



РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Таня Георгиева Димова, ИБИР-БАН, София

член на научно жури съгласно заповед № 166/25.04.2017г.

на Директора на Институт по биология и имунология на размножаването, БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „ДОКТОР” по научна специалност „Имунология” – шифър 01.06.23, професионално направление 4.3.

Биологични науки

представен от свободен докторант **Силвина Запрянова Запрянова**, секция „Имунобиология на размножаването”, ИБИР, БАН

Тема на дисертационния труд: „Роля на протеините на топлинния стрес в процесите на сперматогенеза и апоптоза”

Научен ръководител: **доц. Павел Рашев**

Актуалност и значимост на тематиката

Обект на дисертационния труд е ролята на протеините на топлинния стрес като HSP70 и alphaB-crystallin и някои про- и анти-апоптотични фактори като Bax, Bcl-2, p53 и caspase-3 за клетъчната диференциация, матурация и апоптоза при сперматогенеза в условията на норма и температурен стрес, използвайки като експериментален модел мишка. Темата е безспорно актуална на фона на нарастващия процент мъжко безплодие и нарушения в сперматогенезата в резултат на неадекватна терморегулация, свързана с неподходящо облекло, заседнал и нездравословен начин на живот. Фактите сочат, че при една на пет инфертилни двойки проблемът е свързан с мъжа партньор като по-често се касае за намален брой на сперматозоидите и оттам влошено качество на спермата в резултат на нарушена терморегулация на тестикуларната функция. Макар че са открити още в 1962 г. протеините на топлинния стрес са все още недобре проучени особено в сферата на репродукцията. Те са едни от първите протеини в развиващия се ембрион и се характеризират със силна консервативност. Интересът към тях в последните години нараства и поради факта, че мембранно-свързаните им форми са таргетни молекули за стрес-индуциран, тумор-специфичен имуноен отговор.

Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е структуриран в обичайните раздели и е с обем 171 страници, съдържа 52 фигури, 8 таблици и литературна справка от 297 автора.

Литературният обзор показва детайлна информираност по проблема и е написан на 60 страници стегнато в частта, описваща сперматогенезата – процес, който е проучен доста добре и по-пространно в частта, описваща протеините на топлинния стрес и тяхната

роля за нормалното протичане на сперматогенезата и в условията на индуциран топлинен стрес. Литературният обзор е съставен от раздели, посветени на сперматогенезата и нейната хормонална регулация в тестиса и епидидимидиса, клетъчен състав и регулация на епидидималната функция, терморегулация на тестиса, причини и ефекти на тестикуларния топлинен стрес, техники за изучаване на ефекта на топлинния стрес върху тестисите в скротума, протеини на топлинния стрес като се акцентира на молекулната структура и функцията на високомолекулярния HSP70 и на нискомолекулярния α B-crystallin, молекулни механизми на heat shock отговора, апоптоза и протеини на топлинния стрес. Масираната апоптоза е нормално явление в репродуктивните органи на бозайниците. В хода на отделните стадии на сперматогенеза, около 75% от половите клетки загиват чрез спонтанна апоптоза като така се поддържа нормалното съотношение между герминативни и Сертолиевы клетки. И спонтанната, и индуцируемата апоптоза (вкл. в резултат на температурен шок) се осъществяват чрез едни и същи молекулярни механизми. Като правило, факторите, индуциращи апоптоза, отключват едновременно и защитен отговор в клетките. Авторката е анализирала задълбочено данните от литературата относно ключовите взаимодействия на HSPs с молекули от апоптичните пътища показвайки, че HSPs могат да блокират както екстрацелуларния, така и интрацелуларния път на апоптоза. И за да звучи още по-сложно, има данни, че HSPs регулират диференциално апоптозата – например HSP27 и HSP70 са анти-апоптични докато HSP60 и HSP10 са про-апоптични. В отделен раздел са описани подробно техниките, използвани от различните автори за изучаване на ефекта на топлинния стрес върху тестисите в скротума. Може би неволно са изпуснати като модел линии мишки, чийто тестиси са устойчиви на хипертермия и които са отличен ин vivo модел за проучване на механизмите на отговора при хипертермия – топлинно-сензитивни и топлинно-устойчиви линии мишки. Този раздел е много професионално написан, лек и увлекателен за четене и поради наличието на множество добре подбрани обяснителни схеми. Литературният обзор завършва с обобщение върху комплексния характер на сперматогенезата като продължителен и силно температурно-зависим процес, в който специален интерес представляват все още недобре проучените молекулярни механизми и елементи на контрол на термоиндуцирана апоптоза, както и шаперон – медиирани такива. Част от този пъзел са стресовите протеини и различни про- и анти-апоптични фактори. И тук логично е поставена целта на собственото научно изследване, а именно да се анализира участието на протеини на топлинния стрес и някои про- и анти-апоптични фактори (Bax, Bcl-2, p53 и pro-caspase-3) в механизмите на клетъчна диференциация, матuration и апоптоза в тестиси и епидидимиси от мишка. Като обект на изследване са подбрани по-слабо проученият в тестикуларна тъкан представител на фамилията високо-молекулярни стресови протеини HSP70 и непроученият в тестикуларна тъкан представител на фамилията ниско-молекулярни стресови протеини α -crystallines – α B-crystallin. Целта е формулирана ясно и стегнато. Поставени са седем задачи, адекватни на поставената цел.

Раздел Материали и Методи е описан на 24 страници. Подробно са описани групите животни – експериментални и опитни, използвани за ин vivo и ин vitro моделите

на топлинно третиране, както и пациентски крипторхични образци като естествен модел за термоиндуцирана апоптоза. Експерименталните групи мишки са подбрани възрастово така че да съответстват на етапите на полово зрелост – 6 дневни мишки, при които в тестиса протича активна пролиферация на полови /сперматогонии/ и Сертолиевы клетки и е налице първи пик на спонтанна апоптоза, 18 дневни мишки, при които половите клетки навлизат в първа мейотична профaza и в семиниферните тубули присъстват пахитенни сперматоцити и 60 дневни полово зрели мишки, при които сперматогенеза е напълно завършена и в семенните каналчета се откриват всички стадии на сперматогенния процес, а в епидидимидисите – матурирали сперматозоиди. По този начин всеобхватно са проследени промените в критичните фази на сперматогенезата – пролиферация, диференциация и матурация на герминативните клетки и като цяло промените в герминативно-соматичния комплекс. Трябва да подчертая, че в експерименталната постановка на настоящото проучване е избегната комплексността на експерименталния крипторхизъм като тестисите се подлагат на топлинен стрес чрез контролирано затопляне на скроталната торба /ин виво модел/ или чрез инкубиране на тъкани от семенници и надсеменници при висока температура за определено време /ин витро модел/. Предимство на експерименталната постановка, използвана тук е комбинирането на ин виво и ин витро модели за да се проследи директния и индиректния ефект на температурния стрес съответно като авторката умело се аргументира за релевантността на използваните два типа модели. Използвани са разнообразни и подходящи методи, описани подробно и разбираемо. Методите са хистологични, имунохисто- и имуноцитохимични, SDS електрофореза, 2D електрофореза, имунохимични, генноекспресионен и електронномикроскопски. Като цяло подходите на изследване и методите са подбрани прецизно, така че да осигурят изпълнението на заложените задачи. Докторантката се е съобразила с бележките ми от предварителната рецензия относно фигурите, които отразяват амплификационни криви, стандартна крива и криви на топене да бъдат дадени в раздел Материали и методи, защото отразяват оптимизиране на протокола за qPCR. Тъй като са използвани голям брой антитела и двойки праймери, докторантката правилно ги е подредила в таблици с използваните разреждания и фирма производител за антителата или секвенциите на двойките праймери, както и с компонентите на реакционната смес и температурните режими за PCR, рецепти за използваните буфери и пр. Продължавам да смятам, че раздела Реактиви, консумативи и буфери за изпълнение на предвидените експерименти е по-добре да бъде изнесен като приложение в края на раздела.

Раздел Резултати: Резултатите са групирани в отделни раздели като са описани изчерпателно на 34 страници и онагледени с 38 фигури. Фигурите са представителни с добро качество на снимковия материал, адекватно композирани и с необходимите означения и обяснения. Установих някои малки технически грешки или пропуски като например: на Фиг. 32 и 34 не е отбелязано кое багрило какво визуализира, на Фиг. 41 и Фиг. 42 са объркани означенията за контролна и експериментална група, а на Фиг. 45 те не са означени изобщо, на Фиг. 46 не са обозначени частите на епидидимиса. Тези пропуски ни най-малко не намаляват стойността на работата. Заглавията на отделните групи

резултати са дескриптивни, но това е избор на докторанта, който трябва да уважим, могло е да се избегне повторението на думичката „Резултати от ...“ в заглавията на разделите. Прави впечатление желанието на докторантката за дефинитивни резултати и потвърждаването им с няколко метода едновременно, както и използването на подходящи контроли. Например наличието на индуцируемата изоформа HSP72 в резултат на топлинен стрес е доказано имунохимично чрез едно- и двумерно електрофоретично разделяне и последващ имуноблот на екстракти от нетретирани и топлинно третирани тестиси и епидидимиси. Стадийно- и клетъчно-специфичната експресия и локализация на α Bcrystallin е потвърдена и с ензимен, и с флуоресцентен имунохистохимични методи.

Редица проучвания показват, че митохондрии-зависимият и вероятно също ER-зависими пътища са ключови апоптични пътища за индуцираната от топлинен стрес апоптоза в герминативните клетки. В потвърждение на това, в настоящето изследване не се установяват промени в структурата на семенниците и надсеменниците в условията на контролиран температурен стрес при рутинно хистологично изследване, но за сметка на това са регистрирани ранни ултраструктурни промени /до 24-тия час след въздействието/ особено в митохондриите, ER и ядрата на клетките от герминативно-соматичния комплекс, които са добре документирани. Еднократното топлинно въздействие води до ултраструктурни промени и в двата клетъчни типа – герминативни и соматични - пахитенни сперматоцити и кръгли сперматиди, и Сертолиевите клетки. Удължените сперматиди, сперматозоидите и Лайдиговите клетки в тестисите, както и основните клетъчни типове в надсеменниците са с нормална ултраструктура, което е в унисон с вече публикувани данни. Резултатите в настоящето изследване показват, че HSP70 и α B-crystallin се експресират конститутивно в миши герминативни клетки /показано имунохистохимично/, предполагайки фундаменталната им роля в сперматогенезата като молекулни шаперони, а температурният стрес предизвиква експресия на индуцируеми изоформи, доказани елегантно чрез електрофоретични и имунохимични методи, ангажирани в устойчивостта на хипертермия. HSP70 играе ролята на молекулен шаперон, който е необходим за асамблирането на Cdc2-cyclin B1 комплекса и активирането на Cdc2 киназата за преминаване на G2-M в профазата I от мейозата при пахитенните сперматоцити и нормалното протичане на сперматогенезата. Логично, чувствителността на пахитенните сперматоцити и кръглите сперматиди към топлинен стрес рефлектира в силна експресия на HSP70 в тези клетъчни типове, което пък от своя страна е гаранция за по-добър репаративен потенциал. На фона на проучвания от други автори, че α B-crystallin има директен анти-апоптичен ефект чрез блокиране на каспазите и способност да се свързва към про-апоптотичните фактори Bax, Bcl-XS и p53 и по този начин да възпрепятства тяхната транслокация към митохондриите, особено интересни и най-вече оригинални са резултатите в настоящия дисертационен труд за експресията на α B-crystallin в тестиси и надсеменници в отделните етапи на нормално протичаща сперматогенеза и подложена на температурен шок. Доказано е, че половата зрелост на тестиса и завършването на сперматогенезата са свързани със силна експресия на α B-crystallin при нормални условия

като ядрата на кръглите и удължените сперматиди, опашките на сперматозоидите и цитоплазмите на Лайдиговите клетки са отчетливо маркирани, особено след топлинното третиране. Диференциалната локализация на HSP70 и α B-crystallin е пряко доказателство, че тези представители на фамилията на протеините на топлинния стрес са ангажирани в основни събития, модулиращи оплодителния капацитет на сперматозоидите – формирането на акрозома и аксонема, съответно. При топлинен стрес тези протеини показват градиент на експресия в посока от по-слабо към по-силно диференцирани герминативни клетки, индикация, че последните са по-сензитивни на топлинен стрес. Както е показано в настоящето проучване този градиент логично е в противовес на градиента на експресия на апоптични клетки в посока от лумена към периферията на семиниферните канали т.е. от по-диференцирани към недиференцирани герминативни клетки, индикация, че последните са по-чувствителни на апоптоза и са с по-слаби репаративни механизми. Оригинални са и резултатите, че надсеменниците също са силно чувствителни на температурни промени и че соматичният компартмент е директно ангажиран в репарационните механизми. В тестиса на полово зрели мишки авторката установява четири пъти по-високи нива на транскрипти на α B-crystallin, индуцирани от високата температура като се наблюдава позитивна корелация и с експресията му на протеиново ниво. Докато в полово зрели миши епидидимиси, температурният стрес индуцира високи нива на транскрипти за цялата палитра от изследвани фактори *hsp70*, *bax*, *α B-crystallin*, *bcl-2* и *pro-caspase-3*, което показва надсеменника като орган силно сензитивен на топлинен стрес. Използвайки естествен модел за температурно-предизвикана апоптоза – крипторхични тестиси от човек – е доказано, че дълго протичащо въздействие на високата температура е свързано с подтисната експресия на HSP70 в половите клетки и силна експресия на анти-апоптотичния протеин Bcl-2, което е знак за активиране на механизмите за клетъчно оцеляване, които, според дисертантката не са достатъчни да преодолеят възникналите последици от топлинния стрес.

Раздел Дискусия: Дискусията е оформена аналитично и с критичен поглед върху собствени и чужди резултати. Избягнато е неоправданото многословие и описание на сигнални пътища, които нямат връзка с изследваните протеини. Може би е малко излишно повтарянето на резултатите макар и в резюме вместо да се пристъпи директно към дискутирането им. Дисертантката е могла да поработи повече върху това да изтъкне значението на собствените си резултати, както и да подчертае кои резултати са оригинални. Изводите макар и повечко на брой са конкретни и дефинитивни и ги приемам. Авторката скромно е отбелязала само два оригинални приноса, единият от които е методичен. Сигурна съм, че оригиналните находки в този дисертационен труд, свързани с нискомолекулярния стресов протеин и ролята му за сперматогенезата са повече и тази скромност е излишна. Като цяло експресията на α B-crystallin е слабо проучена в репродуктивните тъкани и получените резултати в тази посока чакат своето обяснение и допълнителни проучвания и създават поле за спекулации като например каква е ролята на този нискомолекулен протеин в Лайдиговите клетки и има ли отношение към

стероидогенната им активност или ролята му е основно протективна срещу топлинен или оксидативен стрес, събития водещи до колапс на F-актиновия цитоскелет. В тази връзка важно е да се отбележи, че резултатите от настоящия дисертационен труд откриват нови перспективи на изследване.

Авторефератът е изготвен в съответствие с правилата и отразява в пълен обем целта, задачите, изводите и приносите на дисертационния труд. Съкратено са представени използваните материали и методи, представени са основни резултати с елементи на дискусия, отразени на 29 фигури, които не съответстват по номера на тези в дисертацията.

Въпроси към докторантката:

1. Как ще обясните експресията на HSP70 в главичките на епидидималните и еякулиралите сперматозоиди, но не в сперматозоидите в семенниците? Това означава ли, че матуриралите сперматозоиди в надсеменника и еякулата са по-защитени откъм температурен стрес.
2. Как тълкувате повишеното ниво на транскрипти за про-каспаза 3 и липса на експресия на протеиново ниво на екзекуторната каспаза-3 (p11) дори и при нормалното протичане на сперматогенезата?
3. Какво е функционалното значение на това, че сперматидите не съдържат фосфорилиран α B-crystallin?

Докторантката прилага списък с публикациите и участията в научни форуми, свързани с дисертацията. Представените статии по дисертацията са две и са публикувани в реферирано списание, което съответства на изискванията на ЗРАС в РБ и Правилника за неговото приложение и на Правилниците на БАН и ИБИР. В една от публикациите Силвина Запрянова е първи автор. Представените участия са четири, като на един от международните форуми нейн постер е отличен с награда за един от най-добрите постери, което е признание за получените резултати.

Имам удоволствието да познавам гл.ас. Силвина Запрянова от доста години и съм свидетел на нейното изграждане като учен, който прецизно експериментира, анализира и критично тълкува научните данни, работи отлично в екип, има реална самопреценка и стремеж към усъвършенстване, всеотдайна е в работата си и е колега, на който можеш да разчиташ безусловно.

Заключение: Мнението ми за дисертационния труд, представен от свободен докторант Силвина Запрянова е положително и е продиктувано от актуалната тематика, както и от адекватно поставените задачи, прецизно подбраните материали и методи, компетентно изпълнените експерименти и получените интересни резултати – потвърдителни и оригинални. Както се вижда за да осъществят основната си функция като клетки,

компетентни да оплождат сперматозоидите трябва да изградят функционална акрозома и да бъдат мобилни - и в двете им качества значителна роля играят стресовите протеини, обект на настоящия дисертационен труд. Получени са оригинални данни за ролята на α V кристалин в сперматогенезата в норма и в условията на температурен стрес, които предполагат по-нататъшни проучвания. Трудът е изготвен и представен според институционалните изисквания и тези, заложи в ЗРАС в РБ. Напълно убедено давам положителна оценка и призовавам уважаемите членове на НЖ да гласуват за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ на гл.ас. Силвина Запрянова по научната специалност Имунология.

06.06.2017г.
София

С уважение:


/Т. Димова/