



## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Нина Атанасова, дбн, ИЕМПАМ-БАН

относно: дисертационен труд на Силвина Запрянова Запрянова от ИБИР-БАН на тема „**РОЛЯ НА ПРОТЕИНИТЕ ОТ ТОПЛИНИЯ СТРЕС В ПРОЦЕСИТЕ НА СПЕРМАТОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА**“

за получаване на образователна и научна степен „**Доктор**“ по научна специалност „Имунология“ (01.06.23)

Дисертационният труд на Силвина Запрянова се отличава с висока актуалност и полезност, т.к. е посветен на проблеми от фундаментално и приложно значение за репродуктивната биология и медицина. Топлинният стрес е един от основните рискови фактори за инфертилитет при мъжа и съпровожда една от често срещаните конгенитални репродуктивни аномалии „крипторхизъм“. Последният е включен в т.нар. Тестикуларен дисгенезисен синдром, заедно с хипоспадия, ниска спермопродукция и тестикуларен карцином. Синдромът е основен биомаркер на въздействие на ендокринно-активни агенти от околната среда и неговите случаи се увеличават, особено в индустриалните страни. Всяка от четирите репродуктивни аномалии е рисков фактор за останалите три, което подчертава значимостта на изследванията на дисертантката върху механизмите на топлинно-индуцирания стрес върху мъжките репродуктивни органи.

Дисертационният труд е написан на общо 170 страници и е структуриран в обичайните раздели: Въведение – 1 стр.; Литературен обзор - 49 стр.; Цел и задачи – 1 стр.; Материали и методи – 25 стр.; Собствени резултати – 35 стр.; Дискусия – 29 стр.; Изводи и приноси – 2 стр.; Литература – 17 стр., включваща 297 литературни източника, всички на английски език.

Литературният обзор е целенасочено развит с оглед темата на труда. Той е организиран в 8 глави. Предоставена е изчерпателна информация относно процеса на сперматогенеза и неговата хормонална регулация, структура и функция на епидидимиса, терморегулация, топлинен стрес и рискови фактори, протеини и транскрипционни фактори на топлинния стрес, апоптоза и основни пътища на програмираната клетъчна смърт. Прави впечатление, че обзорът е по-дълъг от резултатите или дискусията. Намирам, че информацията в първите 3 глави (клетъчни типове на тестиса и епидидимиса) би могла да бъде съкратена. Що се отнася до топлинния стрес и предизвиканата от него апоптоза, авторката показва завидна компетентност и задълбоченост, особено по отношение на сложните каскадни механизми и включените в тях многобройни молекули. Впечатлена съм от високата осведоменост и съвременно виждане на дисертантката по изследвания проблем,

базиран на познаване на последните публикации на водещи учени/екипи в световен мащаб. Това се доказва с големия брой на използваните литературни източника (297). Близко една трета от тях са от последните 10 години, а тези от последните 5 години са повече от 10%, което недвусмислено показва актуалността на разработвания проблем.

В края на прегледа е изведено кратко заключение, от което следват целта и задачите на дисертационния труд. При формулирането на целта дисертантката е очертала два обекта на научния интерес – недостатъчно проучените високо молекулни топлинно-стресови протеини (HSP-70) и непроучените нискомолекулни протеини ( $\alpha$ B-кристалин). Така формулирана цел предполага обемни и задълбочени изследвания, от които ще се получат оригинални находки. Поставените 7 задачи убеждават за пълното изпълнение на целта.

Разделът „Материали и методи“ представя старателно и подробно описание на използваните техники, в т.ч. рецепти за фиксатори, оцветители, буфери и др. За антителата и китовите са посочени фирмите производители с каталожните номера, разреждания и т.н. Всичко това дава възможност методите да бъдат възпроизведени от други автори.

Научните изследвания на Силвина Запрянова са проведени с прилагане на адекватен експериментален подход с ин виво и ин витро експериментални процедури за предизвикване на топлинен стрес (43°C) върху репродуктивните органи (тестис и епидидимис) от препубертетни (6 дневни), пубертетни (18 дневни) и полово зрели (60 дневни) мишки. Ин витро експериментите са мотивирани с факта, че 6- и 18-дневните тестисите при мишка са все още разположени в коремната кухина. Авторката е имала възможност да проведе изследвания върху тестикуларна тъкан от пациенти с нормална сперматогенеза и крипторхизъм.

Подробното описание на рутинната хистология и електронната микроскопия би могло да се избегне. Прави впечатление, че дисертантката е приложила богата гама от имунохистохимични техники като: индиректен пероксидазен метод на парафинови и полутънки срези, АВС-метод, стрептавидин-пероксидазен метод, индиректна имунофлуоресценция на парафинови срези и натривка от сперматозоиди. Спрегнато с имунохистохимията са използвани имунохимични методи – едномерна и двумерна SDS-PAGE електрофореза и имуноблот. Определянето на генната експресия е направено със съвременни молекулярно-биологични методи – real time PCR и синтез на необходимите праймери. Съченанието на трите основни подхода имунохистохимичен, имунохимичен и молекулярно-биологичен гарантира получаване на надеждни резултати за мястото и количеството на експресия на изследваните гени и кодираните от тях протеини.

Раздел „Резултати“ е структуриран в седем раздела, представящи внушителен обем данни от хистологични и електронно-микроскопски наблюдения, последвани от тези за локализация на два топлинно-стресови протеина (HSP-70 и  $\alpha$ B-кристалин) в тестиси и епидидимиса от полово зрели и незрели мишки. Разграничаване на експресията на конститутивната и индуцируемата изоформа на HSP-70 - HSP-72 и HSP-73, е направено чрез електрофоретично изследване и имуноблот. Топлинно-индуцирана програмирана клетъчна смърт е изследвана посредством експресията на 4 основни маркерни протеина от апоптотичната митохондриална каскада – p53 и неговите таргети про- и анти- апоптотичти фактори (Bcl-2 и Bax), инициаторната про-каспаза-3. Апоптотичните ядра са визуализирани с антитялото F7-26, което познава едноверижна ДНК. Данните от протеиновата експресия придобиват логична завършеност след сравнението им с тези от молекулярно биологичното определяне на нивото на съответните РНК транскрипти.

Тук искам да изтъкна прецизността от работата на авторката в провеждане целия набор от изследвания и съответните методики, без да липса и най-малката подробност. Получени са голям обем от данни, представени систематично и прегледно, което допълнително улеснява читателя. Накратко, резултатите на Силвина Запрянова и техният приносен характер могат да се обобщят, както следва:

1. Експресията на двете изоформи на HSP-70 протеина – конститутивна и индуцируема в тестис и епидидимис протича по стадийно- и регионално- специфични модели. В хода на постнаталното развитие локализацията на HSP-70 се появява в по-диференцираните полови клетки за дадения етап – преди пубертета - в сперматогониите, през пубертета – и в пахитенните сперматоцити, а в полова зрялост и в кръглите сперматиди. По-силната експресия на HSP-70 протеина в ядрата на пахитенните сперматоцитите и кръглите сперматиди в резултат на топлинно-индуциран стрес потвърждава ко-експресията на конститутивната и индуцируемата форма на HSP-70, доказана и с данните от имуноблота за присъствие на HSP-73 (конститутивен) и HSP-72 (индуцируем).

В епидидимиса HSP-70 протеина се експресира предимно в цитоплазмата на основните клетки от тялото на органа, докато след въздействие с повишена температура експресията се засилва особено видимо в опашката. Този модел предполага протективната ролята на HSP-70 към съхранението на сперматозоидите в опашката при топлинен стрес, докато в нормални условия протеинът има отношение към матурацията на гаметите.

2. Проведено е подробно изследване на локализацията на нискомолекулярния протеин на топлинния стрес  $\alpha$ B-кристалин, с имунохистохимичен и имунофлуоресцентен метод, от което са получени оригинални данни за стадийно- и регионално- специфична експресия в тестис и епидидимис в норма и по-изразено след топлинен стрес. Алфа B-кристалинът се появява през пубертета в пахитенните сперматоцити, а в полова зрялост се локализира предимно в постмейотичните полови клетки – кръгли и удължени сперматиди. Ядрената локализация на  $\alpha$ B-кристалина в норма предполага съществуването на две изоформи – конститутивна и индуцируема. Експресията на протеина в късните етапи на сперматогенезата е проява на неговата шапероно-подобна роля, свързана с матурацията на сперматидите, с организацията на цитоскелетните елементи и с подържане на еластичните структури на опашката на сперматозоида. В норма епидидимисът е слабо позитивен, докато след топлинен стрес експресията в цитоплазмата на основните клетки нараства от проксималния към дисталния регион.
3. Фосфорилираният  $\alpha$ B-кристалин не се открива в половите клетки, а се локализира предимно в опашките на сперматозоидите. След топлинен стрес експресията на протеина е по-слаба в епидидимния епител, докато интензитетът в опашките на гаметите остава силно изразен. Оригиначните находки на дисертантката предполагат по-скоро структурна, околкото шаперонова функция на фосфорилираният  $\alpha$ B-кристалин, свързана с мотилитета на гаметите и тяхната миграция. В този аспект данните на авторката са от полза за разработване на нови терапевтични подходи за лечение на мъжкия инфертилитет, свързан с нарушения в цитоскелетната функция на гаметите.
4. Протеинова експресия на апоптотичните маркери p53, Bcl-2 и Bax, показва локализация в полови и соматични клетки на тестиса и регионална специфичност в епидидимиса, като тя се засилва след топлинно-индуциран стрес. В резултат на последния в пубертетния тестис се отключва усилена генна експресия на hsp-70 bax, израз на репаративен механизъм в отговор на апоптотичен сигнал. За разлика от тестиса, епидидимисът в полова зрялост показва неколкостратно по-високи нива на РНК транскрипти на bax, bcl-2, про-каспаза 3, което го определя като силно чувствителен на топлинен стрес.
5. Имунохистохимичните изследвания върху крипторхидни тестиси от пациенти са проведени с прилагане на модифициран от дисертантката метод за локализация на HSP-70, Bcl-2 и p53 върху полутънки срези от материал, включен за електронна микроскопия. Силната експресия на про-апоптотичния фактор Bcl-2 в отсъствие на

шаперонова активност на HSP-70, не е достатъчна сама по себе си да възстанови смущенията в сперматогенезата вследствие продължителното излагане на тестиса към повишена температура.

В дисертационният труд са приложени общо 52 фигури и 7 таблици. Резултатите са онагледени с 116 микроснимки, монтирани на 23 панела, 27 електронограми в 7 панела, 4 фотографии на 9 гел-електрофорези и 4 графики. Снимковият материал е достатъчно илюстративен и с много добро качество. В повечето случаи при имунохистохимичните реакции дисертантката е представила негативни контроли, а в случая за  $\alpha$ B-кристалина е представена и положителна контрола върху очна леща.

Дискусията е обширна, като постоянно се съпоставят собствените данни с тези от литературата, което показва високата ерудиция на Силвина Запрянова. Накрая авторката формулира 12 извода, които демонстрират успешното изпълнение на задачите на дисертационния труд. Изводите биха могли да се обединят, като например 2-ри и 3-ти; 6-ти и 7-ми; 8-ми и 10-ти; 9-ти и 11, и по-този начин броят им ще съответства на броя на задачите. Формулирани са 2 оригинални приноса, единият от които е методичен. Тук бих препоръчала да се формулира и отделен оригинален принос за фосфорилираната форма на  $\alpha$ B-кристалина.

Авторефератът е достатъчно информативен и представя в синтезиран вид есенцията на труда. От техническо естество препоръчвам съкращенията да се подредят по азбучен ред.

Във връзка с дисертацията са публикувани 2 статии на английски език в реферирани open access издания - едната публикация е в национално, а втората в чуждестранно списание. Представени се четири участия в научни форуми – две в национални и две в международни, едното от които е Имунологично училище, организирано от European Federation of Immunological Societies в чужбина.

Дисертантката е участник в два проекта, единият от които е с Европейско финансиране.


Образователната програма е изпълнена с 430 кредита, надвишаващи изискуемия минимум от 250 точки. Преминала е през 4 допълнителни курса, при задължителни два.

**Заклучение:** обемът и качеството на проведеното комплексно морфо-функционално и молекулярно-биологично изследване определят дисертационния труд на Силвина Запрянова, като завършена и прецизно осъществена научна разработка с ясно изразено фундаментално и приложно значение за репродуктивната медицина. Дисертационния труд се

отличава с комплексното си и подробно разглеждане на експресията на гените и кодираните от тях протеини на топлинния стрес в тандем с изследване на маркерите от митохондриалната апоптотична каскада. От установените взаимовръзки са изведени оригинални приноси за ролята на ниско молекулните стресови протеини. Впечатлена съм от изискания научен стил при написването и оформянето на дисертационния труд. Обемът и качеството на труда и успешното изпълнение на образователната и научна програма напълно покриват критериите на ЗРАС на РБ и съответните правилници за неговото приложение. С придобитите знания и умения Силвина Запрянова е изграден учен, способен за самостоятелна научно-изследователска работа. Във връзка с горе-изложеното, с висока убеденост давам положителна оценка на дисертационния труд на тема „РОЛЯ НА ПРОТЕИНИТЕ ОТ ТОПЛИННИЯ СТРЕС В ПРОЦЕСИТЕ НА СПЕРМАТОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА” и препоръчвам на членовете на почитаемото Научно жури да гласуват „ЗА” присъждане на образователната и научна степен „Доктор” на Силвина Запрянова.

05.06.2017 г.

Рецензент:

  
/проф. Нина Атанасова, дбн/