-А) и значителни нарушения, дължащи се на необичайното разположение на тестиса извън скротума. Най-значимите морфологични изменения засягаха цитоплазмата и митохондриите на клетките. В цитоплазмата наблюдавахме големи вакуоли (Фиг.27-В и Фиг.27-Д) и множество увредени митохондрии с разриви на кристите и разширения между външната и вътрешната им мембрани (Фиг.27-С). В семиниферните каналчета бяха регистрирани дегенеративни клетки, вероятно полови, разположени върху удебелена базална мембрана (Фиг.27- D).





Фиг 27. Електронна микроскопия на крипторхичен тестис от пациент #1(Б.В.З.) Пациентът има т.нар. Синдром на Сертолиевите клетки (Sertoli-cell-syndrome). **А** - семиниферно каналче със Сертолиеви клетки от незрял тип, N-ядро на СК 3000x; **В** - семиниферен канал с останки от дегенеративна цитоплазма (вероятно на полова клетка) с увредени М-митохондрии и V-вакуоли, 20000x; **С**- семиниферен канал с nSc-ядро на първичен сперматоцит. Разриви на митохондриалните кристи и разширявания между вътрешната и външната митохондриални мембрани, 20000x; **Д**-дегенеративни клетки с неизвестен произход върху → удебелена базална мембрана, 7000x.

В семенните каналчета на крипторхичен тестис от втория пациент, сперматогенезата е в по-напреднал стадий. Електронната микроскопия, обаче, показва изменения в епитела, изразяващи се в силна вакуолизация в цитоплазмата на сперматоцитите и удебеления на базалната мембрана (Фиг.28-А). В митохондриите бяха добре видими големи вакуоли и разкъсани кристи (Фиг.28-В). Независимо от нарушенията в цитоплазмата им, ядрата на някои първични сперматоцити бяха добре запазени, а в тях личаха оформени синаптонемални комплекси (Фиг.28-С). За разлика от тях, отделни сперматиди бяха с липсваща ядрена мембрана и с непълно разделяне на ядрения материал между тях (Фиг.28-Д).



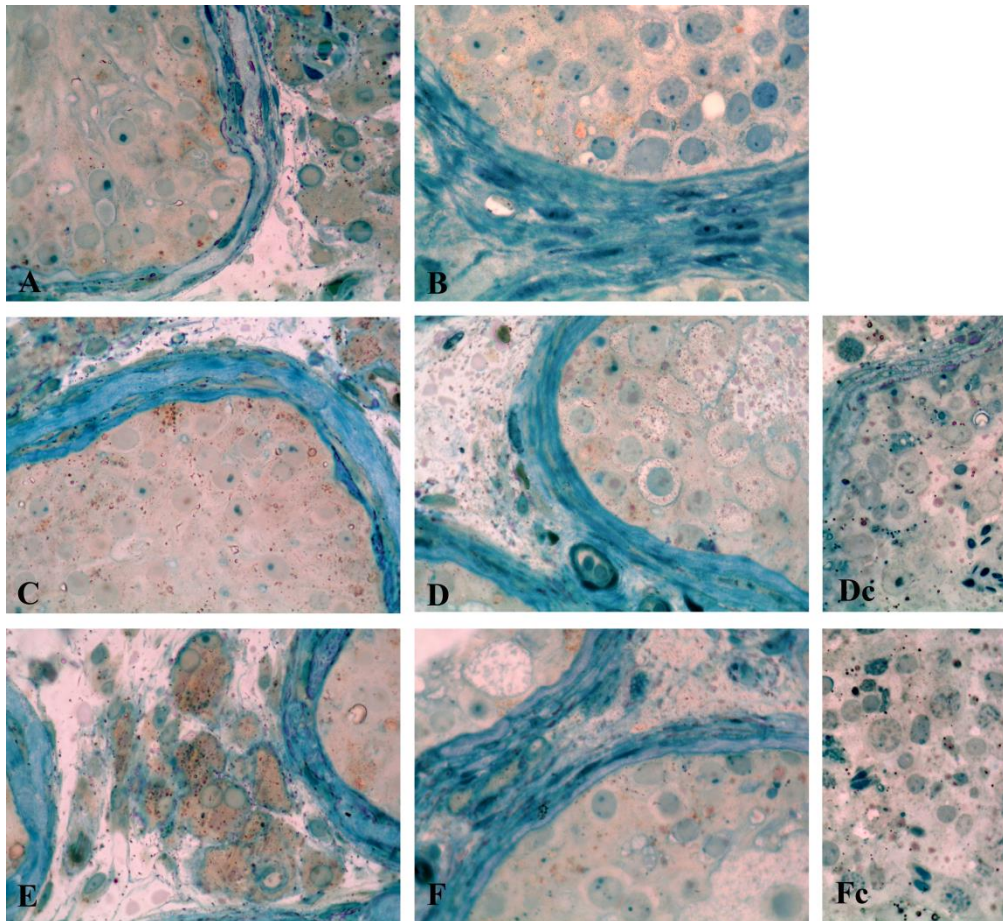
Фиг 28. Електронна микроскопия на крипторхичен тестис от пациент #2(М.Н.П.) **А**-семиноферен епител с удебелена базална мембрана, 3000x; **В**-вакуолизирана цитоплазма на пахитенен сперматоцит с експанзия на митохондриални мембрани и разкъсани кристи, 20000x; **С**-пахитенен сперматоцит с оскъдна цитоплазма и добре запазено ядро, в което личат оформени синаптонемални комплекси, 7000x; **Д**-липсваща ядрена мембрана и непълно разделяне на ядрения материал между два сперматида (стрелката), 12000x. Означения: N-ядро; М-митохондрии; V-вакуоли; → удебелена базална мембрана (А); nSc-ядро на първичен сперматоцит; → синаптонемални комплекси (С).

## 7.2. Имунocyтохимичната локализация на HSP70, Bcl-2 и p53 в полутънки срези от тестиси на пациенти с крипторхизъм

В семенните каналчета на тестисите от първия пациент не бе установено наличие на полови клетки, а само присъствие на Сертолиевы клетки (Сертолиев синдром). Локализация на HSP70 отчетохме в цитоплазмата на Лайдиговите клетки, докато семиноферният епител не показва маркиране (Фиг.29-А). По отношение на Bcl-2, беше наблюдавана силна цитоплазматична реакция в Сертолиевите, Лайдиговите и перитубуларните клетки (Фиг.29-С). p53 показва преобладаваща локализация в цитоплазмата на Лайдиговите клетки, докато експресията му в цитоплазмата на Сертолиевите беше по-слабо изразена (Фиг.29-Е). Ядрата на изследваните клетъчни популации, за всички изследвани биомаркери, бяха негативни.

В по-голямата част от семенните каналчета, сперматогенезата при втория пациент беше достигнала пахитенния стадий на първа мейотична профaza и само в някои - спермиацията. Отчетохме локализация на HSP70 предимно в цитоплазмата на половите клетки (Фиг.29-В). В сравнение с HSP70, позитивната реакция на антитялото срещу

Bcl-2 беше по-интензивна, със същата локализация (Фиг.29-D), докато p53 показва по-слаба експресия в половите и Сертолиевите клетки, и по-силна в цитоплазмата на Лайдиговите клетки (Фиг.29-F). Ядрата на всички клетъчни типове бяха негативни по отношение на изследваните протеини. Негативните контроли на имуноцитохимичните реакции за Bcl-2 (Фиг.29-Dc) и p53 (Фиг.29-Fc) са отрицателни.



Фиг 29. Имуноцитохимия на полутънки срези на човешки тестиси.  
**(пациент #1 Б.В.З.)** А - експресия на HSP70; С - експресия на Bcl-2; Е - експресия на p53. Контраоцветяване на срезите с толуидиново синьо. Увеличение, 100х.  
**(пациент #2 М.Н.П.)** В - експресия на HSP70; D - експресия на Bcl-2; F - експресия на p53; Dc и Fc - негативни контроли на реакциите за Bcl-2 и p53, без първично анти тяло. Контраоцветяване на срезите с толуидиново синьо. Увеличение, 100х.

В заключение нашите резултати потвърждават, че след дълго протичащо въздействие на висока температура в човешки крипторхични тестиси, експресията на HSP70 в половите клетки е потисната. Силната експресия на анти-апоптоичния протеин Bcl-2 е знак за активиране на механизмите за клетъчно оцеляване, които, обаче, не са достатъчни да преодолеят възникналите последствия от топлинния стрес.

## ИЗВОДИ

1. Термо-индуцираният стрес предизвиква ранни ултраструктурни промени в основните клетъчни типове на тестиса (пахитенни сперматоцити и Сертолиевы клетки). Най-значимите изменения, свързани с нарушения на базалната мембрана и митохондриите, се приемат за ранен морфологичен белег на активирана клетъчна смърт.

2. Повишената експресия на конститутивната и индуцируемата изоформи на HSP70 (HSP73/HSP72), в условия на термо-индуцирана апоптоза, подчертава мобилизирането им в протекция на клетките от високата температура.

3. Присъствието на индуцируемата изоформа на HSP70, в топлинно третирани миши тестиси и епидидимиси, потвърждава основната роля на протеина при инхибиране на апоптозата и е предпоставка за наличие на механизъм, независим от шапероновата активност.

4. Експресията на  $\alpha$ B-crystallin в по-късните етапи на сперматогенеза е указание за неговата шаперон-подобна активност свързана с матurationта на сперматидите, с организацията на цитоскелетните елементи и с поддържането на еластичните структури на сперматозоидния флагелум. По-интензивната експресия след хипертермия е предпоставка за участието му в клетъчния отговор спрямо топлинния стрес.

5. Фосфорилираният  $\alpha$ B-Crystallin (Ser-59), локализиран основно в опашките на сперматозоидите, предполага по-скоро структурна, отколкото шаперонова функция, свързана с клетъчната подвижност и миграция.

6. Повишените нива на *hsp70* и *bax* транскрипти, в третирани пубертални миши тестиси, свидетелстват за отключване на репаративен механизъм в отговор на подаден сигнал за апоптоза.

7. Отсъствието на динамика в генната експресия на *bax*, *bcl-2* и *p53*, в полово зрели миши тестиси, без оглед на третирането, предполага включване по-скоро на пост-транслационни, отколкото на транскрипционни механизми, медиращи тяхната активност.

8. Повишената температура индуцира по-високи нива на всички изследвани маркери в епидидимиса, което определя този репродуктивен орган като силно чувствителен на топлинен стрес.

9. Установената слаба протеинова експресия на caspase-3 и по-високата на p-53, F7-26 и Вах в тестиси на полово зрели мишки предполагат участието на каспаза-независими механизми за осъществяване на апоптоза в условия на топлинен стрес.

10. Секвестрираната експресия на Bcl-2 и F7-26 в епидидимиса подчертава регион-специфичния модел на протичане на апоптозата.

11. Устойчивостта на мишите полови клетки към апоптоза е обратно пропорционална на степента им на диференциация.

12. Силната експресия на анти-апоптотичния Bcl-2 в крипторхичен тестис и по-слабата на HSP70, не е достатъчна сама по себе си да възстанови настъпилите смущения в сперматогенезата.

### **ПРИНОСИ**

1. Доказана е регион-специфична и клетъчно-специфична конститутивна експресия на  $\alpha$ B-crystallin в репродуктивни органи на мишка.

2. Модифициран е метод за имунохистохимична локализация на HSP70, Bcl-2 и p53 върху полу-тънки срези, който е комбинация между процедура за включване на материал за електронна микроскопия и светлинно-микроскопско изследване.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Списък с публикации, свързани с дисертационния труд

1. Martinova Y., Silvina Z. Zapryanova, Pavel I. Rashev, Margarita V. Mollova. Expression and localization of small heat shock proteins in mouse testicular tissue. J. Biomed. Clin. Res. Suppl., vol 2, No1, 27-31, 2009
2. Silvina Zapryanova, Pavel Rashev, Diana Zasheva, Yordanka Martinova, Margarita Mollova. Electrophoretic and immunocytochemical analysis of HSP72 and HSP73 expression in heat stressed mouse testis and epididymis. Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol., 168 (2013) 54–59, 2013

### Списък с участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. S. Zapryanova, P. Rashev, K. Todorova-Hayrabedyan, Y. Martinova, M. Mollova. Expression and localization of alphaB-crystallin in normal and heat-treated mouse testes. IVth National Congress of Immunology, 2-5 October 2014, Golden Sands, Varna, Bulgaria, P33
2. S Zapryanova, P Rashev, T Dimova, Y Martinova, M Mollova. The impact of high scrotal temperature on Hsp70, Bcl-2, Bax and Pro-caspase-3 genes expression in the reproductive organs of sexually mature mice. AJRI. Special Issue: Abstracts of the 14th International Symposium for Immunology of Reproduction “Progress in Reproductive Immunology”, 22–24 May 2015, Varna, Bulgaria, PII-31.
3. Silvina Zapryanova Zapryanova, Tanya Georgieva Dimova, Pavel Istiliyanov Rashev. Temperature-dependent expression and localization of heat shock proteins and apoptotic markers in mouse epididymis. Jubilee Scientific conference “10 years Bulgarian Association of Clinical Immunology”, October 28-29, Sofia, Bulgaria, 2016

### Участие в Имнологично училище организирано от EFIS

1. S. Zapryanova, P. Rashev, T. Dimova, Y. Martinova, M. Mollova. Expression of Hsp70 and apoptotic-related genes in heat-stressed mouse testis and epididymis. 8th EFIS-EJI South East European Immunology School (SEEIS2016), p.29, October 14-17, Durres, Albania, 2016