

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ

Катерина Каменова Кавалджиева

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ИМУНОГЕННОСТ
НА HSP27 ПРИ ПАЦИЕНТИ
С ИМУНОЛОГИЧНО ОБУСЛОВЕНО БЕЗПЛОДИЕ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна
степен „доктор“

по професионално направление 4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ
В ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ
4. ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА
Научна специалност: Имунология

Научни ръководители:

Проф. д-р Димитрина Димитрова-Диканарова, дм
Доц. Майя Дянкова Маркова, дб

СОФИЯ 2025

Дисертационният труд съдържа 130 стандартни страници и е илюстриран с 29 фигури (26 схеми и графики и 3 панела с микрофотографии, от които един с 6, един с 4 и един с 16 подфигури – общо 26 микрофотографии), както и с 13 таблици. Цитирани са 263 литературни източника, от които 255 на латиница и 8 на кирилица.

Докторантът Катерина Каменова Кавалджиева е докторант на самостоятелна подготовка, зачислена със заповед на Ректора РК 36-1804 от 29.09.2022 г. към Катедрата по биология на Медицински факултет, МУ – София и отчислена със заповед на Ректора РК 36-1239 от 09.05.2025 г.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насрочен за защита на заседание на разширен Катедрен съвет на Катедрата по биология, състояло се на 04.04.2025 г.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Катедрата по биология на Медицински факултет към Медицински университет – София, Лаборатория по имунология на репродукцията. Отделни изследвания са направени в Катедрата по медицинска физика и биофизика и Катедрата по медицинска генетика на МУ – София и в Патологичната лаборатория към Многопрофилната болница за активно лечение и лечение на белодробни заболявания „Св. София“.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 11.07.25 г. от 11.00 часа в 3 аудитория на Медико-биологичен комплекс, ул. „Здраве“ № 2, МФ, МУ – София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на научни длъжности в Медицински университет – София, пред **научно жури в състав:**

Председател:

Проф. Ралица Стефанова Живкова, дб

Членове:

Проф. д-р Румен Павлов Николов, дм,
Чл. кор. Нина Недева Атанасова, дбн,
Доц. Маргарита Нешова Топашка-Анчева, дб,
Доц. Кирилка Стефанова Младенова, дб

Резервни членове:

Проф. д-р Радка Кирилова Тафрадзийска-Хаджиолова, дм
Проф. Милена Атанасова Атанасова, дб

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения.....	4
1. Въведение	5
2. Цел и задачи.....	7
3. Материали и методи	8
4. Резултати.....	20
5. Обсъждане.	45
6. Изводи и приноси.....	61
7. Научна активност, свързана с дисертацията	63

Списък на използваните съкращения

ASA	anti-sperm antibodies (антиспермални антитела)
AUC	Area Under the Curve – площ под кривата
BSA	bovine serum albumin (говежди серумен албумин)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (ензимно-свързан имуносорбентен метод)
DAB	3,3'-diaminobenzidine (3,3'- диаминобензидин)
FITC	флуоресцеин-изотиоцианат
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa, G-бендинг след трипсинизиране
Hsp	heat shock protein (стресов протеин)
Ig	имуноглобулин
IL	interleukin (интерлевкин)
OD	optical density (оптична плътност)
ODF	outer dense fibers – външни плътни нишки
OPD	orthophenylene diamine (ортофенилен-диамин)
PCOS	polycystic ovary syndrome (синдром на поликистозните яйчници)
PBS	phosphate-buffered saline (физиологичен разтвор, буфериран с фосфат)
pHsp	фосфорилиран Heat shock protein
PMN	полиморфонуклеарен неутрофил
PVC	polyvinyl chloride (поливинил хлорид)
ROS	reactive oxygen species (свободни кислородни радикали)
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	standart deviation (стандартно отклонение)
sHsp	small heat shock protein (нискомолекулен стресов протеин)
SIT	sperm immobilization test (спермоимобилизационен тест на Изожима)
SIV	sperm immobilization value (спермоимобилизационно ниво)
TAT	tray agglutination test (микроспермоаглутинационен тест на Фриберг)
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
г.с.	гестационна седмица
кат. №	каталожен номер
МУ	Медицински университет
об.	оборот
СЗО	Световна здравна организация

1. Въведение

Живите организми съществуват в променлива среда и за да оцелеят, трябва да се приспособяват към редица стресови фактори. Това води до изработването на различни механизми за защита от вредните външни влияния. Протеините на топлинния шок (Heat shock proteins, Hsp), още наричани стресови протеини, са една от най-древните системи за предпазване на белтъчните молекули от денатуриране и агрегиране, причинени от различни неблагоприятни фактори – температурен и оксидативен стрес, ацидоза, токсични вещества и др.

Още от откриването им през 1962 г. от италианският генетик Ritossa, стресовите протеини са обект на непрестанен научен интерес. Описват се структурата им, многобройните им функции и локализацията в клетките и тъканите.

Топлинно-шоковите протеини се откриват при прокариоти и еукариоти, консервативни са, взаимодействат с различни други молекули и участват в многобройни процеси – не само при топлинен стрес, а и при нормални събития от клетъчния цикъл, клетъчната диференциация и апоптозата. Една от най-важните им функции е шапероновата – подпомагане на пространственото нагъване на белтъчните молекули. Hsp взаимодействат и с цитоскелетни структури, участват в междуклетъчната сигнализация и др.

Все повече изследвания доказват важната роля на Hsp за успешното осъществяване на репродуктивните функции на човешкия организъм и в частност за сперматогенезата. Тестисът като орган в имунологична изолация е потенциален източник на автоимунни конфликти, като някои от тях е възможно да бъдат провокирани от възпалителен процес. При немалка част от мъжете с инфертилитет тестисът е подложен на стрес, което води до повишена експресия на стресови белтъци и създава условия за автоимунен отговор. Сперматозоидите в резултат на своето специфично диференциране притежават потенциални автоантигени, които в женския организъм се оказват изоантигени.

Възниква въпросът дали при неизяснено безплодие се образуват антитела срещу стресови белтъци и как са свързани с антителата срещу сперматозоидни

антигени – има ли обща етиология, корелация и евентуално припокриване на антигенни детерминанти, или двата имунологични процеса протичат успоредно и независимо, без да си взаимодействат.

Решаването на репродуктивните проблеми е една от задачите на съвременната медицина. Въпреки лечението и съвременните технологии за асистирана репродукция, много от двойките остават бездетни. Практикуващите лекари и пациентите търсят отговори, които да ги насочат към допълнителни тестове и нови възможности за лечение. Когато традиционните изследвания не обясняват причините за безплодието, вниманието се насочва върху възможната роля на имунната система.

Сравнително голям дял (около 25%) от случаите на репродуктивен неуспех се съпровождат с имунологични конфликти, като за част от тези случаи се предполага, че има пряка причинна връзка.

Имунологично обусловено безплодие се нарича състоянието, при което се отчитат антитела, свързващи се с антигени върху гаметите и нарушаващи взаимодействието между сперматозоидите и овоцитите.

Дисертационният труд е посветен на имунологично обусловено безплодие, свързано с наличие на спермоантитела и антитела срещу нискомолекулният стресов протеин Hsp27 (наречен още HspB1), известен със своята шаперонова и антиапоптотична функция.

Трудът е разработен в Катедрата по биология на Медицински факултет към Медицински университет – София, в Лабораторията по имунология на репродукцията. Отделни изследвания са направени в Катедрата по медицинска генетика, в Катедрата по медицинска физика и биофизика на МУ – София, и в Патологичната лаборатория към Многопрофилната болница за активно лечение и лечение на белодробни заболявания „Св. София“.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва имуногенността на нискомолекулният топлинно-шоков протеин Hsp27 при партньорски двойки с предполагаемо имунологично обусловено безплодие, характеризиращо се с авто- и изоимунен отговор срещу сперматозоидни антигени.

За постигане на поставената цел бяха разработени следните основни задачи:

1. Формиране на групи от серуми на безплодни двойки по предварително зададени критерии и скриниране на серумите за наличие на спермоантитела чрез класически методи: спермоаглутинационен, спермоимобилизационен, ELISA.
2. Цитогенетични изследвания на лимфоцити от подбрани пациенти за наличие на хромозомни аберации.
3. Проследяване на експресията и локализацията на нискомолекулният топлинно-шоков протеин Hsp27 в ембрионални тъкани чрез имунохистохимични методи.
4. Скриниране на серумите за антитела срещу нискомолекулният топлинно-шоков протеин Hsp27 чрез ELISA и анализ на получените резултати от популационно-статистическа гледна точка.
5. Имунофлуоресцентна визуализация на реакцията на серуми от инфертилни пациенти със сперматозоиди.
6. Интерпретация на резултатите от гледна точка на патогенезата на инфертилитета и съставяне на модели за предполагаемия ѝ механизъм.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

3.1.1. Серуми от пациенти

Серуми от пациенти и контроли бяха събирани в Лаборатория по имунология на размножаването към Катедрата по биология.

Пациентите, включени в изследването, бяха двойки с диагностицирано безплодие според критериите на СЗО или двойки с повече от два спонтанни аборта, без успешна бременност. Те бяха насочвани към лабораторията от специалисти по стерилитет и асистирана репродукция.

От пациентите се вземаха поне по 5 мл венозна кръв. Кръвта се оставяше да ретрахира около 1 час на стайна температура и се центрофугираше при 3000 об/min за 10 min. Отделеният серум се инактивираше на водна баня при 56°C за 30 min.

Серумите бяха разпределяни в епендорфови епруветки, по 200 µl на епруветка, и съхранявани във фризер при – 20°C до провеждане на изследването.

Пациентите участваха доброволно в изследването и попълваха информирано съгласие, че техните проби ще бъдат включени в проучванията относно имунологичните причини за безплодие.

В изследването бяха включени серуми на 158 пациенти с репродуктивни проблеми, от които 83 мъже и 75 жени във фертилна възраст. От тях 146 са партньорски двойки, които са се изследвали заедно, и 12 пациенти (10 мъже и 2 жени) – без партньора си.

Пациентите бяха със следните диагнози: първично безплодие – 101 души, с вторично безплодие – 37, и 20 пациенти с отклонения в спермограмата, възпалителни заболявания и аномалии, свързани с възпроизводствените функции, като астенозооспермия, варикоцеле, простатит, крипторхизъм, боледували от вирусен паротит. Диагнозите бяха поставяни от лекаря, насочил ги за изследване.

Според диагнозите разпределихме серумите в три групи:

1. От пациенти с първично безплодие
2. От пациенти с вторично безплодие
3. От пациенти с отклонения в спермограмата, възпалителни заболявания и аномалии, свързани с възпроизводствените функции, като астенозооспермия, варикоцеле, простатит, крипторхизъм, боледували от вирусен паротит.

Формирахме и групи според пола на пациентите (мъже/жени), за да се проследи дали е еднаква честотата на образуваните ASA при двата пола.

Също така проследихме резултатите според партньорските двойки, поради това, че е достатъчно единият от партньорите да страда от безплодие, за да се наблюдават репродуктивни неуспехи в двойката.

В контролната група бяха включени 112 здрави доброволци от същата възрастова група, с подобно съотношение между мъже и жени и с доказана фертилност.

3.1.2. Сперматозоиди от здрави донори

За методите за изследване на спермоантитела, бяха използвани еякулатни проби от донори с нормозооспермия и негативни резултати за наличие на ASA. Донорите доброволно предоставяха пробите си с информирано съгласие те да се използват за тестове на пациенти и научни изследвания.

3.1.3. Ембрионални тъкани

При изследванията е спазен „Медицински стандарт по Клинична патология”, Държавен вестник, бр. 82/27.08.2002г. и допълнения на Медицинския стандарт.

Ембрионални тъкани (от аборт по желание) – парафинови блокчета, предоставени от д-р Стефан Петров, началник на Отделение по Клинична патология, УМБАЛ „Св. Анна”, гр. София. Възрастта на ембриона бе определена в гестационни седмици (г.с.), считано от първия ден на последната редовна менструация.

3.1.4. Неутрофили от пациенти с плеврален излив

За изследванията върху неутрофили бяха използвани проби от 18 пациенти, развили ексудативен плеврален излив в резултат на инфекция (10 души) или злокачествено заболяване (8 души). Клетките бяха изолирани от плеврална течност и периферна кръв, поставяни в Кребс-Рингеров фосфатен буфер (pH 7,4) с 5,56 mmol/l глюкоза и стимулирани с 0,3 mg/ml Zymosan A (Sigma-Aldrich).

3.1.5. Антигени и антитела

1. Рекомбинантен човешки Hsp27 протеин на Elabsience, кат. № PKSH031656.
2. Заешки поликлонален серум анти-Hsp27 на Elabsience, кат. № E-AB-31748.
3. Кози антизаешки Sigma Aldrich Goat anti-rabbit IgG – Peroxydase, кат. № A0545.
4. Кози античовешки пероксидазен конюгат Santa Cruz Biotechnology Inc. Goat anti-human кат. № Hg-HRP:SC-2453.
5. Моноспецифичен серум срещу Hsp27, Santa Cruz Biotechnology, Inc – заешко поликлонално антитяло, кат. № ab1426.
6. Моноспецифичен серум срещу pHSP27, Santa Cruz Biotechnology, Inc, – заешко поликлонално антитяло, кат. № PA1-018.
7. Визуализираща система – за проследяване експресията на Hsp27 в клетки и тъкани на човешки ембрион и фетус е използвана polymer-based EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH Dako, code № K8024.
8. Кози античовешки IgG, конюгиран с FITC (Национален център по заразни и паразитни болести, София).

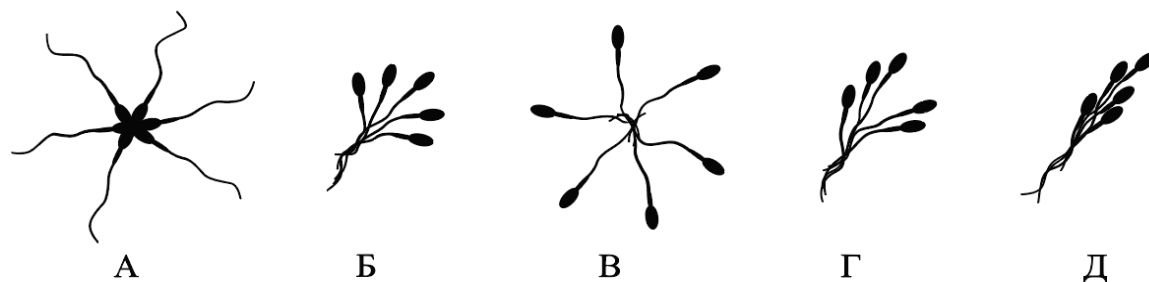
3.2. Методи

3.2.1. Спермоаглутиниращ тест на Фриберг (TAT, tray agglutination test)

Проба от донор с нормоспермия (предварително тестван за ASA с негативен резултат) се втечняваше, като се инкубираше 30 min на 37°C. След центрофугиране при 3000 об/min за 10 min (на стайна температура) с центрофуга Hettich Rotofix 32 отделяхме надутайката. Към утайката добавяхме хранителна среда TC Medium 199 10x (работно разреждане 1x), обогатена с 0,3% BSA (говежди серумен албумин), и центрофугирахме 10 min на 3000 об/min. Изхвърляхме надутайката, надсложвахме нова хранителна среда и оставяхме да престои 30 min на 37°C под наклон 45°, за да изплуват най-жизнените и подвижни сперматозоиди (swim up). След това проверявахме подвижността и морфологията им под микроскоп. Отделяхме изплувалите сперматозоиди, ресуспендирахме в хранителна среда 200 µl, и няколко µl разреждахме с разтвор за броене (5% NaHCO₃, 0,004% формалин във вода) в съотношение 1:20. След разбъркване на Vortex-Genie 2 поне за 10 s, сперматозоидите бяха броени в камера на Бюркер. След броенето сперматозоидите се довеждаха до концентрация 40.10⁶/ml.

От пациентските серуми се изготвяше серия падащи разреждания. В първата ямка на микротитърна плака на Terasaki се накапваха по 5 μ l от серума. Добавяхме 5 μ l буфер на Бейкър (3% глюкоза, 0,46% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2% NaCl , 0,01% KH_2PO_4 , рН 8,1), за да разредем 1:2. Правехме серия от падащи разреждания. Освен изследваните серуми, залагахме положителна и отрицателна контрола. Отрицателната контрола беше серум от предварително изследван пациент с негативни резултати за ASA, разреден с буфер на Бейкър 1:100. За положителна контрола служеше заешки антисерум срещу човешки сперматозоидни антигени, получен в нашата лаборатория, разреден 1:10 и 1:100, както и серуми от безплодни пациенти с предварително доказан висок титър на ASA.

След накапване на изследваните серуми, повърхността на плаката внимателно се надсложаваше с 10 ml течен парафин. Накапваше се по 1 μ l от сперматозоидната суспензия, плаката се покриваше и беше инкубирана на 37°C в термостат за 1 час. Резултатите се отчитаха с наблюдение на плаката под инвертен микроскоп. При наличие на ASA срещу повърхностни антигени се образуваха комплекси – аглутинати, със запазена подвижност на сперматозоидите. Според спецификата на антителата и локализацията на аглутиногените се наблюдаваха няколко основни типа аглутинация, показани на **Фигура 1** (опростен вариант на фигура, разработена от експерти на СЗО – Rose et al., 1976).



Фигура 1. Типове аглутинация:

А. Глава с глава (*head to head, h-h*).

Б. Опашка с опашка (*tail to tail, t-t*).

В. Врџх на опашка с врџх на опашка (*tail tip to tail tip, tt-tt*).

Г. Смесен тип (*mixed, m*) – съчетание от глава с глава и опашка с опашка.

Д. Тангентна (*tangle, t*) – опашките са усукани и главите се допират до тях.

След отчитане на наличие и тип на аглутинацията се определяше титърът на спермоаглутиниращите антитела в тестируания серум, като за клинично значими се приемаха титри, равни или по-високи от 32.

3.2.2. Спермо-имобилизиращ тест на Изожима (SIT)

В основата на метода е свързване и активиране на системата на комплемента, което означава, че се откриват антитела от класовете IgM и IgG (без IgG4 субклас), защото те могат да активират комплемента. Използвахме полуколичествен вариант на теста, при който се отчиташе ниво на спермоимобилизация (SIV) на изследвания серум.

Във всяка ямка на микротитърна плака Terasaki накапвахме по 10 µl буфер на Бейкър. Добавяхме по 10 µl от изследвания серум. След ресуспендиране 10 µl се прехвърляха в следващата ямка, Внимателно надслоявахме плаката с 10 ml течен парафин. Във всяка ямка накапвахме по 1 µl сперматозоидна суспензия, обработена по методиката swim up, както е описано по-горе за спермоаглутинационния метод на Friberg. За всеки пациент използвахме по 4 ямки, като в 2 от тях накапвахме по 2 µl комплемент от морско свинче (Национален център по заразни и паразитни болести, София), а другите 2 ямки оставяхме без комплемент. За отрицателна контрола служеше предварително изследван серум, негативен за ASA, разреден с буфер на Бейкър 1:100. За положителна контрола се използваше заешки антисерум срещу сперматозоидни антигени, разреден 1:10 и 1:100, и серуми от безплодни пациенти с доказан спермо-имобилизиращ ефект.

Плаките се инкубираха 1 час на 37°C в термостат, след което резултатът се отчиташе под инвертен микроскоп. При отчитането се изброяваха 100 сперматозоида в пробата и се отчиташе броят подвижни между тях. От получените резултати се изчисляваше SIV:

$$SIV = \frac{C}{T}$$

където С е броят подвижни сперматозоиди в отрицателната контрола, а Т е броят им в изследвания серум. Като положителни се отчитаха резултатите, равни или по-големи от 2.

3.2.3. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA)

При изследването на серумите за наличие на спермоантитела и анти-Hsp27 антитела използвахме индиректна ELISA.

3.2.3.1. ELISA за отчитане на ASA

За доказване на анти-сперматозоидни антитела в тестираните серуми ELISA бе проведена по методика, модифицирана в нашата лаборатория.

След swim up и определяне на концентрацията им, сперматозоидите се съхраняваха в термостат на 37°C до натоварване на плаките. Използвахме 96-ямкови PVC плаки (U-bottom, Costar, Cambridge, USA). Плаките обработвахме с poly-L-lysine (50mg/ml в dest. H₂O), х 50µl/ямка, за 1 час, след което ги изсушавахме. Натоварихме ги, като накапахме по 50 µl/ямка от сперматозоидната суспензия (5.10⁶ сперматозоида/ml). Плаката оставяхме за една нощ на 37°C за изсушаване. Изсушената плака фиксирахме с 30% метанол (х 50 µl/ямка) за 30 мин на стайна температура и промивахме трикратно с 0,05% Tween/PBS.

За блокиране на плаките към всяка ямка добавяхме х150 µl 1% говежди албумин (BSA/PBS) и инкубирахме за 1 час на стайна температура. Промивахме трикратно с 0,05% Tween/PBS.

Добавяхме по 50 µl/ямка от серумите, предварително разредени 1:20. За всеки пациент се провеждаха по две повторения. Инкубирахме 2 часа на стайна температура и промивахме трикратно с 0,05% Tween/PBS.

Добавихме по 50 µl/ямка от второто антитяло – анти-човешки имуноглобулин, конюгиран с пероксидаза, и инкубирахме за 1 час при 37°C. Промивахме трикратно с 0,05% Tween/PBS

За проявяването във всяка ямка се добавяхме по 50 µl (12 µl цитратен буфер и 6 µl 30% H₂O₂ + 5 mg OPD), за 4-7 min. Точното време за престой определихме по цвета на отрицателната контрола, която съдържа PBS вместо изследвания серум. В момента, в който наблюдавахме съвсем леко оцветяване на ямката с PBS, стопирахме реакцията с 10% H₂SO₄, по 50 µl/ямка. Резултатите отчетохме с ELISA reader DW-SM600 при дължина на вълната 492 nm.

Като положителна контрола използвахме серуми от пациенти, с доказани клинично значими стойности на ASA при предишни изследвания. Като отрицателна контрола използвахме серуми от здрави (фертилни) лица. Използвахме поне 10 отрицателни контроли във всеки експеримент. Освен тях, използвахме и абсолютна отрицателна контрола, в която вместо серум се накапва PBS.

3.2.3.2. ELISA за доказване на антитела срещу Hsp27

За натоварване на плаките използвахме рекомбинантен човешки Hsp27 протеин на Elabsience, каталожен номер PKSH031656. Работната концентрация на антигена бе определена чрез предварителното му титриране в разреждане от 1,25µg до 0,0093 µg/ямка в coating буфер. Натоварените плаки с падащи разреждания на антигена инкубирахме 2 часа на стайна температура и 16 часа при 4°C. Като първо антитяло използвахме заешки поликлонален серум анти-Hsp27 на Elabsience, каталожен номер E-AB-31748, в разреждане 1:10 000 и плаката инкубирахме 1 час на стайна температура. Като второ антитяло използвахме кози антизаешки серум Sigma Aldrich Goat anti-rabbit IgG - Peroxydase кат. номер A0545, разреден 1:1000. Реакцията визуализирахме с OPD, а стойностите отчетохме на ELISA reader DW-SM600 при дължина на вълната 492 nm. Анализът на резултатите показва, че подходящото разреждане за натоварване на плаките е 0,45 µg/ямка.

Антигенът (рекомбинантен човешки Hsp27 протеин на Elabsience, каталожен номер PKSH031656) накапахме върху 96-ямкова PVC плака (U-bottom, Costar, Cambridge, USA) по 50 µl/ямка антиген, разтворен в 0,05 M карбонатен буфер (NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9,6) и плаките инкубирахме на стайна температура 1 час и на 4°C за 16-18 часа. След трикратно измиване с миещ буфер (PBS pH 7,2, съдържащ 0,05% Tween-20) на покритите с антиген плаки, свободните протеин-свързващи места бяха блокирани чрез накапване на 100 µl/ямка блокиращ буфер (0,2% Tween 20 /PBS) за 60 мин.

Изследваните за наличие на анти- Hsp27 серуми от пациенти с инфертилитет и контролна група от фертилни лица, предварително разредени 1:20 в PBS, бяха накапвани в обем по 50 µl/ямка и инкубирахме 2 часа на стайна температура.

След трикратно измиване с миещ буфер (PBS pH 7,2, съдържащ 0,05% Tween-20), накапахме второто антитяло (кози античовешки Santa Cruz Biotechnology Inc. goat anti-human Hg-HRP:SC-2453 в работно разреждане 1:5000 по указание на производителя).

След трикратно измиване с миеш буфер (PBS pH 7,2, съдържащ 0,05% Tween-20), реакцията визуализирахме с OPD, а стойностите отчетохме на ELISA reader DW-SM600 при дължина на вълната 492 nm.

OD стойностите на серумите от контролната група използвахме за определяне интервала на физиологичното ниво на серумни имуноглобулини, реагиращи с Hsp27. OD стойности, по-високи от средната стойност на OD на контролната група плюс два пъти стандартното отклонение, приехме за сигнификантно повишени спрямо физиологичното ниво и серумните проби бяха отчетени като положителни за анти- Hsp27 антитела.

Като отрицателна контрола използвахме 12 серума от здрави (фертилни) лица. В серия ямки вместо серум накапахме PBS, за да послужи за контрола на конюгата.

3.2.4. Имунохистохимична оцветяваща техника

Методът също като ELISA се основава на свързването антиген-антитяло и на свойството на определени ензими да превръщат безцветен субстрат (хромоген) в цветен продукт, но се използва за клетъчно-тъканната локализация на изследваните антигени. В настоящото изследване Hsp27 или pHsp27 (нефосфорилирана и фосфорилирана форма на Hsp27) бяха доказвани чрез индиректен метод, включващ две стъпки. Беше използван двуетапен базиран полимер-базиран EnVision™ кит (polymer-based EnVision™ FLEX Mini Kit, High pH Dako), в който към скелетна полимерна система са прикрепени второто антитяло с антимиша и антизаешка имуноглобулинова специфичност и ензимните молекули.

Hsp27 и pHsp27 се изследваха в ембрионални и фетални човешки тъкани. Пробите бяха обработвани по следния начин:

1. Фиксиране и включване на материала – той беше поставян последователно в 10% неутрален формалин (Merck), стандартни редици от алкохол и ксилол и парафиново блокче.

2. Приготвяне на хистологични срези с дебелина 4 μm и монтиране на адхезивно предметно стъкло; изсушаване и залепване на материала – 2 часа на 60°C и след това 12 часа на 37°C.

3. Депарафиниране чрез трикратно потапяне на препарата в ксилол за по 10 min.

4. Рехидратиране чрез последователно прекарване на препаратите през етанол – 100 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 % по 5 min, подсушаване с филтърна хартия и промиване с дестилирана H_2O .

5. Антигенно възстановяване по протокол на производителя: предварително загряване до 65°C, след което покачване на температурата до 95°C, 20 min на 95°C и охлаждане до 65°C; двукратно промиване с миещ буфер (от производителя).

6. Накапване и инкубиране на срезите с първото антитяло за 20 min, двукратно промиване.

7. Накапване и инкубиране на срезите с ензимно конюгираното второ антитяло, трикратно промиване с миещ буфер.

8. Накапване и инкубиране с хромогена-проявител (3,3'-диаминобензидин) за 8 мин; промиване с буфер и дестилирана вода.

9. Контраоцветяване с неразреден Nematohylin за 25 сек; изплакване с дестилирана вода за 10 – 15 min.

10. Дехидратиране – във възходяща редица етанол: 50%, 70%, 90%, 96%, 100% по 5 мин.

11. Включване: препаратите внимателно се подсушават с филтърна хартия, слага се по една капка канадски балсам + покривно стъкло и се оставят до следващия ден да изсъхнат.

Готовите препарати се наблюдават под микроскоп. Като позитивна реакция (експресия на Hsp) се приема отлагане на антиген-антитялови комплекси, оцветени в кафяво, в различни клетъчни участъци според локализацията на търсения антиген.

Отчитането и документирането на имунохистохимичните реакции е извършено в Катедрата по биология и в Отдел „Научна Документация” на МУ – София с използването на микроскопи Nikon и Carl Zeiss Amplital.

3.2.5. Конвенционален цитогенетичен анализ

Кариотипът на 16 пациенти (8 мъже и 8 жени), положителни за ASA, беше изследван чрез рутинен цитогенетичен метод, провеждан на краткосрочни лимфоцитни култури, със следните основни етапи:

1. Култивиране на краткосрочни лимфоцитни култури от цялостна кръв: От пациентите се вземаше венозна кръв (поне 1 ml) и се поставяше в епруетка с антикоагулант. С клетките се работеше в стерилен ламинарен бокс Aquaria Mini Flow FLV-H. Те се посяваха в среда Lymphochrome в стерилни флакони за култивиране и се инкубираха на 37°C за 68-72 часа.

2. Обработка на културите: Между 68 и 72 час към културата добавяхме 0,05 ml колцемид. След инкубация за 25 min на 37°C културата се прехвърляше в центрофужна епруетка. Центрофугираше се за 10 min на 1200 оборота/min, отпипетирахме надутайката, а утайката беше разбивана. Добавяхме 5 ml предварително темперирани на 37°C хипотоничен (0,75 M) разтвор на KCl. Инкубирахме 10 min при 37°C. Центрофугирахме за 10 min на 1200 оборота/min, отпипетирахме надутайката, а утайката беше разбивана. Добавяхме 5 ml пресен студен фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 3:1, охладен на -20°C). Горните стъпки повтаряхме още два пъти. Накрая ресуспендирахме утайката в малко количество пресен фиксатор и я съхранявахме на -20°C.

3. Приготвяне на микроскопски препарати: Обезмаслени предметни стъкла бяха охладени в дестилирана вода до 0 – 4°C. Върху тях накапвахме охладената лимфоцитна суспензия от височина 25-30 cm. Стъклата леко се отцеждаха и се сушаха на въздух при стайна температура, наклонени под ъгъл 60°. Изсушените препарати поставяхме 45-50 min на термостатна плоча, нагрята до 100°C.

4. Оцветяване на препаратите с GTG-техника: Започваше след охлаждане на стъклата до стайна температура. Прекарвахме ги последователно през кювети с: Разтвор на 15 mg трипсин в 75 ml PBS (прясно приготвен и темперирани до 37°C) за 1-2 min; PBS за изплакване; Giemsa (3,5 ml изходен разтвор, разреден във фосфатен буфер, pH 6,8) за 4 до 6 min при 4°C; дестилирана вода за изплакване.

5. Микроскопски анализ: Избираха се подходящи метафазни пластинки с добре разпръснати, неприпокриващи се хромозоми и отчетлив бендинг. При увеличение 1000X всяка метафазна пластинка се анализираше за бройни и

структурни хромозомни аберации. При некомплицирани случаи се анализираха 12-15 пластинки, а при съмнение за мозаицизъм броят на анализирани пластинки можеше да се увеличи до 100.

Цитогенетичният анализ се провеждаше в Катедрата по медицинска генетика на МУ – София с тяхното любезно съдействие.

3.2.6. Индиректна имуофлуоресценция

Еякулатни проби бяха получавани от здрави нормозооспермични донори. Оставяха се да се втечнат при 37°C за 30 min. След това сперматозоидите се промиваха с PBS (pH 7,2). Бяха нанасяни на предметни стъкла, изсушавани на въздух на стайна температура и фиксирани със студен етанол за 10 min и студен ацетон за 2 min. След фиксацията пробите се рехидратираха за 10 min в PBS (pH 7,2) с 1% BSA. Същият буфер (PBS с 1% BSA) се използваше за разреждане на антителата и промиване на препаратите след инкубациите с разтворите на антителата.

Рехидратирани стъкла се инкубираха за 1 час на стайна температура със серумите на пациентите и контролите (използвани като първи антитела), разредени 1:20. Като абсолютна отрицателна контрола беше използван PBS с 1% BSA без серум. След двукратно промиване по 10 min, FITC-конюгирано второ антитяло, разредено 1:20, се прилагаше за 30 min при стайна температура на тъмно. Препаратите се промиваха двукратно по 10 min с PBS-BSA и веднъж с PBS. Върху тях се накапваше смес от 1 обемна част PBS и 9 обемни части глицерол, слагаша се покривни стъкла и се наблюдаваше на флуоресцентен микроскоп Olympus BX53.

3.2.7. Хемилуминесцентен анализ на неутрофили

Функционалното състояние на неутрофилите беше оценявано чрез луминол-амплифицирана хемилуминесценция. Във всяка от пробите беше добавян луминол (Fluka) до крайна концентрация 10^{-5} mol/l.

Хемилуминесценцията, отразяваща количеството образувани свободни кислородни радикали (ROS), беше отчитана чрез луминометър в режим за броене на фотони. Въз основа на резултата беше определяно функционалното състояние на неутрофилите (активирани или в покой).

3.2.8. Статистически методи

За настоящите проучвания използвахме ниво на значимост $\alpha = 0,05$. Това означава 5% вероятност нулевата хипотеза, че разликите между изследваните две групи се дължат на случайни фактори, да се отхвърли, когато всъщност е вярна. При $P < 0,05$ разглеждахме получените резултати като статистически значими, а при $P \geq 0,05$ приемахме, че няма статистически значима разлика между двете групи.

За проверка на нулевата хипотеза използвахме метода χ^2 (хи-квадрат) и екзактният тест на Фишер. Методът χ^2 се прилагаше, когато бяха спазени следните условия: обем на извадката > 50 индивида и експериментално установеният брой на индивидите във всяка клетка беше ≥ 5 . Тестът на Фишер беше подходящ в случаите, когато използваната извадка беше с малка численост.

За изчисление на статистическите данни бяха използвани Microsoft Excel и онлайн калкулатор: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>

Когато трябваше да се изследва взаимовръзката между резултатите от използваните методи за целта беше използван корелационен анализ с програмата Graphpad Prism 10. Полученият коефициент за корелация на Спийрман (r) беше отчитан като статистически значим при $p < 0,05$. Големината на ефекта беше определяна по скалата на Коен (Cohen).

За оценка на методите, използвани за отчитане на ASA в серум, бяха приложени и Receiver Operating Characteristic (ROC) криви. Те графично представят оценка на метода. При оценката е важна стойността Area Under the Curve (AUC) – площ под кривата. AUC е вероятността стойността на критерия на индивид, избран на случаен принцип от популацията на тези с положителни резултати, да е по-голяма от стойността на критерия на друг индивид, изтеглен на случаен принцип от популацията на тези, при които резултатите са отрицателни. Площта под кривата характеризира точността на метода. При стойност 1 имаме перфектна точност. Стойности между 1 и 0,5 характеризират метода като достатъчно надежден, а стойности, по-ниски от 0,5 показват, че методът няма нужната диагностична стойност. ROC-анализът е приложен с програмата Graphpad Prism 10.

За онагледяване на резултатите бяха използвани и графики, изработени с Microsoft Excel и Graphpad Prism 10.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Проследяване на честотата на антиспермални антитела у пациенти с репродуктивни проблеми

За проследяване на честотата на антиспермалните антитела с роля в имунологично обусловеното безплодие бяха изследвани серуми от общо 158 пациенти с репродуктивни проблеми.

Сперматозоидните антигени представляват голяма и хетерогенна група, с различна локализация и различно биологично значение, следователно срещу тях се образуват поликлонални антитела, принадлежащи към различни имуноглобулинови класове. По тази причина използвахме три различни теста, чрез които да можем да отчетем различните субпопулации антиспермални антитела.

За доказване наличието на спермоаглутиниращите антитела беше използван микроспермоаглутинационен тест на Friberg (TAT), за спермоимобилизиращи антитела – спермоимобилизационен тест на Isojima (SIT) в полуколичествения му вариант, а за доказване на антитела, насочени срещу антигени, разположени върху и под повърхността на сперматозоидите, беше използван методът ELISA. За ELISA бяха използвани меки полистиренови плаки, предварително обработени с поли-L-лизин с цел увеличаване на адхезивната способност на ямките (по Dimitrova et al., 2004) и натоварени с по 50 μl сперматозоидна суспензия в ямка (5×10^6 сперматозоида на μl , получени след swim up на спермални проби от донори с доказана фертилност).

При всеки от използваните методи бяха определени клинично значими стойности. За микроспермоаглутинационния тест на Friberg (TAT) това бяха титри ≥ 32 , за спермоимобилизационния тест на Isojima (SIT) – $SIV \geq 2$, за ELISA – OD стойности, по-високи от праг, определен по формулата $\bar{x} + 2SD$ (средната стойност на OD за контролната група плюс удвоеното стандартно отклонение).

Тези клинично значими стойности са определени съобразно с общоприетите по литературни и наши лабораторни данни (Rowe, 1993).

При изследване на групата пациенти с репродуктивни проблеми получихме следните данни: при метода TAT 35 пациенти реагират положително, в клинично значими стойности на резултата (22,10%), при SIT – 37 (23,42%), а при ELISA – 43 (27,20%).

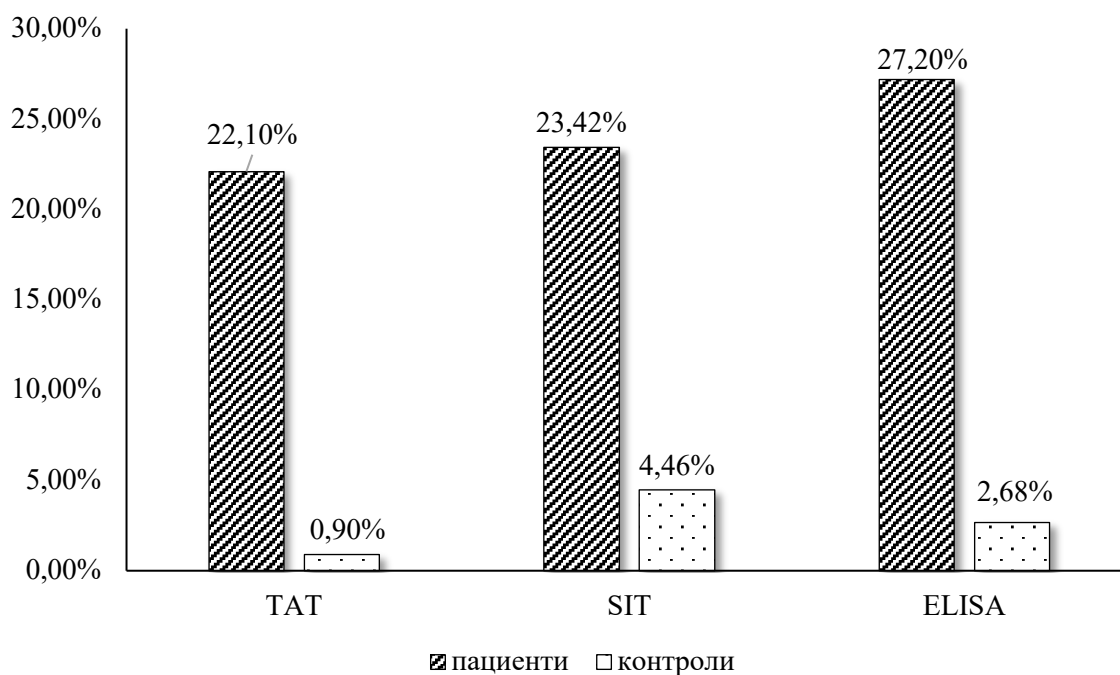
При изследването на контролната група (112 фертилни лица от същата възрастова група и разпределение по пол) за наличие на спермоантитела с трите метода бяха получени следните резултати: TAT – 1 положителен (0,90%), SIT – 5 положителни (4,46%) и ELISA – 3 положителни (2,68%).

И при трите приложени метода се доказва статистически значима разлика за честотата на ASA между групата на изследваните пациенти и контролната група ($P < 0,0001$).

Получените резултати са представени в **Таблица 1** и **Фигура 2**.

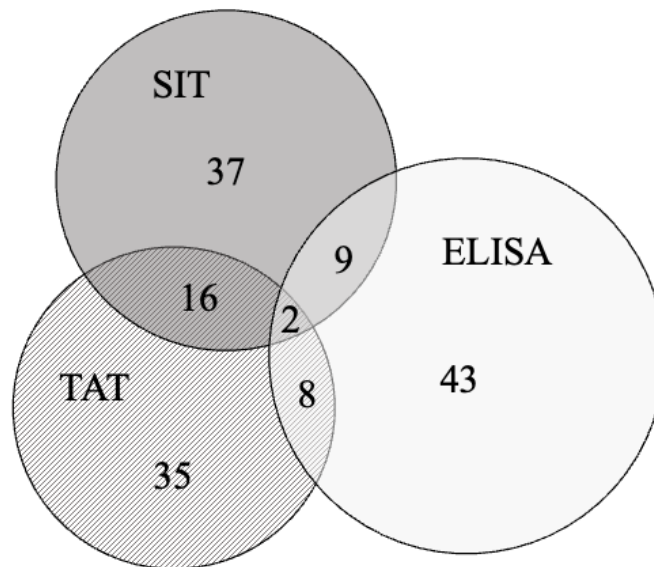
Таблица 1. Относителна честота на положителните резултати – показани са процентните честоти на положителни резултати по трите метода за изследване на ASA у пациентите с безплодие, сравнени с контролната група.

Изследвана група	Пациенти с репродуктивни проблеми		Контролна група	
	Общ брой		Общ брой	
	158		112	
Метод:	Брой положителни	Процент положителни	Брой положителни	Процент положителни
TAT	35	22,10%	1	0,90%
SIT	37	23,42%	5	4,46%
ELISA	43	27,20%	3	2,68%



Фигура 2. Относителна честота на положително реагиращите серуми от изследваните групи по отношение на клинично значимите стойности на спермоантителата – графично е представен процентният дял на положителните резултати по трите метода за изследване на ASA в серумите на пациентите с безплодие, сравнени с контролната група. (За статистически достоверни се приемат резултати при $P < 0,05$.)

Беше изследвано и евентуалното наличие на корелация между присъствието на спермоантитела, установени чрез различните използвани методи – TAT, SIT и ELISA. Както се спомена по-горе, от 158 изследвани пациенти 35 (22,10%) показаха положителен резултат при TAT, 37 (23,42%) – при SIT и 43 (27,20%) – при ELISA. Положителни едновременно по TAT и SIT бяха 16 пациенти, по TAT и ELISA – 8 пациенти и по SIT и ELISA – 9 пациенти. Двама пациенти имаха положителни резултати и по трите теста – мъж на 47, според анамнезата – преболедувал вирусен паротит, и жена на 36 г. с диагноза първично безплодие. Степента на припокриване на положителните стойности за спермоантитела, получени при изследване на един и същ серум по повече от един метод, е показана графично чрез диаграма на Вен на **Фигура 3**.



Фигура 3. Брой серуми от пациенти с първичен стерилитет, даващи положителна реакция при отчитане на ASA с трите различни метода. Сечението на кръговете отговаря на серуми, положителни по повече от един метод.

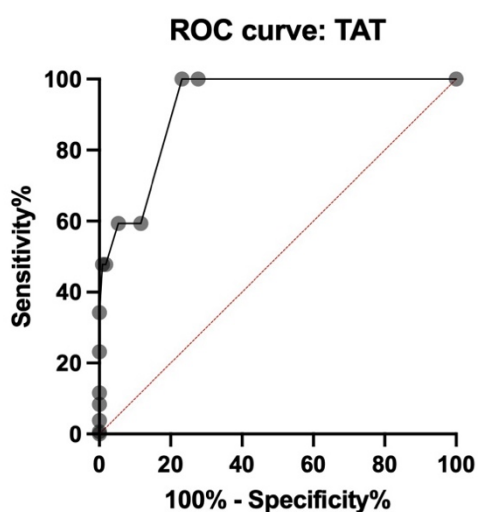
За да установим евентуални асоциации между наличието на спермоантитела, регистрирани чрез различни методи, приложихме корелационен анализ с използване на корелационен коефициент на Spearman. Установихме слаба корелация ($r = 0.236$) между резултатите от два от прилаганите методи – TAT и SIT, която беше значима ($p < 0,01$). Не беше установена значима асоциация между TAT и ELISA или между SIT и ELISA (**Таблица 2**).

Таблица 2. Резултати от корелационния анализ за наличие на ASA, регистрирани чрез различни методи, при пациенти с първичен стерилитет.

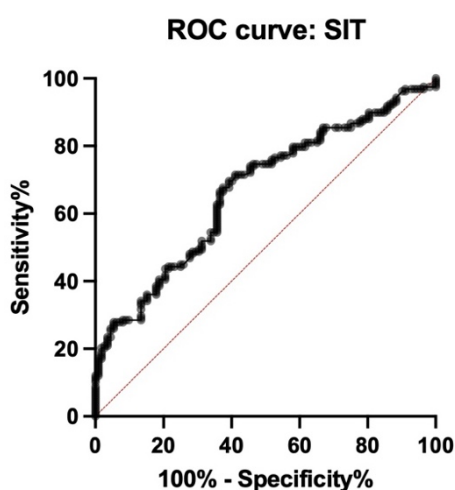
Методи	Корелационен коефициент (r)	Статистическа значимост (p)
TAT и SIT	0.23602	0,00283 < 0,01 (да)
TAT и ELISA	0.02584	0.74721 > 0,05 (не)
SIT и ELISA	0.02025	0.80064 > 0,05 (не)

За оценка на методите сме използвали и ROC-кривите, при които площта под кривата (AUC) е популярна мярка за точността на диагностичните тестове. При стойности на AUC в интервала 0,5 – 1,0 методът притежава необходимата точност. Резултат под 0,5 няма диагностична стойност, а резултат 1,0 е показва перфектна ефективност на теста. Най-висока стойност на AUC показва методът TAT – 0,9245. Методите SIT и ELISA също са в интервала на AUC, показващ необходимата достоверност, респективно 0,6685 и 0,6527.

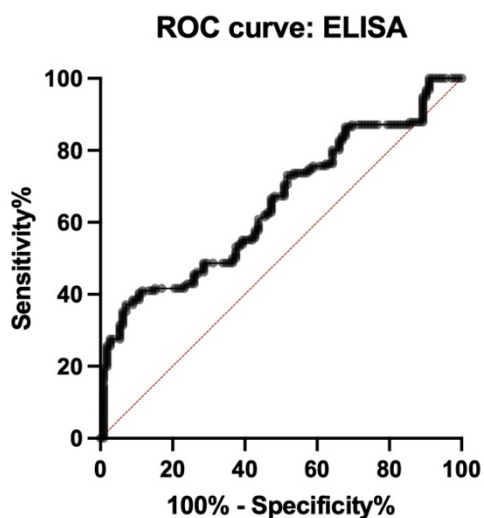
Резултатите са представени на **Фигури 4, 5 и 6** и **Таблица 3**.



Фигура 4. ROC анализ на метода TAT.



Фигура 5. ROC анализ на метода SIT.



Фигура 6. ROC анализ на метода ELISA.

Таблица 3. Резултати от ROC-анализа на методите TAT, SIT и ELISA.

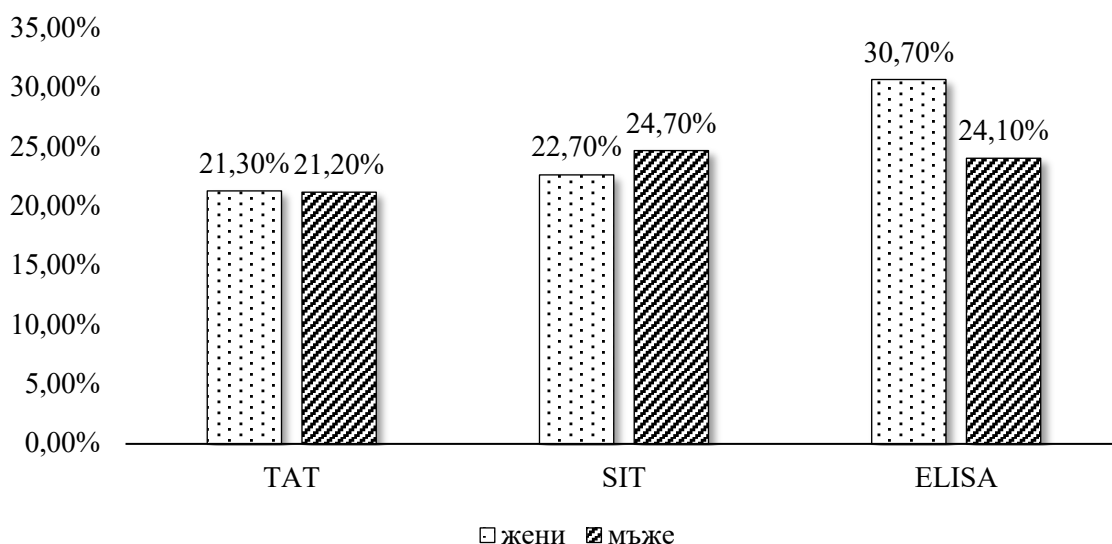
Величина	TAT	SIT	ELISA
Площ под кривата (AUC)	0,9245	0,6685	0,6527
Стандартна грешка	0,01631	0,03274	0,03307
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Доколкото спермоантителата при мъже и при жени спадат към различни категории (съответно автоантитела и изоантитела), беше уместно да се намерят честотите им при двата пола поотделно. При изследване на честотата на положително реагиращите серуми в пациентската група (без разделяне по диагнози) не беше установена статистически значима разлика в резултатите при двата пола ($P > 0,05$).

Получените резултати са представени в **Таблица 4** и **Фигура 7**.

Таблица 4. Сравнение на относителната честота на положителни резултати по трите използвани метода според пола на пациентите.

Изследвана група	Жени		Мъже	
	Общ брой		Общ брой	
Общ брой	75		83	
Метод:	Брой положителни	Процент положителни	Брой положителни	Процент положителни
TAT	16	21,3%	18	21,20%
SIT	17	22,7%	21	24,70%
ELISA	23	30,7%	20	24,10%



Фигура 7. Относителна честота на положителните резултати според пола на пациентите. Графично е представена процентната честота на положителните резултати по трите метода за изследване на ASA в серума ($P > 0,05$).

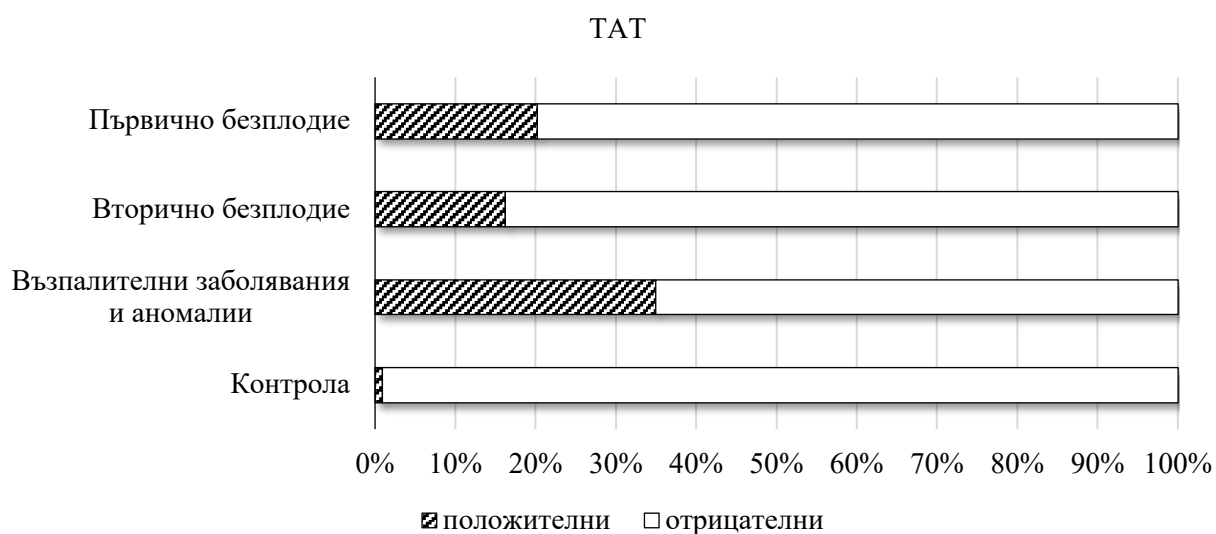
С оглед на патогенезата на хуморалния имунен отговор срещу сперматозоидни антигени интерес представляваха други данни за пациентите като типът на стерилитета (първичен или вторичен) и евентуалното наличие на съпътстващи или минали заболявания. Серумите на пациентите бяха разпределени в три групи според диагнозата им: с първичен стерилитет (101 души), вторичен стерилитет (37 души) и пациенти с отклонения в спермограмата, възпалителни заболявания и аномалии, свързани с възпроизводствените функции (астенозооспермия, варикоцеле, простатит, паротит и крипторхизъм) – 20 души. Сравнихме получените резултати според така обособените групи.

При разделяне на пациентите в групи според техните диагнози беше установена статистически значима разлика в честотата на положително реагиращите серуми от пациенти от трите групи спрямо контролната група при метода TAT ($P < 0,0001$).

Резултатите са представени в **Таблица 5** и **Фигура 8**.

Таблица 5. Сравнение на абсолютната и относителна честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода TAT

TAT	Брой положителни	Процент положителни	Брой отрицателни	Процент отрицателни
Първично безплодие	20	20,20%	81	79,80%
Вторично безплодие	6	16,22%	31	83,78%
Възпалителни заболявания и аномалии	7	35,00%	13	65,00%
Контролна група	1	0,90%	111	99,10%



Фигура 8. Сравнение на относителната честота на положителни резултати при микроспермоаглутинационния тест на Friberg – TAT при трите групи пациенти ($P < 0,0001$).

Резултатите показват по-висок процент на положително реагиращите серуми в третата група. Тестът на Фишер обаче даде $P = 0,1203$, което означава, че разликата спрямо другите две групи пациенти не е статистически значима.

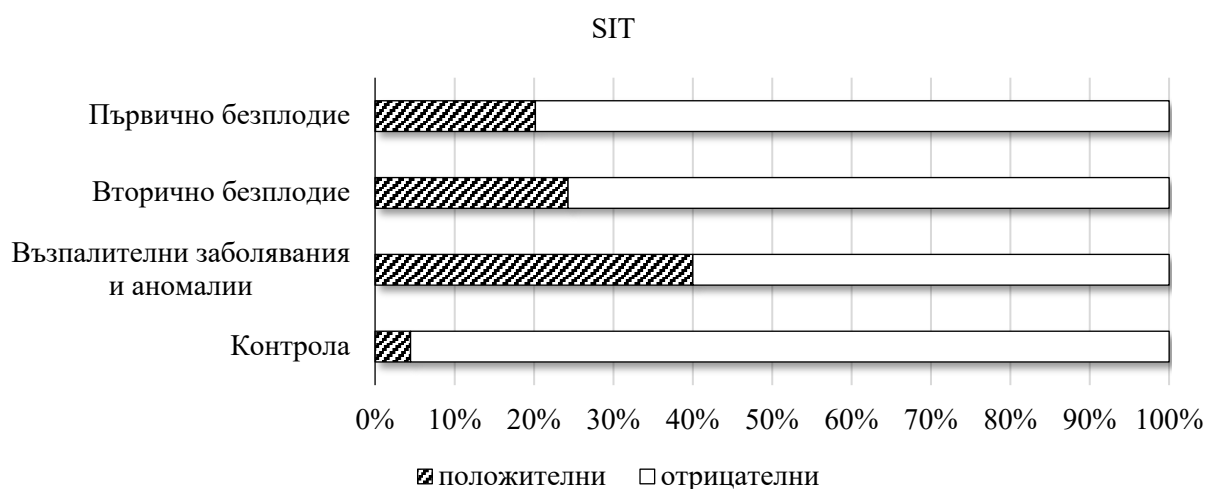
При сравнение на честотата на положителните резултати при спермоимобилизационния метод на Isojima (SIT) беше установено, че и трите

групи серуми дават статистически значима разлика с контролната група. Резултатите са представени в **Таблица 6** и **Фигура 9**.

Чрез теста на Фишер беше намерена статистически значима разлика в честотата на положителните резултати между първата и третата група ($P = 0,0031$). Разликата между втора и трета група не е значима ($P = 0,2127$).

Таблица 6. Сравнение на абсолютната и относителна честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода SIT

SIT	Брой положителни	Процент положителни	Брой отрицателни	Процент отрицателни
Първично безплодие	20	20,20%	81	79,80%
Вторично безплодие	9	24,32%	28	75,68%
Възпалителни заболявания и аномалии	8	40,00%	12	60,00%
Контролна група	5	4,46%	107	95,54%



Фигура 9. Сравнение на относителната честота на положителни резултати от спермоимобилизационния тест на Isojima – SIT при трите изследвани групи пациенти ($P < 0,05$).

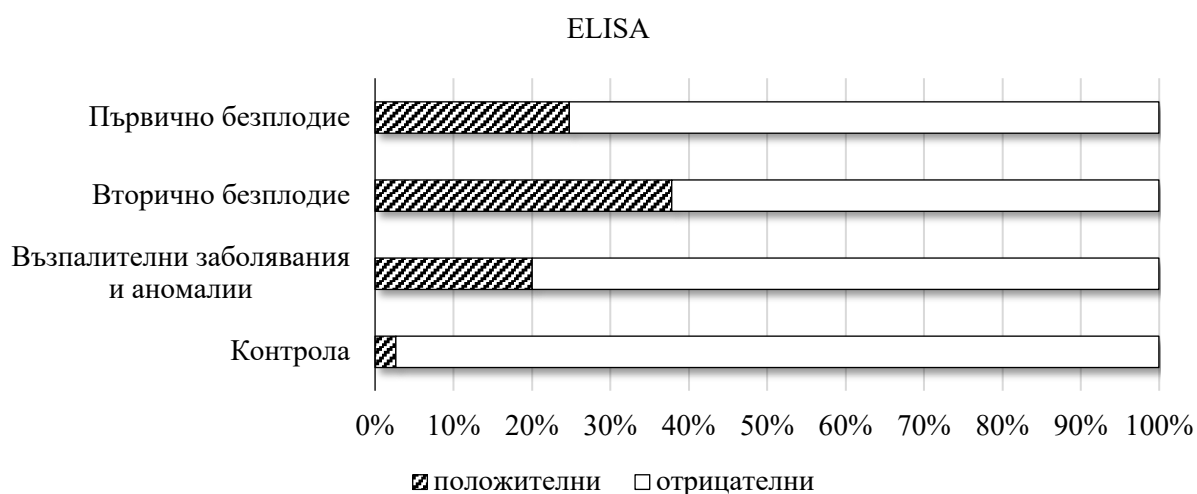
При сравнение на честотата на положителните резултати при използване на метода ELISA беше установено, че и трите групи серуми от пациенти, обособени

според диагнозата им, дават статистически значима разлика с контролната група. Резултатите от това сравнение са представени в **Таблица 7** и **Фигура 10**.

Като сравнихме данните по групи, получихме, че няма статистически значима разлика в резултатите между отделните групи серуми. При сравнение на серумите на пациенти с първичен стерилитет с тези на пациентите с възпалителни заболявания и аномалии изчислихме $P = 0,5583$, а при сравнение на серумите на пациенти с вторичен стерилитет и тези с възпалителни заболявания и аномалии получихме $P = 0,1330$. И двете стойности надхвърлят нивото на значимост (0,05).

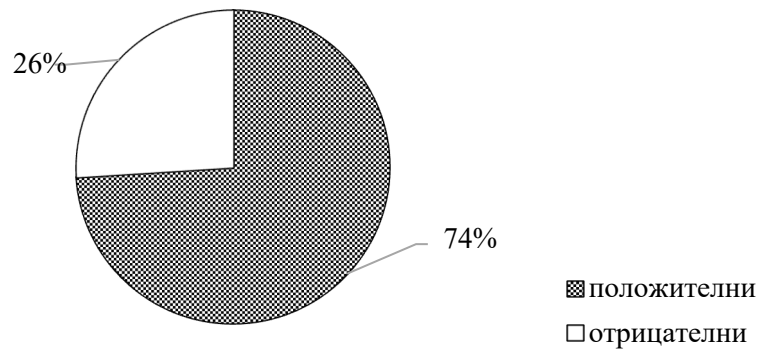
Таблица 7. Сравнение на абсолютната и относителна честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода ELISA.

ELISA	Брой положителни	Процент положителни	Брой отрицателни	Процент отрицателни
Първично безплодие	24	24,74%	77	75,26 %
Вторично безплодие	14	37,84%	23	61,16%
Възпалителни заболявания и аномалии	4	40,00%	16	80,00%
Контролна група	3	2,68%	109	97,32%



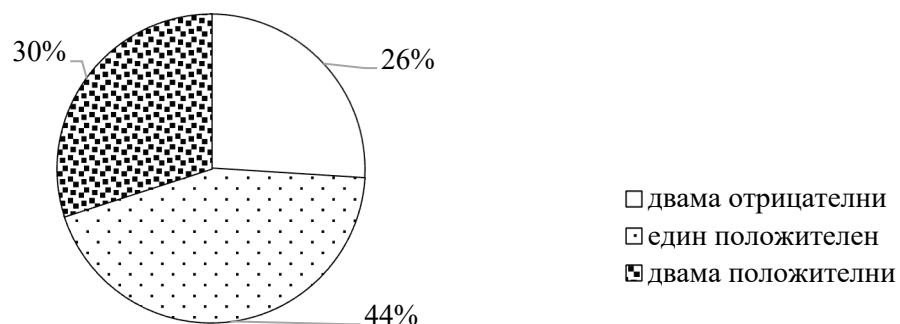
Фигура 10. Сравнение на относителната честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода ELISA ($P < 0,05$).

Изследваните 158 пациенти включват 73 семейни двойки и 12 души, които са се изследвали без партньорите си. Ако разгледаме резултатите от изследваните серуми, ще установим, че от общо 73 двойки, в 54 (74%) поне единият партньор има клинично значими стойности на ASA по поне един от методите. Съотношението е представено на **Фигура 11**.



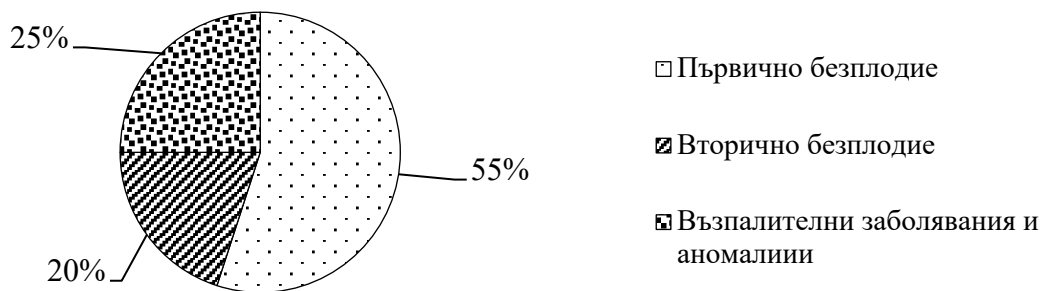
Фигура 11. Процентен дял на двойките, в които поне единият партньор показва резултати с клинично значими стойности на ASA.

Възникна въпросът в колко от двойките и двамата партньори показват положителни резултати по поне един от методите за изследване на ASA, и в колко положителен е само единият – в 32 (44%) от двойките положителни резултати има само единият партньор, а в 22 (30%) – и двамата партньори. Резултатите са отразени на **Фигура 12**.



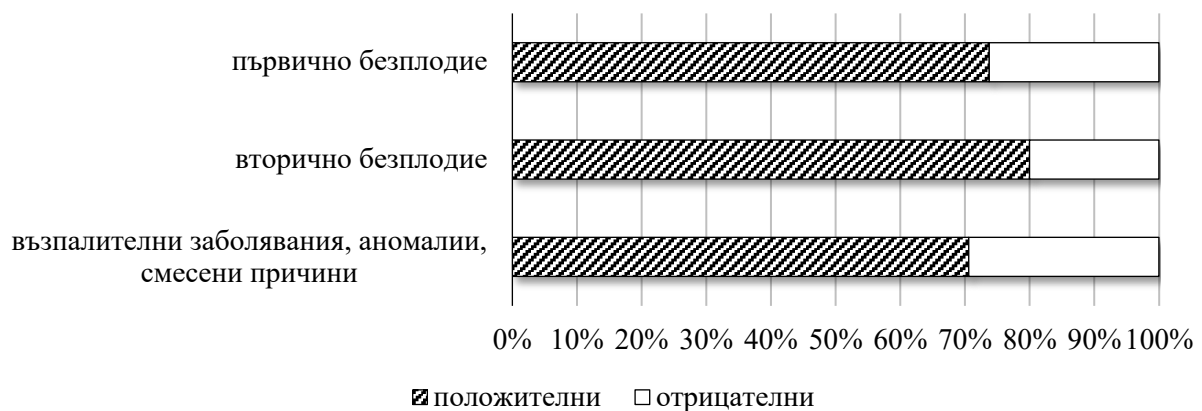
Фигура 12. Относителна честота на двойките, според това дали само при единият, или и при двамата партньори са регистрирани клинично значими стойности на ASA по поне един от използваните методи.

От 73 двойки, в 41 партньорите са с първичен стерилитет, в 15 двойки – с вторичен стерилитет и в 17 – със смесени причини за безплодие (възпалителни заболявания и аномалии у единия партньор или повече от една причина за репродуктивни неуспехи). Процентният дял на групите двойки е представен на **Фигура 13**.



Фигура 13. Процентен дял на двойките пациенти по групи според диагнозата.

При разделяне на двойките пациенти на групи според диагнозата се отчита, че при двойките с първичен стерилитет за 73,68% са регистрирани значими стойности на ASA по поне един от методите в единия партньор, а в някои двойки и в двамата. При пациентите с вторичен стерилитет процентният дял на двойките с положителни резултати за наличие на ASA достига 80%. В групата, в която единият от партньорите е прекарал възпалителни заболявания или има аномалии, свързани с репродуктивните функции, делът на двойките с клинично значими стойности на ASA е 70,56% (**Фигура 14**).



Фигура 14. Относителна честота на двойките, в които поне единият от двамата партньори показва положителни резултати при изследване на серум за ASA.

4.2. Резултати от цитогенетичните изследвания на пациенти с репродуктивни проблеми

За да се провери възможното наличие на цитогенетична причина за стерилитет, част от пациентите с репродуктивни проблеми бяха проверени за наличие на бройни и структурни хромозомни аномалии.

Кръвните проби от пациентите бяха изследвани чрез конвенционален метод за кариотипиране, проведен с G-bending след трипсинизиране.

Цитогенетичните изследвания бяха извършени в Катедрата по медицинска генетика на МУ – София, с любезното съдействие на лекари и биолози от екипа на Катедрата.

Получените резултати са показани в **Таблица 8**.

Таблица 8. Резултати от цитогенетични изследвания на инфертилни пациенти. Положителните резултати за ASA са с тъмен шрифт и подчертани. Мъжете са означени с "m", жените – с "f". Диагнозите са поставени от лекуващите лекари, насочили пациентите за изследване.

Пациент	Години	Диагноза	TAT	SIT	ELISA	Кариотип
123, ж	40	Първично безплодие от 4 г.; PCOS	4 mixed	1,0000	0,8930	Нормален женски кариотип
124, м	32	Паротит (на 23 г.) 5% подвижни сперматозоиди	8 mixed	0,9873	0,9670	Нормален мъжки кариотип
125, ж	32	Вторично безплодие от 2 г.	16 mixed	1,8800	0,5865	Нормален женски кариотип
126, м	34	Вторично безплодие	2 mixed	2,0400	0,5335	Нормален мъжки кариотип
127, ж	43	Вторично безплодие от 3 г.	< 2	0,8571	0,83525	Нормален женски кариотип

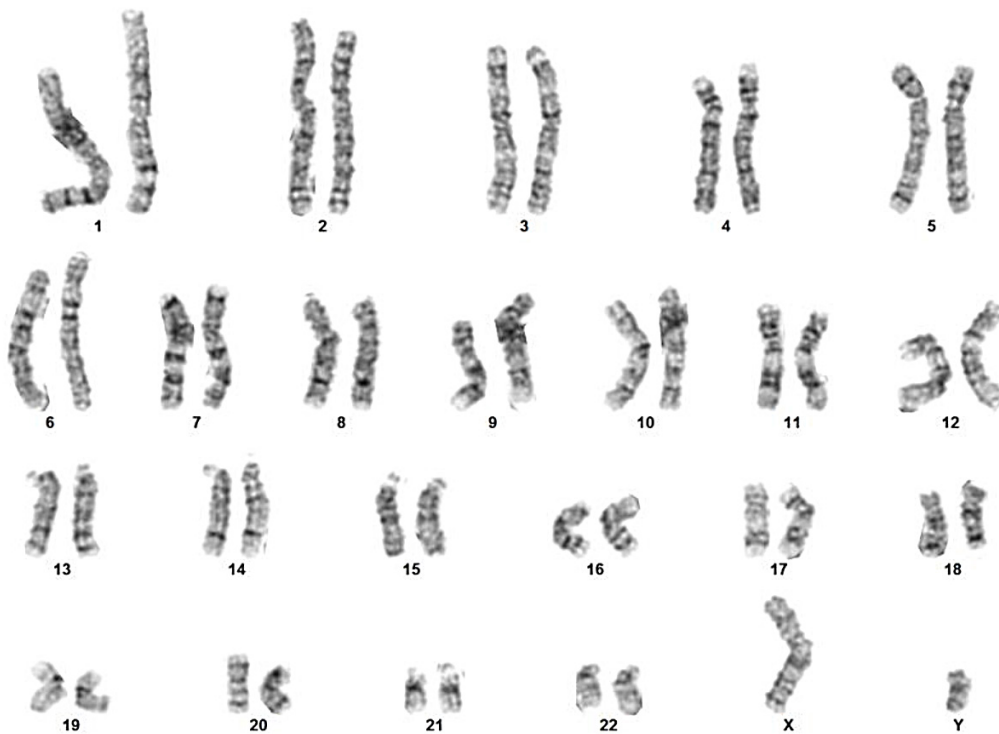
128, м	34	Вторично безплодие	< 2	1,1027	<u>0,8873</u>	Нормален мъжки кариотип
129, ж	47	Първично безплодие от 21 г.	< 2	1,1807	0,7580	Нормален женски кариотип
130, м	49	Първично безплодие олигоспермия	< 2	1,1264	0,7425	Нормален мъжки кариотип
131, ж	42	Първично безплодие	< 2	1,2895	0,753	Нормален женски кариотип
132, м	47	Първично безплодие нормозооспермия	< 2	1,1011	0,759	Нормален мъжки кариотип
133, ж	41	Вторично безплодие от 10 г., 4 спонтанни аборта	16 mixed	1,2100	0,8905	Нормален женски кариотип
134, м	48	Вторично безплодие нормозооспермия	8 mixed	1,5333	0,946	Нормален мъжки кариотип
135, ж	40	Вторично безплодие от 7 г.	8 mixed	<u>2,1818</u>	<u>0,968</u>	Нормален женски кариотип
136, м	38	Варикоцеле, един тестис	16 mixed	<u>2,0714</u>	0,9135	Нормален мъжки кариотип
137, ж	31	Първично безплодие от 6 г.; PCOS	32 mixed	<u>3,2917</u>	0,8925	Нормален женски кариотип
138, м	42	Първично безплодие нормозооспермия	64 mixed	1,0395	<u>0,945</u>	Нормален мъжки кариотип

От Таблица 8 се вижда, че според резултата от цитогенетичното изследване всички изследвани пациенти, независимо от резултата за наличие на ASA по трите основни метода, са с нормален кариотип. По анамнестични данни пациентите, на които не е направено кариотипиране, са изследвани цитогенетично в други лаборатории и резултатите също са показали нормален кариотип.

На **Фигури 15** и **16** са представени съответно метафазна пластинка и кариограма на пациент, показал положителни резултати при изследванията за ASA.



Фигура 15. Метафазна пластинка на един от пациентите с положителни резултати за ASA, избран на случаен принцип.



Фигура 16. Кариограма на пациент с висок титър на ASA, избран на случаен принцип. Цитогенетичното изследване показва нормален мъжки кариотип.

4.3. Локализация на нефосфорилиран и фосфорилиран Hsp27 в ембрионални тъкани чрез имунохистохимични методи

След приложен индиректен имунохистохимичен метод наблюдавахме степента на експресия на Hsp27 в нефосфорилираната му форма (за която по-долу се отнася означението Hsp27) и фосфорилираната му форма (означена с pHsp27).

По отношение на нефосфорилираната форма на изследвания белтък (Hsp27) установихме силна експресия в миокарда (**Фигура 17А**) и скелетната мускулатура (**Фигура 17С**). Умерена до слаба цитоплазмена експресия на Hsp27 се наблюдаваше в центровете на осификация (**Фигура 17Е**), кожа – както епидермис, така и дерма (**Фигура 17G**), гладка мускулатура на чревната стена (**Фигура 17I**), чревен епител (**Фигура 17К**). Установихме слаба цитоплазмена експресия на Hsp27 в хепатоцитите (**Фигура 17М**), енцефалона (**Фигура 17О**) и медула спиналис.

По отношение на фосфорилираната форма на белтъка (pHsp27) регистрирахме силна експресия отново в миокарда (**Фигура 17В**) и скелетните мускули (**Фигура 17D**). Силна до умерена цитоплазмена експресия на pHsp27 се наблюдаваше в центровете на вкостяване (**Фигура 17F**). Слаба до умерена експресия се отчиташе в гладката чревна мускулатура (**Фигура 17J**). В същото време отрицателна имунохистохимична реакция за фосфорилираната форма на изследвания белтък се регистрираше в кожата (епидермис и дерма, **Фигура 17Н**), чревния епител (**Фигура 17L**), черния дроб (**Фигура 17N**) и енцефалона (**Фигура 17P**).

Ядрена експресия на Hsp27 и фосфорилиран Hsp27 беше регистрирана в единични клетки на центровете на вкостяване в развиващите се кости (**Фигура 17E,F**).

В развиващите се гонади не беше установена цитоплазмена или ядрена експресия на нефосфорилиран Hsp27 (**Фигура 18 А**) и на фосфорилираната му форма (**Фигура 18 В**).

Резултатите са обобщени и представени в **Таблица 9**.

Таблица 9. Имунохистохимична оценка на цитоплазмената експресия на Hsp27 и фосфорилиран Hsp27 (pHsp27) в органи и тъкани на 8-седмичен човешки ембрион.

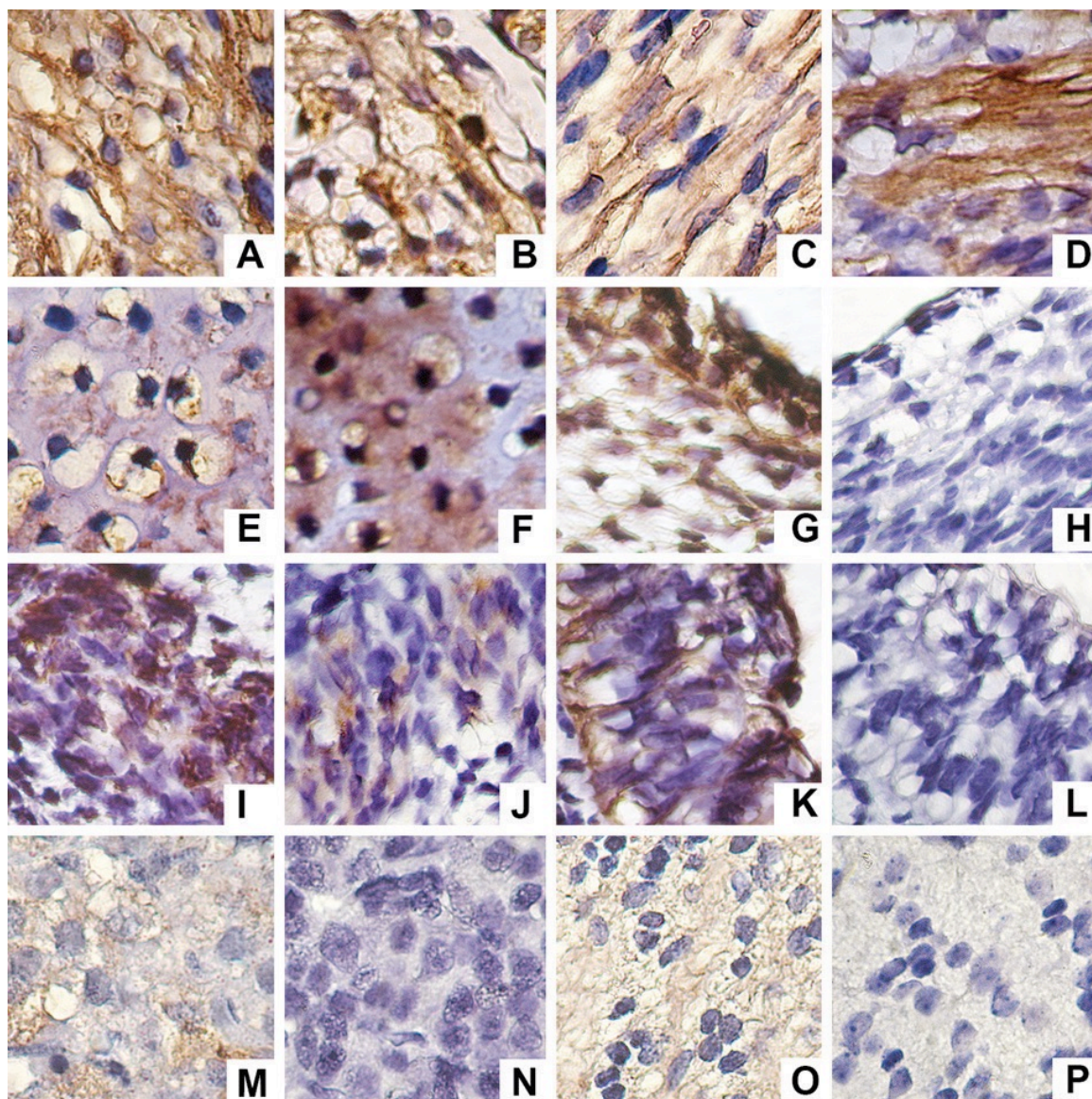
Тъкан	Hsp27	pHsp27
Скелетни мускули	+++	+++
Сърце – миокард	+++	+++
Кости / центрове на вкостяване	+	++
Гладка чревна мускулатура	+	+
Чревен епител	+	–
Мозък	+	–
Гръбначен мозък	+	–
Черен дроб	+	–
Кожа – епидермис и дерма	+	–
Хрущяли	–	–
Бял дроб	–	–
Бъбрек	–	–
Тимус	–	–
Назален епител	–	–
Надбъбречна жлеза	–	–
Гонади	–	–

+ слаба експресия

++ умерена експресия

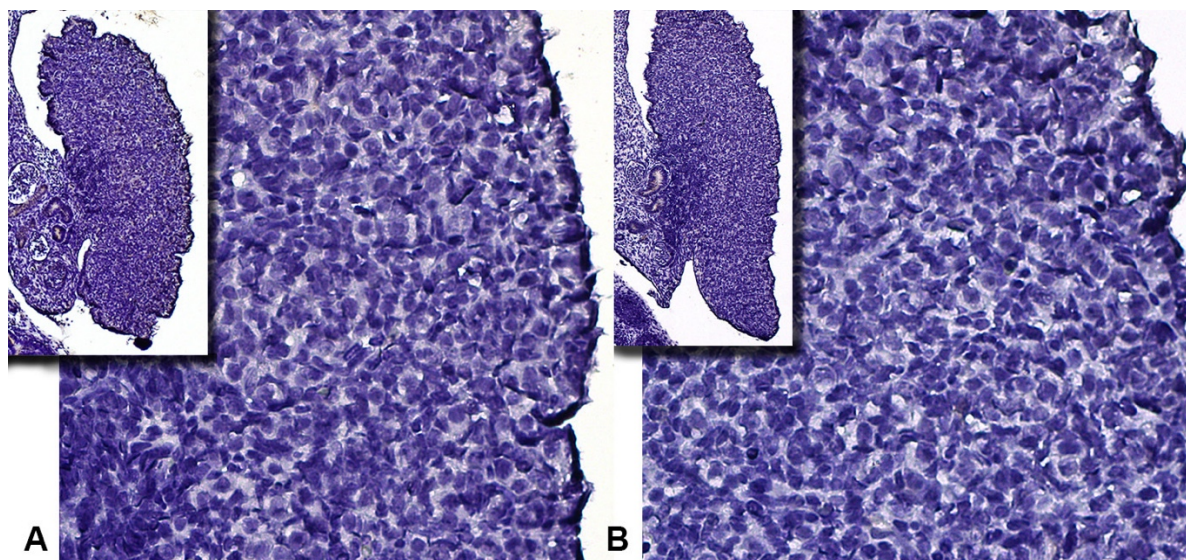
+++ силна експресия

– не се открива



Фигура 17. Експресия на Hsp27 и pHsp27 в ембрионални тъкани:

- A – силна експресия на Hsp27 в миокарда*
- B – силна експресия на pHsp27 в миокарда*
- C – силна експресия на Hsp27 в скелетни мускули*
- D – силна експресия на pHsp27 в скелетни мускули*
- E – умерена експресия на Hsp27 в центрове на вкостяване*
- F – умерена експресия на pHsp27 в центрове на вкостяване*
- G – умерена експресия на Hsp27 в кожа (епидермис и дерма)*
- H – отрицателна реакция за pHsp27 в кожа (епидермис и дерма)*
- I – умерена експресия на Hsp27 в гладка чревна мускулатура*
- J – умерена експресия на pHsp27 в гладка чревна мускулатура*
- K – умерена експресия на Hsp27 в чревен епител*
- L – отрицателна реакция за pHsp27 в чревен епител*
- M – слаба експресия на Hsp27 в черен дроб*
- N – отрицателна реакция за pHsp27 в черен дроб*
- O – слаба експресия на Hsp27 в енцефалон*
- P – отрицателна реакция за pHsp27 в енцефалон*



Фигура 18. Реакция за нефосфорилираната и фосфорилираната форма на Hsp27 в срези от ембрионална гонада.

A. Отрицателна реакция за Hsp27 в гонада.

B. Отрицателна реакция за pHsp27 в гонада.

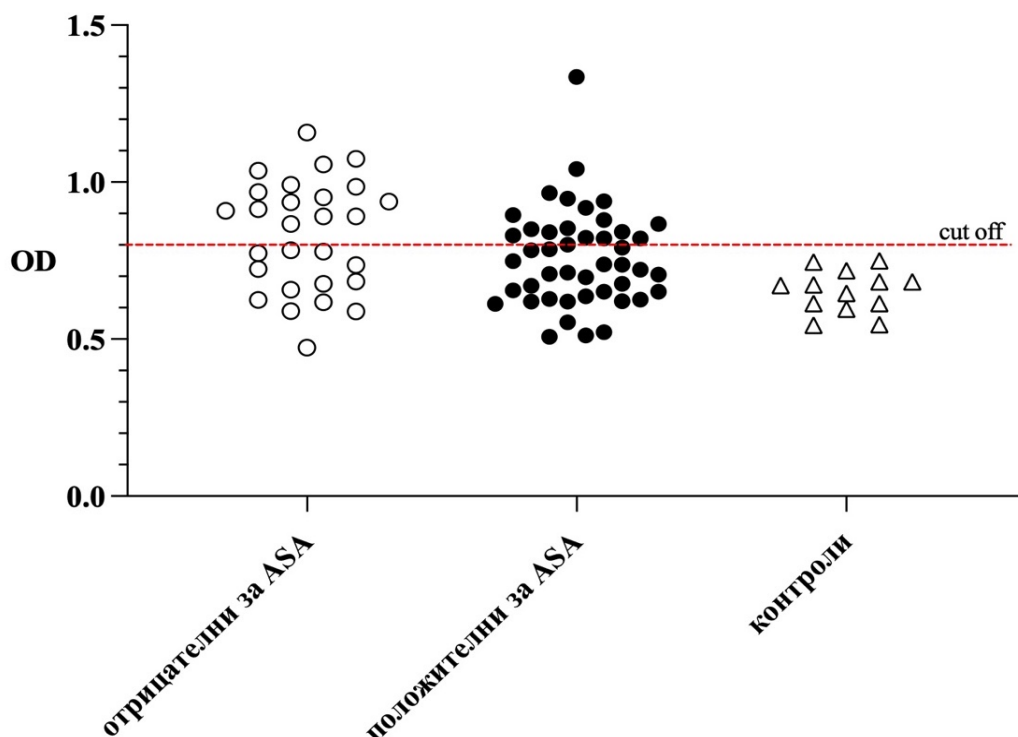
4.4. Проследяване на честотата на анти-Hsp27 антитела у пациенти с репродуктивни проблеми

Част от серумите от пациенти с репродуктивни проблеми, които бяха тествани за наличие на спермоантитела, бяха изследвани и за наличие на антитела срещу Hsp27 чрез индиректна ELISA. В това проучване бяха включени серуми на 73 пациенти, от които 35 мъже и 38 жени във фертилна възраст. 48 от тях бяха партньорски двойки (24 двойки) и са изследвани заедно, а други 25 са изследвани без партньора си.

Надпрагови стойности на анти-Hsp27 антитела бяха установени у 31 пациенти (42,5%), макар че разликите между техните измерени стойности и праговата стойност (cut off) не бяха големи. От тези пациенти 18 бяха жени и 13 – мъже.

В контролната група бяха включени 13 здрави доброволци с доказана фертилност, с подобно съотношение между мъже и жени, и от същата възрастова

група като изследваните пациенти. Всички лица от контролната група след изследването чрез ELISA показаха отрицателни резултати за наличие на анти-Hsp27 антитела. Конкретните резултати от теста са дадени на **Фигура 19**.



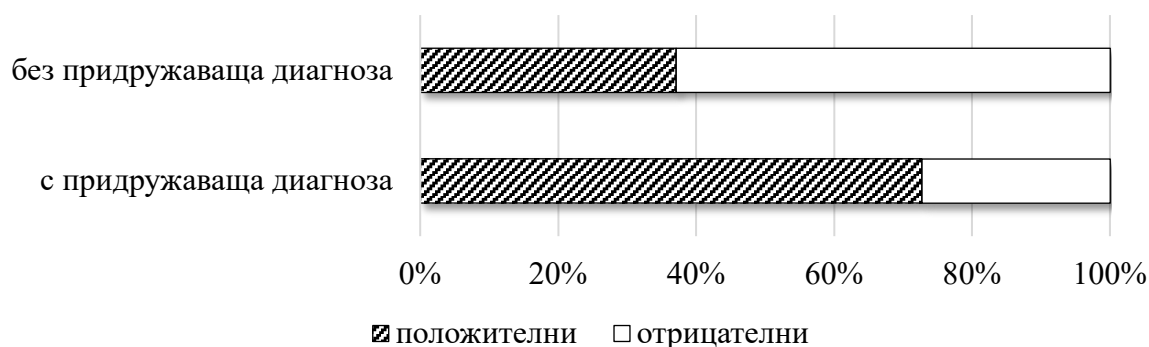
Фигура 19. Резултати от количественото определяне на анти-Hsp27 антитела в изследваните серуми. В бяло са означени пациентите, отрицателни за ASA, а в черно – пациентите, които имат положителни резултати при изследване на спермоантитела по поне един от трите метода (TAT, SIT или ELISA за ASA).

Следва да се отбележи, че от пациентите мъже с позитивен резултат за анти-Hsp27 антитела, петима имат придружаващи диагнози: 1 с варикоцеле, 1 с астенозооспермия и анамнеза за преболедуван вирусен паротит, 1 с олигоспермия, 1 с астенозооспермия, и 1 с варикоцеле, олигоспермия и анамнеза за преболедуван вирусен паротит едновременно. Двама от мъжете с негативен резултат са диагностицирани съответно с простатит (1) и с крипторхизъм (1). От жените-пациентки, положителни за анти-Hsp27 антитела, три имат съпътстващи диагнози: 2 са с PCOS и една е с ендометриоза. От пациентките с отрицателен резултат, една има ендометриоза. Данните са обобщени в **Таблица 10**.

Таблица 10. Възможна връзка между анти-Hsp27 антителата и придружаващи диагнози.

Положителни за анти-Hsp27 антитела		Отрицателни за анти-Hsp27 антитела	
Мъже (13)	Жени (18)	Мъже (22)	Жени (20)
5 с придружаващи диагнози: 1 с варикоцеле, 1 с астенозооспермия и анамнеза за паротит, 1 с олигоспермия, 1 с астенозооспермия, 1 с варикоцеле, олигоспермия и анамнеза за паротит	3 с придружаващи диагнози: 2 с PCOS, 1 с ендометриоза	2 с придружаващи диагнози: 1 с простатит, 1 с крипторхизъм	1 с ендометриоза
8 без друга диагноза	15 без друга диагноза	20 без друга диагноза	19 без друга диагноза

Обобщението на тези данни показва, че от пациентите без съпътстващи диагнози, положителни за анти-Hsp27 антитела, са 23 от общо 62 (37%), а от пациентите със съпътстващи диагнози – 8 от общо 11 (73%). Вижда се, че наличието на анти-Hsp27 антитела е по-вероятно при пациентите със съпътстващи диагнози, отколкото за тези без други диагнози (**Фигура 20**). Тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$).



Фигура 20. Процентен дял на пациентите, показали позитивен резултат за анти-Hsp27 антитела, групирани според наличие на придружаваща диагноза.

Изследването на серумите за анти-Hsp27 антитела чрез ELISA, съпоставено с данните за наличие на антиспермални антитела у същите пациенти, показва, че 46 (63%) от пациентите с безплодие са положителни за антиспермални антитела по поне един от използваните три метода, а 31 (41%) са позитивни за анти-Hsp27 антитела.

Като се съпоставят резултатите от двете изследвания, се вижда, че от 73-та пациенти 14 (19%) са положителни за анти-Hsp27 антитела, 17 (23%) са положителни за двата вида антитела (ASA и анти-Hsp27) и съответно спадат и към двете групи, а у 13 (18%) не се откриват нито ASA, нито анти-Hsp27 антитела. Тези резултати са онагледени на **Фигура 21**.



Фигура 21. Процентен дял на пациентите, положителни за антиспермални и анти-Hsp27 антитела, и съпоставяне на резултатите от двете изследвания.

От седемнадесетте серума, положителни едновременно за ASA и за анти-Hsp27, 10 бяха от жени и 7 – от мъже. Положителният резултат за ASA при тези пациенти беше отчетен съответно чрез ELISA и TAT (3 серума), ELISA и SIT (3 серума), TAT и SIT (3 серума), само ELISA (6 серум) и само SIT (2 серума). След

проведен корелационен анализ не беше установена значима корелация между наличието на ASA и на анти-Hsp27 антитела при изследваната група пациенти. Резултатите са обобщени в **Таблица 11**.

***Таблица 11.** Резултати от корелационен анализ за антиспермални и анти-Hsp27 антитела – корелационен коефициент на Spearman, показващ липса на корелация.*

Категории	Корелационен коефициент	Значимост
Положителен резултат за ASA и анти-Hsp27 антитела	0,002	0,984

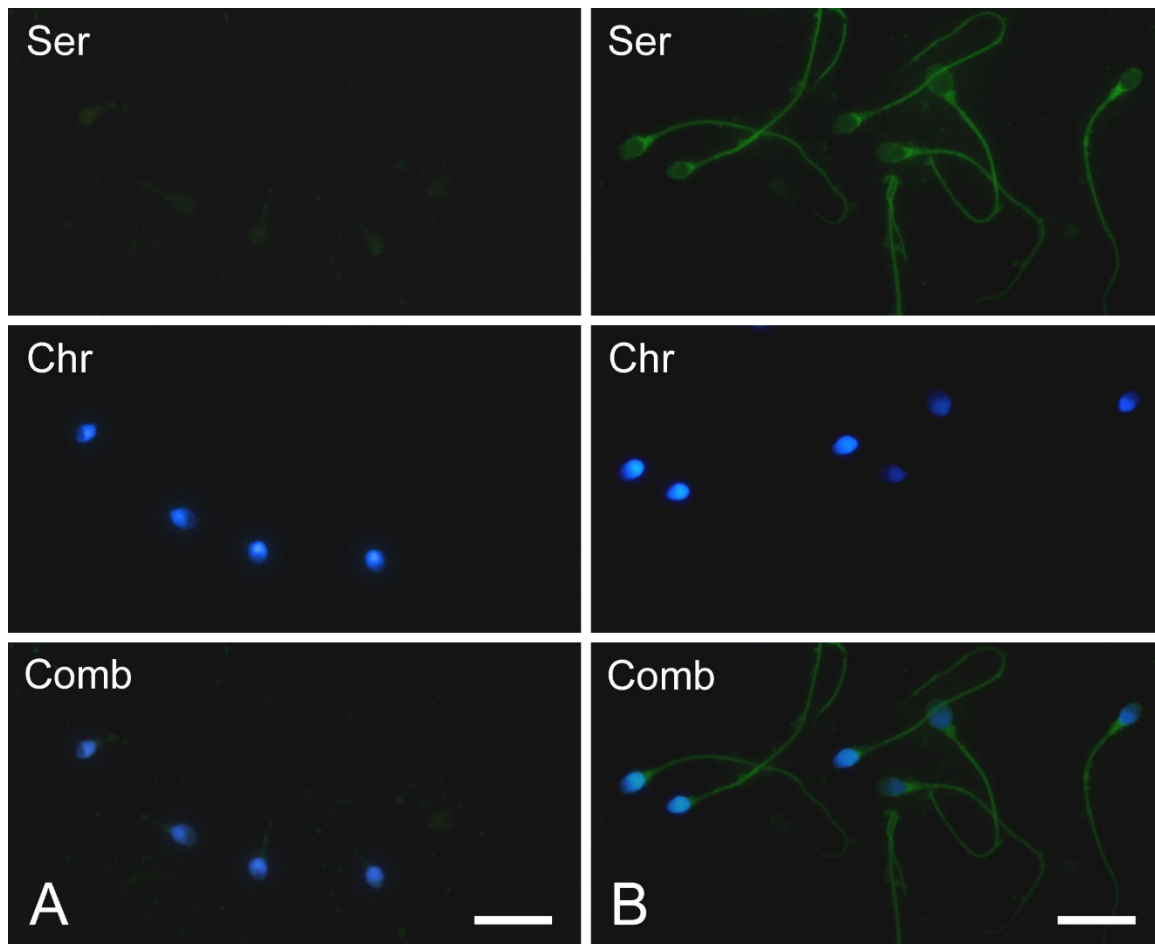
4.5. Изследване на серуми от пациенти с инфертилитет за реакция със сперматозоиди чрез имунофлуоресценция

За да установим вътреклетъчната локализация на сперматозоидните антигени, срещу които се развива хуморален имунен отговор, серуми от инфертилни пациенти с различен статус по отношение на ASA и анти-Hsp27 антителата, както и от контролни лица, бяха използвани като първи антитела в изследване чрез непряка имунофлуоресценция за евентуална реакция с нормозооспермични човешки сперматозоиди.

Всички изследвани контролни серуми дадоха отрицателен резултат, пример за който е показан на **Фигура 22А**. Серумите от пациенти, за които не бяха установени значими нива на антитела, както и серумите, оказали се положителни само за антитела срещу Hsp27, или не реагираха със сперматозоидите подобно на контролните серуми, или дадоха много слабо оцветяване.

Серумите от пациенти с безплодие, положителни за антиспермални антитела, независимо от съдържанието на анти-Hsp27 антитела, реагираха със сперматозоидната шийка, опашка или/и домен(и) от главата. Три от седемте серума, положителни едновременно за двете категории антитела (ASA и анти-Hsp27), бяха използвани за имунофлуоресценция и всички те оцветиха шийката и

опашката на сперматозоидите. Резултатът с един от тях е показан на Фигура 22В. Следва обаче да се отбележи, че и някои серуми от пациенти, положителни за ASA и отрицателни за анти-Hsp27, дадоха подобна реакция при имунофлуоресцентното изследване.



Фигура 22. Имунофлуоресцентна реакция на човешки сперматозоиди от здрав донор с човешки серуми като 1-во антитяло и FITC-белязано 2-ро антитяло (**Ser**), оцветяване на ядрата им с Hoechst 33342 (**Chr**) и съчетание от двата образа (**Comb**).

A. Отрицателен резултат, получен с контролен серум.

B. Положителна реакция в областта на шийката и опашката със серум от пациент, положителен едновременно за ASA и анти-Hsp27.

Отсечките са по 10 μm .

4.6. Изследване на отделянето на свободни кислородни радикали от неутрофили от пациенти с плеврален излив

Описаните по-горе резултати поставиха въпроса за връзката между анти-Hsp27 имунитета и инфертилитета. Едно от възможните „свързващи звена“ между тези явления е функционалното състояние на неутрофилите и отделянето от тях на свободни кислородни радикали (ROS). За да го проучим, използвахме неутрофили от периферна кръв и плеврален излив на пациенти с ексудативен плеврален излив в резултат на несвързани с инфертилитет заболявания – инфекциозни и ракови. Изолираните клетки бяха подложени на луминол-амплифицирана хемилуминесценция за измерване на количеството ROS като показател за състоянието и активността им.

При пациентите с инфекциозни заболявания в активирано състояние бяха 90% от неутрофилите в кръвта и 70% от тези в плевралния излив. При пациентите с тумори делът неутрофили в активирано състояние беше 75% и за двете проби.

Разликата между двете групи пациенти не беше значима.

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Антиспермални антитела у пациенти с репродуктивни проблеми

В хода на изследването на пациенти с репродуктивни проблеми и контроли (нормални донори) за наличие на спермоантитела в кръвния серум всеки от използваните методи – TAT, SIT и ELISA, даде положителен резултат при над 20% от инфертилните пациенти и под 5% от контролите. Двете групи се различаваха статистически значимо с $P < 0,0001$. Това показва адекватността на използваните методи и разкрива тясна връзка между наличието на значими нива на ASA и инфертилитета, която на свой ред позволява да се предполага имунологична обусловеност на безплодието поне при част от пациентите със силно изразен хуморален имунен отговор срещу сперматозоидни антигени.

От трите използвани теста SIT според някои автори има предимството да е високо специфичен, но по-малко чувствителен от спермо-аглутинационните тестове спермоаглутиниращите антитела не винаги принадлежат към комплемент-фиксиращи имуноглобулинови класове – IgM или IgG, и съответно не винаги могат да бъдат отчетени чрез SIT (Bronson et al., 1982). В нашето изследване обаче относителният дял на пациентите, положителни за спермоантитела по TAT и SIT, беше практически еднакъв (съответно 22,10% и 23,42%).

Статистическият анализ с ROC-криви показва висока специфичност и диагностична стойност и на трите използвани теста (стойности между 1 и 0,5).

В литературата данните за разлики между двата пола по отношение на образуването на спермоантитела са оскъдни и сравнението се затруднява допълнително от факта, че за отчитане на ASA при мъже и при жени обикновено се използват различни методи. Изглежда обаче, че ако съществуват разлики, те са минимални (Shibahara et al., 2022). В настоящата работа серумите от пациенти от двата пола бяха подложени на еднакви тестове за отчитане на спермоантитела. По отношение на TAT и SIT установените разлики бяха незначителни. При изследването чрез ELISA дялът на положителните серуми при жените (30,70%) беше с близо 10% по-висок от този при мъжете (24,10%). Но макар че този факт сам по себе си е интересен и очертава насоки за бъдещи проучвания, поради сравнително неголемия брой изследвани от нас пациенти (75 жени и 83 мъже) отчетената разлика не беше статистически значима.

Аналогично сравнението между пациентите с различни диагнози по отношение на наличието на аглутиниращи и имобилизиращи спермоантитела показва много по-висока честота на тези антитела при третата група пациенти – мъже с възпалителни заболявания и аномалии, свързани с възпроизводствените функции, спрямо пациентите с първичен или вторичен стерилитет. Въпреки че пациентите с възпалителни заболявания и аномалии бяха само 20 на брой, при използване на SIT наблюдаваната разлика между положителните резултати в тази група (40,00%) и групата с първичен стерилитет (18,56%) достигна статистическа значимост ($P = 0,0031$). Този резултат е важен, доколкото т. нар. имобилизиращи спермоантитела не просто пречат на подвижността на сперматозоидите, а като активират по класическия път системата на комплемента, увреждат клетъчната им мембрана чрез образування върху нея мембрано-атакуващ комплекс и така предизвикват смъртта им (Honda et al., 2024, Baldeon-Vaca et al., 2021). Данните от настоящото изследване позволяват да се предположи, че във въпросната група пациенти наличието на възпалителен, окислителен или топлинен стрес по неизяснени засега механизми води до образуване на ASA срещу повърхностни антигени на сперматозоидите, които могат да бъдат пряка причина за стерилитета. Интересно е, че същата група пациенти показва най-нисък резултат за спермоантитела при ELISA – 20,00% срещу 24,74% и 37,84% за пациентите съответно с първичен и вторичен стерилитет.

Следва да се отбележи, че макар процентът положителни за ASA серуми, установени чрез всеки отделен метод, за всяка отделна група пациенти да беше под 50%, при разглеждане на пациентите по двойки процентът положителни серуми по поне един от трите метода при поне единия от двамата партньори надхвърляше 70%, а в групата с вторичен стерилитет достигаше 80%. Този резултат показва тясна връзка между проблемите със стерилитета и наличието на спермоантитела в серума и позволява да се предположи причинна роля на спермоантителата поне при част от пациентите. При тълкуването на находките обаче е нужна предпазливост и следва да се има предвид възможността ASA в много случаи да са последица от някакво основно нарушение и да са не причина, а показател за нарушената оплодителна способност на сперматозоидите.

Предвид обсъдените по-горе разлики в процента клинично значими стойности на ASA, установени по различните методи, решихме да съпоставим

результатите от изследването на серуми от пациенти за спермоантитела по трите метода – TAT, SIT и ELISA. Доколкото в това отношение трите групи пациенти, обособени според типа стерилитет, показваха немалки разлики помежду си, включихме в сравнението само най-многобройната група, а именно пациентите с първичен стерилитет. При това се установи статистически значима корелация между наличието на антитела по TAT и SIT, но не и между TAT и ELISA или между SIT и ELISA. Корелация между нивата на аглутиниращи и имобилизиращи спермоантитела при пациенти с инфертилитет е установена и при изследвания на други автори (Uradhyaya et al., 1984; Menge and Beitner, 1989).

Общ белег на тестовете TAT и SIT е, че отчитат антитела срещу повърхностни антигени, разположени върху клетъчната мембрана на сперматозоидите. За разлика от тези два метода ELISA отчита антитела срещу антигени от всички клетъчни компартменти, поради начина, по който подхождаме при натоварването на плаките. Ако допуснем, че всички сперматозоидни антигени имат сходна имуногенност, то повечето антитела, измерени чрез ELISA в нашите условия, се очаква да бъдат насочени срещу вътреклетъчни антигени, доколкото дори в клетка с малък обем и относително голяма повърхност като зрелия сперматозоид вътреклетъчните макромолекулни компоненти са по-разнообразни и имат по-голяма обща маса от повърхностните.

Следва да се очаква антителата срещу антигени с различна локализация в клетката да се различават по своя имунологичен подтекст и значимост. Само антителата срещу повърхностни антигени, за чието отчитане са оптимизирани аглутинационните и имобилизационните тестове, могат да реагират с живи, интактни сперматозоиди в мъжкия или женския полов път, да увредят тяхната подвижност и оплодителна способност и може би дори тяхната жизненост, например като предизвикат лизиране в присъствието на системата на комплемента. Следователно хуморалният имунен отговор именно срещу такива антигени може да бъде пряк причинен фактор за инфертилитета.

От друга страна, хуморалният имунен отговор срещу вътреклетъчни сперматозоидни антигени най-вероятно е страничен резултат от смърт на голям брой сперматозоиди или (в мъжкия организъм) по-ранни сперматогенни клетки, дължаща се на други, в общия случай неизвестни фактори. Следователно спермоантителата срещу вътреклетъчни антигени, особено при липса (или по-

точно подпрагово съдържание) на спермоантитела срещу повърхностни антигени, следва да се разглеждат не толкова като вреден фактор сами по себе си, а по-скоро като показател за наличие на друг патологичен процес, увреждащ мъжките гамети и освобождаващ вътреклетъчното им съдържимо.

Сравнението на нашите резултати по отношение на наличието на ASA, регистрирани чрез трите използвани методи, показва, че различните пациенти с инфертилитет развиват различен хуморален отговор – срещу повърхостни или срещу вътреклетъчни антигени, което би могло да отразява разлики в причините за инфертилитета и ролята на отчитаните антитела. За адекватно установяване на потенциално увреждащите спермоантитела, от една страна, и на антителата, които са вторични спрямо друг патологичен процес, от друга, следва да се прилагат различни методи. ELISA е подходяща по-скоро за регистриране на спермоантителата с вторично естество, докато TAT и SIT (самостоятелно или в комбинация) са чувствителни спрямо антителата, способни пряко да увредят сперматозоидите.

5.2. Цитогенетична характеристика на изследваната група пациенти с репродуктивни проблеми

Както бе описано в раздел Литературен обзор, обсъждат се редица фактори, които могат да доведат до образуването на спермоантитела, но конкретните причини в повечето случаи остават неизяснени. Известно е, че хромозомни аномалии като инверсии и транслокации, дори да не се отразят видимо на фенотипа на своя носител, могат да доведат до субфертилитет или инфертилитет, предизвиквайки нарушения на мейозата и фрагментация на ДНК в гаметите (Rouen et al., 2013). Ние предположихме, че в някои случаи спермоантитела биха могли да се образуват в резултат на тъканна нестабилност или/и общо предразположение към авто- и изоимунитет при фенотипно здрави индивиди със структурни варианти на отделни хромозоми.

За да проверим тази хипотеза, предприехме цитогенетичен анализ на част от изследваните пациенти – 16 души (8 мъже и 8 жени). Получените кариограми обаче независимо от наличието и нивата на ASA показаха липса на видими аномалии на кариотипа. Следователно структурни хромозомни аномалии,

достатъчно големи, за да бъдат установени чрез класическо кариотипиране, не са редовна находка при пациенти с инфертилитет и ASA. На теория би могло да се допусне, че при някои мъже хромозомни аномалии водят до повишени нива на клетъчна смърт в тестиса, в резултат на което да се образуват спермоантитела. Проверката на тази хипотеза обаче би изисквала различна експериментална постановка, а именно изследване за ASA на мъже с известни кариотипни вариации.

В заключение установената липса на хромозомни аномалии в изследваната извадка изключва цитогенетичните аномалии като причинен фактор със значима честота при пациенти с инфертилитет и спермоантитела. Следователно поне в огромното мнозинство от случаите причините за образуването на ASA следва да се търсят в ненаследствени фактори като инфекции, топлинен или/и оксидативен стрес и др. Освен това липсата на видими хромозомни аномалии сред изследваните от нас пациенти може да се тълкува като довод за възможната роля на ASA като пряка причина за инфертилитета, а не само като отражение и показател на друг патологичен процес.

5.3. Експресия и локализация на Hsp27 в човешки ембрионални тъкани

Сравнителното изследване на евентуалния хуморален имунен отговор срещу Hsp27 с този срещу сперматозоидните антигени следва да започне с преглед на експресията на Hsp27 в различни органи и в частност как експресията и разпределението му в семенника се вписва в общата картина. Най-уместно е такова изследване да се проведе върху ембриони или фетуси, доколкото този ранен етап от развитието на организма е решаващ за имунологичното разграничаване между „свое“ и „чуждо“ и изграждането на имунна толерантност към собствените антигени.

Както беше изтъкнато по-горе, функциите на стресовите белтъци не са свързани само със защита от стресови фактори. Със своето участие в процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и миграция те играят в ембрионалното развитие на бозайниците важна роля, която позволява да бъдат разглеждани като модулатори на ембриогенезата. Това им участие обаче все още не е напълно изяснено (Christians et al., 2003). Разкриването на функциите им изисква

уточняване на тяхната експресия в развиващия се ембрион по време и място. Конкретно за Hsp27 има данни, че чрез антиапоптозното си действие значително допринася за пролиферацията и диференциацията по време на ембрионалното развитие (Garrido et al., 2006).

Както се очакваше въз основа на литературните данни за тъканната специфичност на Hsp27 във възрастния организъм и оскъдните съобщения за разпределението му в късни ембриони и фетуси, беше установена експресия в мускулите. Двете му форми (дефосфорилирана и фосфорилирана) се откриваха във всички мускулни тъкани – скелетна, гладка и сърдечна. По литературни данни Hsp27 участва в защитата на скелетните миобласти от окислителен стрес и вероятно има важен принос за устойчивостта на скелетните мускулни влакна спрямо ROS (Dubińska-Magiera et al., 2014). Можем да предположим, че силно изразената експресия и на двете форми на Hsp27 в скелетните мускули е свързана с бързия растеж и диференциация на мускулните влакна на този етап от ембрионалното развитие и подготовката им за осъществяване на двигателна активност.

Положителната реакция и за двете форми в ядрата на вкостяване е в съгласие с литературните данни за важността на нискомолекулните стресови протеини и в частност Hsp27 и мишия му ортолог Hsp25 за развитието на съединителната тъкан и образуването на остеобласти (Christians et al., 2003). Относно нервната тъкан нашето наблюдение за експресия на Hsp27 (в дефосфорилираната му форма) в невроните на развиващия се мозък и техните израстъци (аксони и дендрити) се съгласува с публикуваните данни за експресия на Hsp25 в телата и израстъците на неврони от развиващи се миши ембриони (Loones et al., 2000). Във възрастния човешки мозък Hsp27 не се открива (Uhlén et al., 2015), което предполага преходна стадийно-специфична експресия на определени етапи от ембрионалното развитие на нервната система. В кожата се очертава противоположна динамика на експресията на Hsp27: тя е силна при възрастни и слаба до умерена в изследваните от нас ембриони.

С оглед на темата на настоящия труд най-голям интерес представляваше реакцията за Hsp27 в развиващите се гонади. Резултатът от тяхното

имунохистохимично изследване беше отрицателен, което би могло да се обясни с недиференцираното им състояние и липсата на функционална активност в 8-седмичния зародиш. Доколкото по литературни данни Hsp27 се експресира в нормален възрастен тестис (Adly et al., 2008), получените от нас резултати за много ниска експресия в тестиса по време на пренаталното развитие предполагат активирането ѝ в неизвестен засега по-късен момент. Можем да предположим, че това най-вероятно е настъпването на пубертета, което бележи началото на пълноценната гонадна хормонална секреция и сперматогенеза и е свързано с нови стресови фактори за клетките на тестиса.

Ако настоящото изследване беше посветено на имунния отговор срещу някой от специфичните за тестиса нискомолекулни стресови протеини (Hsp9 и Hsp10), твърде ниската или липсваща експресия в тестиса по време на зародишното и феталното развитие би могла да се разглежда като фактор, който заедно с имунологичната изолация на тестиса пречи на имунната система да „опознае“ антигена като собствен и допринася за нарушаването на имунната толерантност и възникването на автоимунен отговор срещу него. Hsp27 обаче за разлика от тези свои хомолози не е тестис-специфичен протеин – той се експресира в набор от тъкани и съдържанието му е най-високо в мускулните клетки. Следователно, дори да се появява в тестиса едва след настъпването на полова зрялост, спрямо него трябва да има изградена имунна толерантност, тъй като имунната система е имала други възможности да се запознае с него. Ако определена категория пациенти с инфертилитет образуват антитела срещу Hsp27, за тази автоимунна реакция следва да се търсят причини, различни от имунологичната изолация.

5.4. Изследване на имунния отговор срещу Hsp27 при пациенти с репродуктивни проблеми

По технически причини имаме възможност да тестираме за анти-Hsp27 антитела само относително малък брой серуми от пациенти и контролни лица. Съответно настоящото изследване в това отношение неизбежно има предварителен характер и резултатите от него трябва да се разглеждат с нужната

доза предпазливост. Въпреки това големият дял пациенти с инфертилитет, у които беше установен хуморален имунен отговор срещу Hsp27, е впечатляващ. Резултатът от теста чрез ELISA за антитела срещу Hsp27 показва наличието им в серумите на инфертилни пациенти с неочаквано висока честота: положителен резултат беше регистриран при 31 от 73 пациенти (42,5%) и нито едно от 13 контролни лица (0%). С други думи, процентът серуми от изследваните пациенти, съдържащи такива антитела, беше от същия порядък като процента серуми, съдържащи значими нива на спермоантитела, които са добре известни като честа находка при репродуктивни проблеми. Въпреки предварителния си характер този резултат е впечатляващ и изключително интересен. Ако бъде потвърден при бъдещи изследвания, той би поставил дори въпроса за евентуална диагностична стойност на анти-Hsp27 антителата при инфертилитет.

По-трудно е да се правят предположения за значението на анти-Hsp27 антителата за етиологията и патогенезата на безплодието. Hsp27 нормално е вътреклетъчен белтък, недостъпен за контакт с антителата поради своята локализация в интактната клетка. В литературата обаче има съобщения, че в определени патологични случаи Hsp27 може да бъде секретирани от клетката чрез неконвенционален механизъм, включващ екзозоми (Stope et al., 2017), както и че антитела срещу него могат да се свържат с него в цитоплазмата, след като бъдат интернализирани чрез ендоцитоза, и да причинят смъртта на клетката чрез апоптоза (Tezel and Wax, 2000).

Доколкото ни е известно, преди настоящия труд анти-Hsp27 антителата при инфертилитет не са изследвани. Различни колективи обаче са установили такива антитела при редица други състояния. Малко количество „естествени“ анти-Hsp27 антитела се откриват в серуми на здрави хора. Повишаване на концентрацията им в серума, както и на съдържанието на самия Hsp27, е отчетено при пациенти с ракови заболявания. Авторите го обясняват с усилване на експресията на този стресов белтък в туморните клетки поради предимството, което им осигурява анти-апоптозното му действие (Homaei-Shandiz et al., 2016). Неотдавна е установено повишено съдържание на анти-Hsp27 антитела при пациентки с тумори, засягащи отдели на женската репродуктивна система – ендометриума и цервикса (Bodzek et al., 2021). Подобно повишаване на серумните нива както на Hsp27, така и на антителата срещу него е установено при глаукома.

Нещо повече, имунизацията на гризачи с Hsp27 води до промени в очите им, наподобяващи глаукома (Grotegut et al., 2020). Повишени титри на анти-Hsp27 антитела са измерени и при лица, страдащи от затлъстяване (Kargari et al., 2017). Освен това се съобщава, че тези антитела се повишават успоредно с възрастта и кръвното налягане (Shams et al., 2008) и са в увеличено количество при пациенти с остър коронарен синдром (Ghayour-Mobarhan et al., 2008). Други автори обаче парадоксално откриват по-ниски нива на Hsp27 и антитела срещу него при пациенти със сърдечно-съдови заболявания в сравнение със здравите контроли. Предложеното обяснение за това явление е, че анти-Hsp27 антителата имат предпазващ ефект срещу възпаление и образуване на плаки. Тази своя хипотеза, основана на данни от изследвания на пациенти и здрави контроли, авторите проверяват експериментално в съответно разработен миши модел (Raizman et al., 2013; Shi et al., 2020).

Предвид разнообразието от обстоятелства, в които е установено развитие на хуморален автоимунен отговор срещу Hsp27, беше логично да допуснем, че в част от изследваните от нас пациенти по някаква причина са възникнали анти-Hsp27 антитела. Наличието им, съчетано с интернализация по описания от Tezel and Wax (2000) ендоцитозен механизъм, би могло да доведе до нарушение на функцията на Сертолиевите клетки. Тяхното засягане на свой ред би довело до пробив в кръвно-тестисната бариера и оттам нарушаване на имунологичната привилегия на органа и протективната му микросреда за мейотичните и постмейотични сперматогенни клетки. Освен това, макар Hsp27 поначало да е вътреклетъчен белтък, има данни, че при определени обстоятелства той може да се експресира и на клетъчната повърхност (Vausero et al., 2004). Това би позволило антителата срещу него пряко да увредят клетките, които го експресират – както Сертолиеви, така и незрели герминативни клетки. Следователно протективната функция на Hsp27 спрямо гаметите, дължаща се на важната му антиапоптозна и антистресова роля, се губи при наличие на имунен отговор срещу него – нещо повече, той започва да вреди на експресиращите го клетки, като ги превръща в мишена за антителата. След като незрелите и зрели мъжки гамети в резултат на загубата на имунологична изолация бъдат изложени на действието на имунната система, могат да се образуват и антитела срещу сперматозоидни антигени.

Описаната работна хипотеза е представена схематично на **Фигура 23** като поредица от предполагаеми причинно-следствени връзки, чието осъществяване би могло да доведе до имунологично обусловено безплодие.

От друга страна, можем да предположим, че инфертилитетът е свързан с гонаден стрес, който води, първо, до повишена експресия на Hsp27 в незрелите гаметите и соматичните клетки на гонадите, и второ, до повишени нива на клетъчна смърт на тези Hsp27-положителни клетки, което освобождава Hsp27 в телесните течности и води до производство на антитела срещу него. С оглед на тази възможност е интересно неотдавнашното съобщение на Henriques et al. (2023) за наличие на Hsp27 в сперматозоиди на пушачи. Възможно е също така инфертилитетът при голяма част от пациентите да е свързан със стресови фактори, които да не са ограничени в гонадите, а да засягат организма като цяло и съответно да повишават експресията на стресови белтъци в различни тъкани. Тези явления обаче излизат извън рамките на настоящия труд и тяхното изясняване следва да бъде предмет на по-обширни бъдещи изследвания.



Фигура 23. Работна хипотеза за ролята на анти-Hsp27 антителата в етиопатогенезата на имунологично обусловеното безплодие.

5.5. Клетъчна локализация на антигените, разпознавани от антитела от пациенти с репродуктивни проблеми

Горното предложено обяснение за връзката между анти-Hsp27 антителата и инфертилитета предполага, че имунната система разпознава Hsp27 „като такъв“, без да реагира кръстосано с друг антиген. Това е логично, доколкото в литературата не се съобщава за кръстосана реакция между Hsp27 и молекули на патогени, каквато е известна за някои други стресови белтъци. Възможно е обаче да се допусне такава реакция с определени протеини, които са нормални компоненти на семенника. Въз основа на това изградихме втора работна хипотеза, която не изключва първата. Тя се основава на присъствието в тестиса на тъканно-специфичните белтъци HspB9 и HspB10, които като членове на семейството на нискомолекулните стресови протеини са хомолози на Hsp27. Би могло да се допусне, че молекулната хомология между тези стресови белтъци се изразява и в антигенно сходство, способно да доведе до кръстосана реактивност.

В частност HspB10 (ODF1) е структурен компонент на външните плътни нишки от опашката на късните сперматогенни клетки (удължени сперматиди и сперматозоиди), необходими за механичната устойчивост и постъпателното движение на сперматозоида, както и на т. нар. ивичести колони, ключови за прикрепването на главичката към опашката. Тези цитоскелетни образувания се отличават с висока механична и физикохимична устойчивост и издържат на въздействието на фактори, които разрушават повечето други структури на сперматозоида, включително осевия му апарат (Markova, 2004). Чрез електронно-микроскопски изследвания върху некрозооспермични сперматозоиди е установено, че те могат да се запазят дълго след смъртта на съдържащите ги клетки (Markova et al., 2011). Тези особености на външните плътни нишки и ивичестите колони правят сравнително вероятно техни компоненти да предизвикат авто- или изоимунен отговор. С оглед на това предположихме, че е възможно анти-Hsp27 антителата в някои случаи да са кръстосано реагиращи спермоантитела, насочени срещу HspB10. Поради вътреклетъчната локализация и цитоскелетната функция на този белтък антителата срещу него не се очаква да навредят на сперматогенните клетки и следва да се разглеждат не като причина за

инфертилитета, а по-скоро като негова последица – резултат от мащабна смърт на сперматиди или сперматозоиди, освободила антигените им.

Пълноценната експериментална проверка на тази работна хипотеза изисква анализ на серуми от голям брой инфертилни пациенти с набор от методи, т.е. изследване, много по-подробно от настоящото. Индиректната имунофлуоресцентна реакция на серуми от пациенти и контролни лица със сперматозоиди обаче предостави интересни предварителни данни. Серумите от всички изследвани контролни лица и от пациенти с отрицателен резултат по трите използвани метода за отчитане на ASA (TAT, SIT и ELISA), показаха отрицателна или много слаба имунофлуоресцентна реакция, както и следваше да се очаква. Това важеше и за пациентите, положителни за анти-Hsp27 антитела, но отрицателни за спермоантитела. Следователно кръстосаната реактивност между Hsp27 и сперматозоидни антигени, ако съществува, не е всеобщо явление. От методична гледна точка следва да се отбележи доброто съответствие между отчитането на ASA чрез индиректна имунофлуоресценция и чрез другите три използвани метода (TAT, SIT и ELISA).

Интересен резултат дадоха серумите от пациенти с инфертилитет, положителни за ASA по поне един от използваните методи. Серумите, положителни само за ASA, но не и за анти-Hsp27 антитела, реагираха с различни домени на сперматозоида. Серумите, „двойно положителни“ за ASA и анти-Hsp27, неизменно оцветяваха сперматозоидната шийка и опашка, т.е. домените, в които се разполага HspB10 (ODF1). Този резултат позволява да предположим, че при част от инфертилните пациенти, чиито серуми реагират както с Hsp27, така и със сперматозоидни антигени, наистина е налице кръстосана реактивност между Hsp27 и HspB10. Задълбочената проверка на тази работна хипотеза обаче изисква по-мащабни бъдещи изследвания, които да установят недвусмислено молекулната идентичност на белтъците, разпознавани от серумните антитела на пациентите с инфертилитет.

Възможно е и друго обяснение за реакцията на серумите, положителни едновременно за ASA и анти-Hsp27, с тубулин-съдържащите домени на сперматозоида – шийката и опашката. Както беше споменато в литературния

обзор, нискомолекулните стресови белтъци при други клетки имат функцията да се свързват с микротубулите и да предпазват тубулина от денатурация (Day et al., 2003). Това обяснение обаче ни се струва по-малко вероятно с оглед на постепенното намаляване на Hsp27 с напредване на сперматогенезата, така че в нормални зрели сперматозоиди наличието му не може да бъде установено с обичаните методи (Adly et al., 2008).

5.6. Възможен механизъм на действие на Hsp27 и антителата срещу него в патогенезата на инфертилитета

Възможните причинно-следствени връзки между стреса, експресията на Hsp27 и реакцията на имунната система срещу него включват и по-сложни и непреки механизми. В това отношение не трябва да се изключва роля на неутрофилите, които имат важно значение за защитата от бактериални инфекции, възпалителните процеси и определени реакции на свръхчувствителност.

Повишените нива на антитела срещу Hsp27 биха могли да отразяват усилена експресия на белтъка в условия на стрес с последващото му освобождаване в извънклетъчна среда в резултат на смъртта на синтезиращите го клетки. Инфекциите и възпалителните реакции са стресови фактори, способни да задействат такава верига от събития. Очаква се при инфекция синтезът на Hsp27 в неутрофилите да се засили, тъй като той е нужен за активацията им, има антиапоптозно действие и регулира хемотаксиса и екзоцитозата им (Rane et al., 2003; Jog et al., 2007). В случай на инфекциозно заболяване възниква възпалителна реакция и се отделя IL-1, който активира неутрофилите и ги привлича към мястото на възпаление. Тъй като активирането им е свързано с експресия на Hsp27, вътреклетъчното му съдържание се повишава. Доколкото неутрофилите са крайно диференцирани клетки с къс живот, не след дълго те загиват и Hsp27 се освобождава. Повишеното му количество в извънклетъчните течности може да предизвика образуване на антитела срещу него. По-горе бяха цитирани литературни данни, че при други състояния се наблюдава корелация между серумните нива на анти-Hsp27 антителата и на самия Hsp27 (Grotegut et al., 2020; Shi et al., 2020), което позволява да се предположи, че тези антитела корелират с достъпното за имунната система количество на самия антиген (т.е. Hsp27).

Следователно значимите нива на анти-Hsp27 антителата в серума биха могли да бъдат показател за активирано състояние на неутрофилите, свързано с инфекция или/и възпаление.

При пациенти с инфертилитет в историята на състоянието им често присъства инфекция на половите пътища или дори на самите полови жлези. В резултат от нея възниква локално възпаление. Молекулни сигнали, свързани с възпалението, както и съдържащи формилметионин пептиди, отделени от самите патогени, привличат към засегнатия орган чрез хемотаксис левкоцити от кръвта, особено най-многобройната тяхна клетъчна популация – неутрофилите (Metzemaekers et al., 2020). Вследствие на тези патологични процеси неутрофилите, нормално ограничени в кръвообращението, инфилтрират гениталния тракт и в някои случаи дори самите гонади (Hedger, 2010; Michel et al., 2015).

Известно е, че във фагозомите на полиморфонуклеарните гранулоцити след активирането им се образуват агресивни кислородни радикали (активни форми на кислорода, ROS) – супероксиден анион O_2^- , водороден пероксид H_2O_2 , хидроксилен радикал $\cdot OH$, хипохлориста киселина $HOCl$ и синглетен кислород 1O_2 (Kirchner et al., 2012). Отделянето на ROS е основен механизъм, чрез който активността на неутрофилите уврежда оплодителната способност на сперматозоидите.

При нормални обстоятелства, съществува равновесие между генерираните свободни кислородни радикали и антиоксидантите. Сперматозоидите разполагат със сложна ензимна система за антиоксидантна защита, основана на пентозофосфатния път, глутатион-редуктазата и глутатион-пероксидазата (Williams et al., 2004). В случаите на инфекция и активиране на левкоцитите обаче количеството на ROS се увеличава до степен повече да не може да бъде контролирано от антиоксидантите в секретирания флуиди. Мембраната на сперматозоида е богата на полиненаситени мастни киселини. Това е необходимо за двигателната му способност, осъществяването на акрозомна реакция и сливането му с мембраната на яйцеклетката, но в същото време прави мембраната твърде уязвима за ROS. Като предизвикват промени в химичния състав на мембраните, свободните кислородни радикали възпрепятстват процесите на мембранна фузия при оплождането.

Друга важна особеност на зрелите сперматозоиди с оглед на окислителния стрес е, че те имат минимално количество цитоплазма. Това прави тяхната ДНК много податлива на ROS. Основният тип увреждане е окисляване на 2'-дезоксигуанозина (нормалната форма) до 8-ОН-2'-дезоксигуанозин, който при последваща репликация се свързва с тимин вместо с цитозин и това причинява субституции на нуклеотиди (Cheng et al., 1992). По този начин ROS могат да доведат до точкови генни мутации, които при евентуално оплождане да попречат на нормалното развитие на получените ембриони.



Фигура 24. Участие на неутрофилите в механизма на индуциране на инфертилитет при инфекции на мъжкия генитален тракт. PMN – полиморфонуклеарен неутрофил, M – макрофаг, ROS – свободни кислородни радикали, IL-1, IL-8 – интерлевкини. По Comhaire et al. (1999) с изменения.

Освен свободни кислородни радикали, активираните неутрофили отделят и IL-8, за който има данни, че повлиява отрицателно оплодителната способност на сперматозоидите. Свободни кислородни радикали и IL-8 биха могли да отделят и макрофагите (Comhaire et al., 1999; Comhaire and Mahmoud, 2013). ROS са установени в семиналната плазма и флуидите, секретирани в половите пътища, и съдържанието им е в права зависимост от съдържанието на левкоцити в еякулата (Oborna et al., 2009).

Фигура 24 показва как гореописаната предполагаема верига от събития може да доведе до увреждания на сперматогенните клетки и зрелите сперматозоиди в мъжкия индивид и така да доведе до стерилитет. В женския организъм по подобен начин биха могли да бъдат увредени овоцитите и ембрионите, както и сперматозоидите по време на придвижването им в женските полови пътища и капацитацията.

За да проверим някои предпоставки за гореописания модел, ние изследвахме неутрофили от пациенти със заболявания, несвързани с инфертилитета, чрез хемилуминесценция, както е описано в Lazarov et al. (2016). Използваният метод оценява функционалното състояние на неутрофилите по количеството образувани в тях свободни кислородни радикали (ROS). Резултатите показаха активирано състояние на по-голямата част от неутрофилите при пациенти с инфекциозни и дори с неинфекциозни (ракови) заболявания. Тези активирани неутрофили произвеждаха ROS и следователно имаха потенциал за увреждане на нормалните клетки. С оглед на тези резултати описаният хипотетичен модел, предполагащ ключова роля на неутрофилите за патогенезата на инфертилитета, особено при положителни за анти-Hsp27 пациенти, изглежда не само интересен, а и твърде вероятен.

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводи

1. Всеки от използваните методи за отчитане на спермоантитела показва положителни резултати при над 20% от изследваните инфертилни пациенти от двата пола и под 5% от контролните лица, като разликите бяха статистически значими.

2. Съществува корелация между положителния резултат за спермоантитела срещу повърхностни антигени, отчетен чрез спермоаглутинационен и спермоимобилизационен метод.

3. Огромното мнозинство от пациентите с инфертилитет, включително положителните за наличие на спермоантитела, притежават нормален кариотип без видими цитогенетични аномалии.

4. Нискомолекулният стресов протеин Hsp27 по време на нормалното развитие се експресира предимно в мускулни тъкани и не показва забележима положителна реакция в тестиса.

5. В серума на пациентите с инфертилитет с висока честота се откриват антитела срещу нискомолекулният стресов протеин Hsp27.

6. Имуноцитохимичната реакция на серуми от пациенти, положителни едновременно за антитела срещу Hsp27 и сперматозоидни антигени, със сперматозоиди от здрав донор, се локализира в шийката и опашката, което може да се обясни с кръстосана реактивност със съдържащия се в тези участъци сроден нискомолекулен стресов протеин HspB10.

Приноси

Принос с потвърдителен характер:

1. Извадка от инфертилни пациенти от българската популация е характеризирана по отношение на наличието на спермоантитела, отчетени по три различни метода, и връзката му с пола и диагнозите на пациентите.

Приноси с научно-теоретичен характер:

2. Описана е експресията и локализацията на нискомолекулният стресов протеин Hsp27 във фосфорилираната и дефосфорилираната му форма в човешки ембрионални тъкани.

3. При съществен дял от пациентите с инфертилитет е установено наличие на серумни антитела срещу Hsp27.

4. Създадени са модели, обясняващи връзката между имунния отговор срещу Hsp27 и инфертилитета.

НАУЧНА АКТИВНОСТ, СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИЯТА

Списък на публикациите:

1. Kavaldzhieva, K., Mladenov, N., Markova, M., & Belemezova, K. (2025). Mesenchymal stem cell secretome: potential applications in human infertility caused by hormonal imbalance, external damage, or immune factors. *Biomedicines*, 13(3), 586. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030586> Q1 IF 3,9
2. Bechev, B., Magrisso, M., Stoeff, S., Kavaldzhieva, K., & Glogovska, P. (2019). Functional states of neutrophils in systemic circulation, microcirculation and inside of pleural effusions. *Series on Biomechanics*, 33(1), 41–50. http://jsb.imbm.bas.bg/page/en/details.php?article_id=317&tab=en Q4 SJR 0,197
3. Kavaldzhieva, K., Buteva-Hristova, I., Marinova, D., Pencheva-Demireva, M., Mladenov, N., Lazarov, V., Markova, T., Trifonova, N., & Dimitrova-Dikanarova, D. (2019). Expression of HSP27 and phosphorylated HSP27 in 8 weeks old human embryo. *Acta Morphologica Et Anthropologica*, 26(3–4), 26–33. <https://www.iempam.bas.bg/journals/acta/acta26b/26-33.pdf>

Участия в научни прояви:

1. Kavaldzhieva, K., Dimitrova-Dikanarova, D., Lazarov, V., Kolarov, A., Mladenov, N. Correlation between presence of agglutinating and immobilizing anti-sperm antibodies in sera of infertile patients. Климентови дни, София, 2022 г.
2. Кавалджиева, К., Бътева-Христова, И., Маринова, Д., Пенчева-Демирева, М., Младенов, Н., Лазаров, В., Маркова, Ц., Трифонова, Н., Димитрова-Диканарова, Д. Сравнително проучване върху експресията на HSP27-фосфорилирана и нефосфорилирана форма, в 8-седмичен човешки ембрион. XIII научна конференция по медицинска биология, Варна, 2019.
3. Димитрова-Диканарова, Д., Кавалджиева, К., Пенчева-Демирева, М., Младенов, Н., Лазаров, В. Тенденции в честотата на безплодието, свързано с образуването на спермоантитела, в българската популация. XIII научна конференция по медицинска биология, Варна, 2019.
4. Kavaldzhieva, K., Lazarov, V., Buteva-Hristova, I., Marinova, D., Mladenov, N., Pencheva-Demireva, M., Dimitrova-Dikanarova, D. Comparative study of the expression of small heat shock proteins in human embryo and fetus. 5th национален конгрес по имунология, Пловдив, 2018.
5. Kavaldzhieva, K., Lazarov, V., Mladenov, N., Marinova, D., Dimitrova, D. Expression of Hsp27 and α -crystalline in human embryo and fetus. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, 2018.
6. Lazarov, V., Kavaldzhieva, K., Mladenov, N., Pencheva, M., Dimitrova-Dikanarova, D., Gateva, A., Kamenov, Z. Humoral immune response against anti-alpha crystallins in women with endocrine disorders. 15th International Symposium for Immunology of Reproduction, Varna, 2018.

БЛАГОДАРНОСТИ

Най-сърдечно благодаря на моите научни ръководители, проф. д-р Димитрина Димитрова-Диканарова, и доц. Майя Маркова, за това, че ме обучаваха и напътстваха, за споделените знания и умения.

Благодаря на колегите от Катедрата по биология, които ме подкрепяха, на колегите от Катедрата по физика и биофизика и Катедрата по генетика за предоставената възможност за съвместна работа!

Благодаря на всички мои учители!