МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ

Владислав Владимиров Лазаров

ХУМОРАЛЕН ИМУНЕН ОТГОВОР СРЕЩУ АНТИГЕНИ В ИМУНОЛОГИЧНА ИЗОЛАЦИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РЕПРОДУКТИВНИ ПРОБЛЕМИ

Дисертация

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 К. Димитрова-Диканарова, дм

проф. д-р. Недка Л. Трифонова, дм

София, 2017

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията 4
ВЪВЕДЕНИЕ 6

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 8
1. **Имунологично изолирани антигени и тяхната имуногенност** 8
1.1. Сперматозоидни антигени 9
1.2. Стресови протеини 13
1.2.1. Високомолекулни стресови протеин 15
1.2.2. Нискомолекулни стресови протеини 16
1.2.3. Експресия на Hsp в репродуктивните органи и тъкани 17
1.2.3.1. Hsp и образуване на полови клетки 20
1.2.3.2. Hsp и сперматогенеза 20
1.2.3.3. Hsp и овогенеза 21
1.2.3.4. Hsp и ембрионално развитие 22
2. Изследвания върху хуморалния имунен отговор срещу имунологично изолирани антигени 23
2.1. Изследвания върху хуморалния имунен отговор срещу сперматозоиди и ролята им в репродуктивната патология 23
2.2. Хуморален имунен отговор срещу нискомолекулни стресови протеини и участието им като антигени в имунопатологията 27
2.2.1. Роля на Hsp при имунологично обусловено безплодие 28
2.3. Hsp и ендокринни заболявания, свързани с инфертилитет 30

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 36

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 37
Материали 37
1.1. Опитни животни 37
1.2. Антигени 37
1.3. Антитела 37
1.4. Материали от човек 38
2. Методи 39
2.1 Приготвяне на водно-солеви екстракти от очни лещи 39
2.2. Хроматографско изолиране на фракции от водно-солеви екстракти на човешки очни лещи 40
2.3. Имунизация на зайци за получаване на хиперимунен серум срещу алфа кристалини 40
2.4. Определяне на белтъчно съдържание на екстракти 41
2.5. Имунохистохимична оцветяваща техника 41
2.6. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA) 43
2.7 Методи за доказване на антитела срещу сперматозоиди 45
2.7.1. Спермоаглутинационни тестове 46
2.7.2. Аглутиниращ тест на Фриберг (TAT) 47
2.7.3. Спермоимобилизиращ тест на Изожима (SIT) 47
2.8. Двойна имунодифузия по Ухтерлони 48
2.9. Абсорбиране на заешки имунен серум със суха човешка кръвна плазма 49
2.10. SDS-PAGE 49
3. Western блот 51

IV. РЕЗУЛТАТИ 53

Изолиране на алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и на човека очни лещи чрез физико-химични методи (гелна хроматография) 53
2. Получаване и характеризиране на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски пречистения алфа-кристалин на свинска очна леща 57
2.1. Определяне титъра на серума 57
2.2. Оценка на специфичността на серума и довеждането му до моноспецифичност 58
3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани 61
3.1. Проследяване експресията на алфа-кристалини чрез двойна имунодифузия по Ouchterlony 61
3.2. Проследяване експресията на алфа-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани 63
3.2.1. Експресия на нефосфорилиран алфа-кристалин в тъкани на 8 седмичен ембрион 63
3.2.2. Експресия на фосфорилиран алфа-кристалин в тъкани на 8 седмичен ембрион 64
3.2.3. Експресия на нефосфорилиран алфа-кристалин в тъкани на фетус 65
3.2.4. Експресия на фосфорилиран алфа-кристалин в тъкани на фетус 65
Приложение – микроскопски снимки от тъкани на ембрион и фетус 66
4. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация 68
4.1.Изследване на хуморалния имунен отговор с/у сперматозоидни антигени 68
4.2. Изследване на хуморалния имунен отговор срещу алфа-кристалини в пациенти с репродуктивни проблеми 73

V. ОБСЪЖДАНЕ 79

1. Изолиране на алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и на човека очни лещи чрез физико-химичен метод (гелна хроматография) 79
2. Получаване и характеристика на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски изолиран алфа-кристалин от водно-солеви екстракт на очна леща 81
3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в човешки ембрионални и фетални тъкани чрез имунохистохимични методи 82
4. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация 85
4.1. Изследване за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез аглутинационни, имобилизационни методи и ELISA 86
4.2.Изследване за наличие на антитела срещу алфа-кристалини в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез ELISA 90

VII. ИЗВОДИ 93

VIII. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 95

IX.ЛИТЕРАТУРА 96

X.НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИЯТА 116

1 . Списък на публикациите 116
2. Участия в научни прояви 116

Списък на използваните съкращения

АК – аминокиселини

АПК – антиген представящи клетки

БАН – българска академия на науките

б.с. – белтъчно съдържание

г.с – гестационна седмица

ЗАЛС – заешки антилещен серум

МА – моноклонални антитела

СА – спермоантитела

СЗО – световна здравна организация

СОА – сперматозоидо-обличащи антигени

ФСХ – фоликулостимулиращ хормон

ЧСП – човешка семинална плазма

Ц – цитоплазма

Я – ядро

AB – avidin–biotin

ALAbs – anti–lense antibodies; анти-лещени антитела

AS Abs – anti-sperm antibodies; анти-спермални антитела; спермоантитела

ART - assisted reproductive technology; техники за асистирана репродукция

cDNA – complementary DNA; комплементарна ДНК

DAB – 3,3'-diaminobenzidine; 3,3'-диаминобензидин

ELISA – enzyme linked immunosorbay assay; ензимно свързан имуносорбентен метод

GAT - gelatin agglutination test; желатинов аглутинационен тест на Кибрик

ICSI - intra-cytoplasmic sperm injection; интра-цитоплазмено спермално инжектиране

IEF – isoelctric focusing; изоелектрично фокусиране

IUI - intrauterine insemination; вътрематочна инсеминация

IVF – *in vitro* fertilization; ин витро оплждане

MHC – major histocompatibility complex; главен комплекс за тъканна съвместимост

OD- optical density; оптична плътност

OPD – orthophenylene diamine; ортофенилен диамин

PAGE – polyacryl amide gel electrophoresis; полиакрил амидна гел електрофореза

PCOS - polycystic ovary syndrome; синдром на поликситозните яйчници

PVC – polyvinyl chloride; поливинил хлорид

PVDF - polyvinylidene fluoride; поливинилиден флуорид

PBS – phosphate buffer saline; фосфатен буфер

PS – polystyrene; полистирен

SD – standard deviation; стандартно отклонение

SDS – sodium dodecyl sulphate; натриев додецил-сулфат

SIT - sperm immobilization test; спермоимобилизационен тест на Изожима

SIV – spem immobilization value; спермоимобилизационно ниво

TAT – tray agglutination test; микроспермоаглутинационен тест на Фриберг

TEMED – tetramethylenediamine; тетраметилендиамин

TRIS – (hydroxymethyl) aminomethane; (хидроксиметил) аминометан

TSAT - tray slide agglutination test; тест на Франклин-Дюкс

TTBS – tris buffered saline and Tween 20

ВЪВЕДЕНИЕ

Въпросите, свързани с етиопатогенезата на безплодието в човешките популации, са актуален проблем на съвременната биология и имунология на репродукцията. Безплодните двойки представляват 10-15 % от всички семейни двойки. Причините за това може да са от най- различно естество (начин на живот, злоупотреба с алкохол и тютюнопушене, токсична среда, и др). Създаването на нови методи с диагностично и прогностично значение, както и прилагането на съвременни подходи при асистираните репродуктивни техники (като интраутеринна инсеминация (IUI), ин витро оплождане (IVF), интра-цитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (ICSI) и др.), доведе до преодоляване на значителна част от причините за безплодие. Това увеличи дяла на имунологично обусловеното безплодие и създаде необходимост от по-пълното и задълбочено изучаване на имунните конфликти в репродуктивния процес, особено в случаите с диагноза идиопатично безплодие.

Едни от първите опити в това отношение са изследванията върху антигените на човешките сперматозоиди, които са имунологично привилегировани клетки и при нарушаване на имунологичната изолация, в която те се намират, може да се индуцира имунен отговор срещу тях. При някои брачни двойки безплодието се свързва с така възникнал имунологичен конфликт. Имунологично обусловено безплодие се наблюдава и при повишени концентрации на антитела срещу зона пелуцида, овариум, фосфолипиди и други антигени.

Пионерни са изследвания върху ролята на различни сперматозоидни антигени и имунен отговор срещу тях на научния колектив към Катедрата по биология под ръководството на Акад. Радой Попиванов (Попиванов, Наков, Живков, Буланов, Еврев). В сътрудничество с Акад. Кирил Братанов (Институт по биология и имунология на размножаването, БАН), на базата на проучвания върху имунологичния конфликт като причина за безплодие при животни и хора, се създава ново научно направление, утвърдило се в световен мащаб – “Имунобиология на репродукцията”.

Наличието на спермоантитела в безплодни двойки са доказани от редица учени: S. Isojima, K. Koyama (Димитрова Д., 2003), Voisin и други. Съществен принос в това научно направление имат и българските учени Д. Димитрова, М. Моллова, Р. Фичорова, С. Калайджиев, и др. (МУ – София и ИБИР, БАН).

Понастоящем, методите за доказване на спермоантитела са рутинен диагностичен тест, заедно с другите класически и съвременни методи при изясняване причините за инфертилитет.

В последните десетилетия в репродуктивната биология все по-голям интерес представляват изследванията върху друга група имунологично изолирани белтъци и тяхната роля в процесите на опложданe, ембриогенеза и протичане на нормална бременност. Това са алфа-кристалините, познати като структурни белтъци на очната леща, които през последните тридесет години бяха причислени към групата на нискомолекулните стресови белтъци. Стресовите протеини (главно високо-молекулните) са широко изучавани в различни физиологични и патологични състояния, но данните за ролята им, най-вече на нискомолекулните стресови белтъци, в репродуктивния процес и участието им в имунологично обусловеното безплодие са оскъдни. Всичко това определи интереса към тях и целта на настоящия дисертационен труд за изучаване ролята на имунологично секвестираните антигени – сперматозоиди и алфа-кристалини, като индуктори на хуморален имунен отговор при пациенти с репродуктивни проблеми.

Дисертационният труд е разработен в Катедрата по биология, Медицински факултет към Медицински университет, София - лаборатория по имунология на репродукцията. Част от изследванията са проведени в Института по биология и имунология на репродукцията “Акад. Кирил Братанов” при БАН.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Имунологично изолирани антигени и тяхната имуногенност

Основна предпоставка за нормалното функциониране на имунната система и цялостната хомеостаза на организма е имунната толерантност към собствените антигени. Тя се развива чрез две основни групи механизми, действащи съответно в тимуса и костния мозък, от една страна (централна толерантност) и в периферните органи (периферна толерантност). Един от механизмите на периферната толерантност е органно специфичният антиген да се изолира от контакт с имунната система. Такива антигени се наричат имунологично изолирани и включват органно-специфичните протеини на очната леща и тестиса.

Недостатък на изолацията като механизъм за предотвратяване на автоимунни процеси е, че тя лесно се нарушава при нараняване и възпаление на органа, което води до освобождаване на антигени и достъп на имунокомпетентни клетки до тях.

Изолирането на тестиса от вътрешната среда на организма е необходимо с оглед на създаване на микрообкръжение за правилното протичане на сперматогенезата. Това включва както уникалното клетъчно делене (мейоза), което сперматоцитите започват, след като се отделят от базалната мембрана, така и сложния процес на спермиогенеза (формиране на сперматозоидите), включващ експресия на редица специфични за тях антигени.

Капсулата на очната леща, която е непропусклива за белтъци, се формира в ембрионалното развитие още преди тимуса. Така кристалините се оказват в своеобразна имунологична изолация, която, от една страна, възпрепятства изработването на толерантност спрямо тях, а от друга, не позволява възникване на имунологичен конфликт дотогава, докато бариерата не бъде нарушена в резултат на някакъв патологичен процес.

През последните 20 години бе установено, че сочените до скоро за антигени с висока органна специфичност кристалини на очната леща, се експресират в минимални концентрации в редица други тъкани и че те са стресови протеини (белтъци на топлинния шок) с шаперонна функция (Baht SP and Nagineni C.N., 1989; Iwaki T. et al.,1992). В другия основен секвестиран орган

– тестиса, съдържанието им е относително високо, макар и не толкова, колкото в очната леща, където освен шаперонна те изпълняват и структурна функция, а специфичното им подреждане осигурява еластичността и прозрачността на лещата (Трифонова Н., 1985).

Нормално кристалините са вътреклетъчни белтъци, локализирани в цитозола. Излизането им от клетките при различни патологични състояния би довело до отключване на имунен отговор срещу тях. При надхвърляне на определена концентрация на извънклетъчните стресови протеини те биват ангажирани в имунни комплекси, което създава опасност от реакции на свръхчувствителност от III тип с развитие на съответната патология. Предвид на резултатите от предишни изследвания в Катедрата по биология, имунният отговор срещу стресовите протеини може да играе важна роля в имунопатологията на репродукцията (Бътева И., 2014).

1.1. Сперматозоидни антигени

Поради изолацията, в която се намира тестиса, сперматозоидните антигени са потенциални автоантигени и срещу тях може да се включи авто- или ало-имунен отговор. Сперматозоидоспецифични компоненти, които не предизвикват имунна реакция у мъжа, но индуцират имунен отговор у жената, се определят като изоантигени (Voisin et al., 1974). Човешките сперматозоидни антигени се идентифицират чрез хиперимунни ксеногенни антисеруми, чрез серуми от безплодни лица и чрез моноклонални антитела срещу сперматозоидни антигени.

Според Димитрова, 2004, през последните години за характеризиране на човешки сперматозоидни антигени са получени голям брой миши моноклонални антитела (МА). Чрез тях са идентифицирани както антигени, принадлежащи към групата на сперматозоидо-обличащите антигени (СОА), които се откриват върху човешки еякулатни сперматозоиди и в човешка семинална плазма (ЧСП), така и собствени сперматозоидни антигени, доказвани само в човешки еякулатни сперматозоиди. Върху фертилитета особено важно влияние оказват сперматозоидоспецифични антигени, разположени върху сперматозоидната повърхност, които могат да индуцират хуморален имунен отговор. Свързването на антителата с тези антигени може да повлиява сперматозоидната подвижност (Diekman and Herr, 1997). Предимство на тези таргетни антигени е широкото им видово разпространение, което би позволило създаването на подходящ

експериментален модел за изследване на ефекта върху плодовитостта на пречистените антигени след приложението им като имуногени (Mollova et al., 1999). Особено голям интерес представляват сперматозоидните антигени, участващи в свързването на сперматозоидите към zona pellucida, към оолемата и във формирането на пронуклеус. С използването на сперматозоидоспецифични моноклонални антитела е доказано, че фертилизационните антигени – 1 (FA1) и FA2 (Naz et al., 1993; 1995) участват в свързването на сперматозоидите към zona pellucida. Човешки антисеруми от инфертилни мъже разпознават FA1 антигена, който е белтък с M_r = 51 000 и притежава автофосфорилираща активност (Naz, 2000). Антигенът FA2, идентифициран чрез сперматозоидоспецифично МА, има M_r = 95 000 и е изолиран от човешки сперматозоиди (Naz et al., 1993). След клониране и определяне на нуклеотидните последователности в комплементарната ДНК (cDNA), става възможна транслацията на белтъка, идентифициран чрез МА FA1, който е определен като нов, невключен в базата данни, протеин. Той специфично реагира със ZP3 протеина на блестящата обвивка на овоцитите. Получените след имунизация поликлонални антитела напълно блокират взаимодействието между сперматозоидите и zona pellucida при мишка и човек (Zhu and Naz, 1997).

Един от най-добрите примери за потенциален контрацептивен антиген, доказан чрез МА при различни видове, включително човека, е PH–20. PH – 20 протеинът в много ниски концентрации **индуцира безплодие** в мъжки и женски морски свинчета (Primakoff et al., 1988). Изследванията върху хомоложната на PH-20 протеинова молекула в плъхове (2B1) доказват наличие на мембранносвързан гликопротеин. Той претърпява ендопротеолитични въздействия по време на преминаването на сперматозоидите през епидидима, което има значение за оптимизиране на неговата хиалуронидазна активност при пенетрацията на сперматозоидите през богатия на хиалуронова киселина cumulus oophorus. Идентифицираният антиген мигрира от опашката към акрозомната област по време на капацитацията (Seaton et al., 2000). В човешки сперматозоиди този антиген се локализира върху външната повърхност на плазмената мембрана, която покрива акрозомата. Той също притежава хиалуронидазна актвност, необходима за улесняване на пасажа на сперматозоидите през кумулусните клетки до zona pellucida (Sabeur et al., 1977). В морско свинче са установени две области на PH-20 антигена (α-АК остатъци 94 - 119 и 424 - 444), които са силно

имуногенни. Тези области са достъпни върху сперматозоидната повърхност, когато нативният PH - 20 антиген е в разтвор или е свързан към сперматозоидната повърхност. Тъй като PH - 20 антигенът присъства в много животински видове, а също така и при човека, би могло да се предположи, че срещу този антиген се образуват спермоантитела у хора, страдащи от безплодие (Chan et al., 1999).

Сперматозоиден антиген, използван за имунизации на мъжки гризачи, при които се наблюдава висок титър на антитела (Sehgal et al., 1996) е рекомбинантният човешки антиген SP-10, блокиращ взаимодействието на сперматозоидите с овоцита. Произведените срещу него моноклонални антитела разкриват гликопротеин с M_r = 34 000, локализиран върху вътрешната акрозомна мембрана на човешки сперматозоиди (Димитрова, 2004).

Моллова и сътрудници (1999) описват белтък (Ag 1F10), идентифициран чрез МА 1F10, получено след имунизация на BALB/c мишки с живи капацитирани сперматозоиди от нерез (Mollova et al., 1996). МА 1F10 взаимодейства с антиген, локализиран в акрозомната част на живи капацитирани сперматозоиди от нерез, бик, овен, мишка, куче и човек. То не притежава спермоаглутиниращa и спермоимобилизираща активност, но води до намаляване на броя на сперматозоидите, които се свързват към zona pellucida (Mollova et al., 1996). Идентифицираният антиген е изграден от единична пептидна верига с M_r = 68 000 – 70 000. Установено е, че след преинкубиране на сперматозоиди от нерез с МА 1F10, се наблюдава статистически значимо инхибиране на тяхната прикрепваща активност към свинска zona pellucida. Подобни резултати се наблюдават и в хомоложна човешка IVF система. При двата in vitro експеримента се описва дозово зависим характер на инхибиране на сперматозоидната лигандна активност към свинска или човешка zona pellucida (Mollova et al., 1996).

Получени и характеризирани са и някои други МА (ACR.2, Hs – 8) срещу вътрешни акрозомни белтъци в нерез (ACR 2: M_r = 55 000, 53 000, 45 000, 38 000; Hs - 8: M_r = 230 000, 110 000, 88 000, 60 000, 48 000). Тези МА намаляват статистически значимо свързването на сперматозоидите към zona pellucida. Получените експериментални данни предполагат участието на идентифицираните белтъци в ранните фази на оплождането (Peknicova et al., 2001).

Батова и сътрудници описват и характеризират човешки сперматозоиден повърхностен гликопротеин, идентифициран чрез МА 4A8.sp, (Batova et al., 1998). МА 4A8.sp не притежава спермоаглутиниращa и спермоимобилизираща

активност. Не се установява статистически значима промяна в процента на прогресивно подвижните и на хиперактивните сперматозоиди в присъствието на това МА. Но когато МА 4А8.sp е добавено in vitro към сперматозоидна суспензия за инкубация и ко-инкубация при изследване на свързването на сперматозоидите към zona pellucida, се наблюдава значимо инхибиране на сперматозоидното прикрепване с дозовозависим характер. В експериментални условия МА 4А8.sp напълно блокира пенетрацията на сперматозоидите през zona pellucida. Кореспондиращият епитоп на МА 4А8.sp представлява олигопептид върху човешки епидидимни сперматозоиди. Обсъжда се модификация на идентифицирания антиген в епидидимиса и участието му в процесите на взаимодействие на сперматозоидите със zona pellucida (Batova et al., 1998).

Dubova – Michailova et al., 1991 доказват антиген Ag 1A1, локализиран в акрозомата на човешки сперматозоиди, който представлява фамилия от протеини с вариращa молекулна маса (от M_r = 20 000 до M_r = 34 000). Епитопът 1А1 е широко разпространен в представители на различни видове бозайници: нерез, коч, мишка, плъх. Включеното в среда за in vitro оплождане на миши, свински и човешки овоцити МА 1А1, блокира фертилизацията главно чрез повлияване прилепването и пенетрацията на сперматозоидите през zona pellucida (Dubova – Michailova et al., 1991).

Сперматозоидни антигени с важна роля за функционирането на сперматозоидите при оплождането (подвижност, жизненост, пенетрация през цервикалния мукус) са доказани от редица автори с използването на моноклонални антитела. Тези сперматозоидни компоненти имат различна локализация в клетката – някои са повърхностни, докато други имат вътреклетъчно разположение (Маркова и сътр., 2009, 2010).

Kyurkchiev et al. (1986) прилагат нов експериментален подход при получаване на хетерохибридомни клетъчни линии. Антигенните епитопи на човешки сперматозоиди, срещу които се образуват спермоантитела в безплодни пациенти, са ксеногенни за мишка. Поради това съществува вероятност за различия в разпознаваните антигенни епитопи при хора като изотипни, и при мишка – като ксеногенни специфичности. За изследване на тези епитопи, на които съответстват антитела у безплодни жени, са получени човешки – миши хибридоми. При фузията са използвани периферни кръвни лимфоцити от инфертилни пациентки (имащи висок титър на циркулиращи

спермоимобилизиращи антитела), култивирани с промити сперматозоиди на съпруга, и миши миеломни клетки. Характеризирани са: МА Н3 – 1В12, притежаващо спермоаглутинираща и спермоимобилизираща активност, и МА Н3 – 1В5, IgM (κ), разпознаващо СОА и притежаващо само спермоаглутинираща активност. Моноклонални антитела с подобна характеристика биха могли да бъдат използвани за пасивна имунизация с цел индуцирането на изкуствен стерилитет в жени. Пречистените антигени чрез МА, продуцирани от хетерохибридоми, очертават една от възможностите за създаване на контрацептивна ваксина (Kyurkchiev et al., 1986).

1.2. Стресови протеини

За пръв път експресията на определени гени в резултат на топлинен стрес е описано през 1962г. от Ritossa и съавтори. Те наблюдават характерните лампови четки в хромозоми от слюнчени жлези на плодова муха *Drosophila melanogaster* след подлагането й на топлинен стрес. Продуктът на тези гени е идентифициран 12 години по-късно, когато е въведено и понятието Heat Shock Proteins (Hsp), или ”протеини на топлинния стрес” (Tiserr, A., 1974). Впоследствие се доказва, че много други стресови фактори могат да индуцират експресията на Hsp гените. Затова белтъците, които се синтезират в условията на клетъчен стрес и предпазват клетката от гибел, се наричат стресови протеини, или белтъци на топлинния шок и се означават като Hsp, а гените, отговорни за тяхното синтезиране - гени на топлинния стрес, които се означават Hsp.

При физиологични условия белтъците на топлинния шок изпълняват ролята на **шаперони**, които подпомагат нагъването на новосинтезираните полипептидни вериги, формирането на триизмерната пространствена структура на белтъка и образуването на надмолекулни комплекси - олигомерни структури. Самите Hsp не влизат в окончателната структура на асемблираните белтъци (Ellis, R.J., 1987). Hsp като шаперони изпълняват изключително важна роля във вътреклетъчния транспорт, поддържането на белтъците в неактивни форми и предпазването им от разграждане и агрегация.

В отговор на клетъчен стрес, предизвикан от промяна в температурата, присъствие на свободни кислородни радикали, вирусни и бактериални инфекции, тежки метали, етанол, исхемия, включително циркулаторен и хеморагичен шок (Ellis, R.J., 1987; Welch, WJ., 1992; Arrigo et al., 2007) се индуцира синтезата на

Hsp, които трябва да се справят с неблагоприятните последствия на стреса (чрез корекция на нарушена конформация, както и на агрегация на белтъците и загуба на функции).

Интересен факт е, че умерен стрес върху клетките, достатъчен единствено да индуцира експресията на Hsp, води до предпазване на клетките от последващи увреждания. Този феномен се нарича „стресова толерантност" и се дефинира като способността на клетките или организма да придобият резистентност към стрес след предишно нелетално излагане на стресов фактор.

Hsp се синтезират при възникнали нарушения на хомеостазата в клетките на живите организми (A. Neuer et al., 2000). Адаптацията на клетките към стреса с участието на Hsp е ключов механизъм за оцеляване. Това обяснява повишаващия се интерес към ролята на Hsp в почти всяко направление на медицината, особено в имунологията, инфекциозните заболявания, онкологията и репродуктивната медицина (Mizzen, L., 1998). Непрекъснато се проучват лекарства, модулиращи експресията на Hsp, т.е. предпазващи клетъчният интегритет и поддържащи хомеостазата на клетките и тъканите (Biro, K. et al., 1996; Vigh, et al., 1997). Вече са картирани гените на Hsp и са описани механизмите на включване на експресията им от ядрени транскрипционни фактори (Westwood, J.T. et al., 1991). Hsp играят роля и в апоптозата. HSP27, HSP70, Hsp 90 са основно с анти-апоптотична функция, докато HSP60 е проапоптотичен протеин. Предполага се, че тези Hsp се включват на много етапи в апоптотичните сигнални пътища (Kregel, K., 2002).

Натрупването на определени количества Hsp в клетките би могло да се използва като биомаркер за клетъчна увреда (Kregel, K., 2002). Много вероятно е протеини от семейството на Hsp70 да участват в предпазването от белтъчна денатурация и/или да преработват денатурирани белтъци и белтъчни фрагменти, произведени при стрес (Kregel, K., 2002). Протеините на топлинния стрес (Hsp) са висококонсервативни полипептиди, които се откриват във всички живи организми – от микроорганизмите до човека. Установено е, че дивергиралите в хода на еволюцията видове притежават Hsp с много сходна първична структура. Те са многофункционални белтъци, откриват се във всички клетъчни компартменти и органели и взаимодействат с голям брой други молекули.

Разнообразието от функции, които изпълняват стресовите протеини се обуславя от особеностите на тяхната структура. Днес Hsp са секвенирани, изучена

е тяхната пространствена структура (Westwood, J.T.et al.,1991), установено е, че притежават домени и мотиви със специфична роля. Особеностите в структурата и молекулната маса на Hsp в kDa са в основата на съвременната им класификация, при която те се разделят на няколко семейства. При бозайниците са разграничени следните семейства: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, нискомолекулни Hsp (20-30kD) и убиквитин (7-8kD). Най-общо молекулната маса на стресовите протеини варира от 7 до 110kDa и най-добре изучени са 4 семейства Hsp-27, Hsp-60, Hsp-70 и Hsp-90 kDa.

1.2.1. Високомолекулни стресови протеини

Семейството на Hsp-60 включва белтъци с относително силна конститутивна експресия, която се индуцират допълнително при стрес. Основната локализация на Hsp60 е в митохондриите, макар че са документирани и други локализации, включващи клетъчната повърхност (Soltys, J.B. and Gupta, R.S., 1996). Hsp70 са най-консервативната група белтъци от всички Hsp (Hunt, C. and Morimoto R.I., 1985). Конститутивно синтезиращите се Hsc70 се откриват в цитозола и в ядрата на клетките и се индуцират умерено при стрес. Семейството на Hsp70 има важни цитопротективни функции (Kregel, K., 2002). Това са: 1. нагъване на протеините в различни вътреклетъчни отдели (компартменти); 2. поддържане на структурните белтъци; 3. коригиране структурата на погрешно нагънати белтъци; 4. транспорт на белтъци през мембраните и към различни клетъчни отдели; 5. предпазване от белтъчна агрегация; 6. деградация на нестабилни белтъци. Hsp 90 се експресира в големи количества в бактериални и еукариотни клетки. Има шаперонова функция, участва в нагъването на полипептидните вериги, клетъчната сигнализация и потискането на туморния растеж, стабилизира различни рецептори, особено тези за стероидни хормони (Pratt WB et al., 2006; Grad I and Picard D.,2007).

До момента са известни редица функции на Hsp в клетките, но все още не са напълно изяснени техните механизми на действие. Синтезата на някои представители на стресовите протеини се индуцира само при стресови условия, а други се експресират постоянно при нормална температура и синтезът им се повишава в малка степен при топлинен стрес. Затова, някои автори предлагат терминът **Hsp да** се отнася само за индуцируеми белтъчни продукти, докато с **Hsc**

да се описват постоянно експресиращите се стресови протеини (A. Neuer et al., 2000).

1.2.2. Нискомолекулни стресови протеини

Семейството на нискомолекулните стресови белтъци (sHsp - small Hsp) се състои от 7 члена: алфаА и алфаВ-кристалин (до скоро познати само като белтъци на очната леща), Hsp27, Hsp20, myotonic dystrophy protein kinase binding protein (MKBP), Hsp27 и сърдечносъдов Hsp, всички с молекулна маса от 15 до 30 kDa. Членовете на този клас имат общ алфа-кристалинов домен, намиращ се в С-края, заедно с два актин-свързващи домена. Доказано е, че самият Hsp27 играе роля в полимеризацията на актина, ремоделирането и образуването на напречни мостчета в гладките мускули. Фосфорилирането е една от най-важните модификации в sHsp и се смята за ключов процес в регулацията на структурата и функцията им. Това е едно от първите събития, индуцирани от стресови фактори (топлинен шок, оксидативен стрес, действие на цитокини, на растежни фактори и др.

AlphaB-crystallin (HspB5) е полипептидна субединица на основния структурен компонент на очната леща – алфа-кристалин. Последният представлява хетерополимер, съставен от два типа полипептидни субединици - αA- и αB-, всяка от които е с дължина около 170 аминокиселинни остатъка. Съотношението между двете субединици варира при различните видове – от 1:3 при вид малка акула до 3:1 при кенгуру. Докато αA-кристалинът се експресира почти изключително само в лещата, αB-кристалинът се намира и в тъкани извън очната леща. Различните изследователски групи дават различни данни за експресията на α-кристалини в някои тъкани на бозайници. Най-високи нива на αB-кристалин се намират в сърце, мускули, мозък, бял дроб (Bhat S.P. and Nagineni C.N., 1989). И двете субединици (αA- и αB-) са кодирани от единични гени, разположени съответно в 21 и 11 хромозома при човека (Quax-Jeuken Y et al.,1985 и в 17 и 9 хромозома при мишката (Kaye NW et all., 1985; Chun-hong Xia et al., 2006).

Експресия на αB-кристалин се наблюдава и в много тъкани извън очната леща, докато αA-кристалин се открива в много ниски нива само в слезката и тимуса (Kato K et al., 1991). Alpha A се експресира основно в очната леща и се открива в ниски концентрации в скелетните мускули, черен дроб, слезка, мастна

тъкан, докато αB-crystallin в висока концентрация се открива освен в очната леща, още в миокарда и скелетните мускули (Bakthisaran R et al., 2015).

За промотора на αB-кристалина е известно, че освен конститутивна експресия в много органи, тъкани и клетки, той може да се активизира и под действието на сигнали от околната среда. Отговорът на αB-кристалина на стрес ин виво се контролира от физиологични фактори (Udelsman R. Et al.,1993). Високи нива на експресия на αB-кристалин са открити в тъкани с продължително високи нива на окислителен метаболизъм, напр. сърце и диафрагма (Inaguma Y. et al., 1995). Осмотичният стрес също води до разлика в експресията на αB-кристалин и други sHsp в различни клетъчни линии.

Алфа-В се означава още CRYAB и спада към топлинно-индуцируемите sHsp, Следователно неговата функция е свързана с патофизиологични условия. Алфа А се означава като CRYAA и не е стрес индуцируем, среща се основно в набразденатa мускулатура и в тестиса, което предполага, че тъкнно-специфичната експресия на двете субединици на алфа-кристалините се регулира от различнен механизми.

1.2.3. Експресия на Hsp в репродуктивните органи и тъкани

Доказано е наличието на Hsp в различни тъкани, имащи отношение към човешката репродукция. Установена е експресията на различни Hsp (Soltys, J.B. and Gupta, R.S. 1996; Khanna, A. and al., H.R. 1995) в яйчник, което предполага, че стресовите протеини вероятно имат роля в женската гаметогенеза. В маточните тръби Mariani et al, 2000, изследват експресията на Hsp по време на неонаталното и постнатално развитие в репродуктивна система от мишка. Авторите установяват строго определен модел на екпресия на Hsp 25 u Hsp70 в тръбите и ендометриума по време на онтогенезата на мишка, което предполага специфична роля на Hsp25 за имплантацията на бластоциста в ендометриума. Авторите предполагат, че Hsp70 не допуска имплантацията на бластоцист в яйцепроводите.

Данни за експресията на sHsp в миометриума по време на късна бременност и раждане почти липсват. Тъй като Hsp27 има важна роля в мускулните контракции, се наблюдава силна експресия на Hsp27 в късна бременност и раждане (White, B.G. et al., 2005). Tabibzadeh и колеги описват подробно Hsp в ендометриум на здрави жени (Tabibzadeh, S. et al.,1996). Авторите

доказват наличието на нискомолекулния стресов протеин αB-кристалин в човешки ендометриум, като този протеин липсва в нерецептивния пролиферативен ендометриум и се появява в повърхностния епител на ендометриума по време на имплантационния прозорец. През 1997 Gruidl et al., потвърждават тези данни с Northeren blot и доказват, че липсва експресия на αB-кристалин по време на пролиферативната фаза. Експресията на иРНК се появява за първи път в секреторната фаза, прогресивно расте и достига пик в късния секреторен ендометриум. Това предполага, че този белтък е важен фактор в молекулния репертоар, който прави ендометриума рецептивен за имплантацията. Експресията е ограничена в ендометриалния епител, докато други ендометриални клетки (стромални и лимфоидни клетки) не са имуноположителни за αB-кристалин. Bagchi, M.K. et al. (1991) също установяват максимална експресия на Hsp27, Hsp60 и Hsc70 в ендометриума непосредствено след овулацията и в ранната секреторна фаза, когато е „критичният" период на ендометриална възприемчивост към имплантиращия се ембрион. Прогресивното покачване на ендометриалния кристалин по време на секреторната фаза вероятно се дължи на покачването на циркулиращите нива на прогестерон, успоредно със спад в естрогеновите нива (Neuer, A. et al., 1996). Вероятно първичния сигнал за индукция на експресията на alphaB-кристалин е прогестеронът, а функцията му е да предпазва нативните форми на другите протеини, важни за имплантацията. Hsp27 също е под хормонален контрол и се експресира максимално около 21 ден на менструалния цикъл, което предполага ролята му за имплантацията. (Ciocca et al, 1996). Тъй като естрогеновите и прогестероновите рецептори са свързани с Hsp, тези Hsp участват постоянно в модулиране стероидната функция на ендометриума (Bagchi, M.K. et al., 1991).

Според водещата теория за ролята на Hsp в ендометриума, стресовите белтъци предпазват тъканите от цитотоксично увреждане (Tabibzadeh, S. et al., 1996). Възможно е експресията на αB-кристалин да се регулира локално от ендометриална тумор некротизиращ фактор алфа (TNF-α) (Tabibzadeh, S. et al., 1996). Приема се, че експресията на Hsp27 и αB-кристалин дават устойчивост към цитотоксичните въздействия на TNF-α и оксидативния стрес. Тъй като Hsp70 протектират клетките от апоптоза, а αB-кристалинът дава резистентност срещу индуцирана от оксидативен стрес и TNF-α цитотоксичност, то вероятно

функцията на тези белтъци е да ограничават степента на цитотоксичните процеси в ендометриума, особено по време на критичния период на ендометриална рецептивност (Tabibzadeh, S. et al., 1996). Същите автори демонстрират и наличие и диференцирана експресия на Hsp във фалопиевите тръби на жени с и без ектопична бременност.

Нискомолекулните Hsp са открити в репродуктивни тъкани от плъх и мишка по време на имплантацията и се смята, че имат роля и при децидуализацията. Ciocca и сътрудници, 1996, установяват, че по време на бременността при плъх, от момента на имплантацията нискомолекулният Hsp25 се експресира в ендотелните клетки на ендометриалниите съдове и в луминалния епител в антемезометриалната зона. С напредване на бременността Hsp25 се появява в предецидуални и децидуални клетки близо до зоната на имплантацията и след това се разпространява до мезометриума. Този модел е аналогичен и при псевдобременност. Hsp25 се експресира силно и в синцитиотрофобласт, започвайки от 11 ден на бременността. При всички клетъчни типове, които експресират Hsp25 наличието на белтък не корелира с клетъчната пролиферация или апоптоза, а само със състоянието на диференциация. Така ясно изразената екпресия на Hsp25 в определени клетки и определен момент се смята за ключова по време на имплантацията, децидуализацията и имплантация. Hsp27 е изследван в човешки ендометриални клетки ин виво и ин витро при децидуализация и се открива в децидуата по време на първия триместър на бременността (Tabibzadeh, S. et al.,1996)

Експресия на Hsp се наблюдава и в човешката плацента (Mineva, I. et al.,2005). Системни анализи показват ясно дефиниран времеви и пространствен модел на експресия на Hsp. Чрез имунохистохимични изследвания е установено, че Hsp са по-изобилни по апикалната повърхност на синцитиотрофобластите, отколкото в стромалните или мускулните клетки. Плацентарната експресия на Hsp не се различава при предтерминни и зрели плаценти, което показва, че тяхното производство е част от физиологичните процеси, присъщи за нормална бременност. Експресията на Hsp като белег за плацентарна патология би могла да има прогностична стойност, както показват някои най-нови проучвания. Voss et al.,2000 и сътрудници докладват, че ембриони на мишки с нокаут на гена Hsp90b (beta) растат до ден 9.5 и след това загиват поради липса на експанзия на алантоисните съдове, които нормално разрасват в хориона и дават възможност за

жизненоважна обмяна между майката и плода. В допълнение, имунни комплекси между IgG u Hsp60 или Hsp70 са били открити само в плаценти от жени, които са родили предтерминно.Тази зависимост показва, че една от причините за преждевременното раждане би могла да е автоимунен процес срещу Hsp.

1.2.3.1. Hsp и образуване на полови клетки

При половото размножаване мъжките и женските гамети предават генетичната информация от едно поколение в следващото и затова са предпазени чрез редица сложни механизми от увреждащи влияния, а в случаите, когато не може да се гарантира геномни интегритет на гаметите, се инициира програмираната клетъчна смърт. Hsp участват както в протективните механизми, така и в апоптозата.

1.2.3.2. Hsp и сперматогенеза

През последното десетилетие усилено се изучава ролята на Hsp в сперматогенезата. Функционирайки като шаперони, Hsp предпазват от грешки при нагъването на белтъците индуцирани от нефизиологични състояния като напр. покачване на температурата. По-специфичните изисквания за Hsp в тестиса не са изненадващи, тъй като това е единственият орган, намиращ се извън тялото с цел поддържане на по-ниска температура. Факт е, че всяко дори минимално покачване на температурата нарушава сперматогенезата, като провокира белтъчна денатурация. Всички етапи на сперматогенезата са съпроводени с процеси на трансформация и клетъчна диференциация и затова по време на сперматогенезата се експресират различни Hsp (Dix, D.J., 1997; Meinhardt, A. et al., 1999). По време на сперматогенезата при мишка и плъх се натрупва конститутивната форма на Hsp70 (Allen, R.L.et al., 1988). Също така, в плъши и човешки тестис е открита мРНК, кодираща протеин свързан с Hsp86 (Lee, S.J., 1990). Доказано е, че при безплодни мъже броят на сперматогониите, експресиращи Hsp60 корелира със степента на загуба на сперматогенна функция (Werner, A. et al., 1997). При човека еякулатът съдържа различен процент мъртви сперматозоиди, които показват структурни белези на стрес (Markova et al., 2011).

С други думи, с малки изключения (Mori, C. et al., 1999) участието на Hsp70-2 в сперматогенезата е необходимо за завършване на мейозата в миши сперматоцити.

От нискомолекулните стресови протеини, Hsp25 е специфично експресиран в Сертолиевите клетки, където се открива на същите места като F-актиновите възли.

1.2.3.3. Hsp и овогенеза

Женската репродуктивна система при бозайниците е чувствителна на хипертермия и други стресови фактори. Експресията на Hsp е неотменен процес по време на овогенезата при редица видове: насекоми (Ambrosio, L. and Schedl, P., 1984), риби и земноводни (Heikkila, J.J. et al., 1985), а така също и при бозайници (Heikkila, J.J. et al., 1986), при които овогенезата се характеризира със сложен времеви ход и мащабни преобразувания на клетъчните структури (Markova et al., 2016).

Консервативната експресия на Hsp у еволюционно дивергентни организми показва фундаменталната роля на Hsp по време на развитието на герминативните клетки. Hsp се откриват в овоцити на Дрозофила (Zimmerman, J.L. et al., 1983). При миши овоцити хит-шоковият отговор е максимален по време на периода на растеж на овоцита и намалява с достигане на пълния овоцитен размер. Накрая процесът спира в момента на фоликуларна диференциация (Curci, A. et al., 1987). С други думи, Hsp70 се открива в най-високи нива в преовулаторните овоцити (Curci et al., 1991). По-късно, синтезът му се преустановява кратко след разпадането на герминалния везикул и е в незначителна концентрация при овулирания овоцит по време на оплождането. След мейоза синтезата на Hsp70 се преустановява напълно. Това е интересен факт, тъй като е известно, че овоцитите на бозайниците са изключително чуствителни на топлина. Гореописаният блок на топлинношокова генна индукция по време на овоцитната диференциация вероятно е основен процес в овогенезата, макар и да протича в различен момент при различните видове. Интерес представлява ролята на Hsp по време на овулация. Тъй като овулацията се характеризира с общите особености на възпалителна реакция (Espey, L.L., 1994), то е възможно Hsp да има роля в процеса на овулацията и в поддържането на постовулаторната метаболитна активност и преживяемост на овоцита. Доказано е наличието на Hsp60 в човешка фоликуларна течност от пациентки подложени на IVF (Neuer, A. et al. 1997). При плъх Hsp70 медиира регресията на корпус лутеум (Khanna, A. et al., 1995). На този етап не съществува подробна информация за функцията на Hsp в тази част на

репродуктивния цикъл. Няма данни и за експресията на нискомолекулни стресови протеини.

1.2.3.4. Hsp и ембрионално развитие

В последните години се изследва усилено и ролята на Hsp по време на ембрионалното развитие. Hsp е с повишена експресия при различни стресови условия, по време на ключови моменти от развитието на ембрионалните и екстраембрионалните тъкани.

Началото на ембрионалното развитие се бележи от успешното приключване на процеса на опложданe и инициацията на първото митотично делене. Преди да се започне обсъждане на ролята на Hsp по време на ембрионалното развитие е важно да се отбележи, че почти цялото знание за функцията и ролята на Hsp в репродукцията разчита на информация получена от проучвания върху животни или от човешки соматични клетки които са индуцирани за диференциация. Макар че данните от животински модели биха предположили подобни механизми при човек, точната роля на Hsp в човешкото ембрионално развитие остава в сферата на предположенията. Поради технически трудности и етични съображения, повечето проучвания в периода на ранно ембрионално развитие при бозайниците са от зигота до разраснал трофобласт. Далеч по-малко информация има за ролята на Hsp в по-напреднали стадии на ембрионално развитие и органогенеза.

Тъй като мишката често се използва като модел за проучване на развитието при бозайници и тъй като голяма част от събраната информация е на миши модел, ще бъдат разгледани основно находки, засягащи ролята на Hsp в мише ембрионално развитие.

Определени характеристики на експресията на Hsp при мишка са директно свързани с основни явления по време на предимплантационната фаза. Първо започва спонтанна конститутивна експресия на Hsp70 още на етап 2 клетки. Hsp са едни от първите белтъци, които се произвеждат от зиготата след оплождането. В този период все още липсва индуцируема експресия на Hsp70 (Bensaude, O. et al.,1983; Morange, M.et al., 1984). Конститутивната форма на Hsc70 е доминиращият топлинношоков протеин експресиран чак до стадий бластоцист (Morange, M. Et al., 1984). В миши ембриони индукцията на Hsp от топлинен шок започва на стадий бластоцист (Wittig, S. et al., 1983). Тъй като бластоцистът бележи начало на диференциация на две клетъчни линии формиращи съответно

вътрешната и външната клетъчна маса, прогресиращата индукция на Hsp се свързва с продължаващата ембрионална диференциация. Така че, индуцираната Hsp70 експресия и формирането на топлинношокови протеини най-вероятно се регулират от фактори на развитието.

Проучванията сочат, че за ранните ембриони на бозайниците характерна обща черта е липсата на индуцируема Hsp синтеза. Тази особеност е резултат най-общо от липсата на генна транскрипция в ембриона. Веднага щом се възобнови транскрипцията, повечето топлинношокови гени се индуцират. Така че, определени характеристики на експресията на Hsp са директно свързани с ключови събития в периода на предимплантационно развитие (Dix, D.J. et al., 1998). След имплантация експресията на Hsp става много по-слабо координирана и различна в различните тъкани (Loones, M.T. et al., 1997). Hsp25, Hsp90, Grp78 се експресират в значително повишени нива в предимплантационни ембриони. До сега не се знае дали някой от тези стресови протеини е жизнено важен за ранното ембрионално развитие. Със сигурност съществува възможността намалената експресия на различни стресови протеини да увеличава податливостта на ембрионите към въздействието на различни химикали, повишени температури или хипоксично-оксидативни условия на средата.

Независимо от големия интерес към стресовите протеини, тяхната експресия и роля в репродуктивните процеси е все още недостатъчно изяснена. Това заключение с особена сила се отнася за нискомолекулните стресови протеини, към които спадат αB-кристалинът и Hsp 27.

2. Изследвания върху хуморалния имунен отговор срещу имунологично изолирани антигени

Антигените на органи, намиращи се в имунологична изолация, поради липса на контакт с имунокомпетентните клетки в резултат на формиране на бариера в ранната ембриогенеза са потенциални автоантигени. При нарушаване на бариерата те влизат в контакт със съответните лимфоцити и индуцират отговор съответен на такъв при хетероложна имунизация. Резултат от този отговор може да бъде отключване на имунопатологичен процес.

2.1. Изследвания върху хуморалния имунен отговор срещу сперматозоиди и ролята им в репродуктивната патология

Хуморалният имунен отговор срещу антигени на човешките гамети са провеждани в Катедерата по биология при Медицински факултет към Медицински Университет - София в продължение на много години (Попиванов, 1968; Наков и сътр., 1979; 1979, Живков, 1975; Буланов, 1976; Буланов и сътр., 1979; Mladenov et al., 1985; Vulchanov, 1979), Фичорова Р., 1993. Антигените специфични за сперматозоидите могат да бъдат класифицирани според мястото на тяхната синтеза или в зависимост от условията на имунизация. По своя произход те се разделят на собствени сперматозоидни антигени и сперматозидо-обличащи антигени, които се секретират в акцесорните жлези на мъжката полова система и са постоянна съставка на семиналната плазма. В зависимост от условията на имунизация сперматозоидните антигени се разделят на: автоантигени, изоантигени, ксеноантигени и алоантигени.

Чрез прилагане на хибридомната техника за систематичното характеризиране на човешки сперматозоидни антигени и използване на подходящ имуноген и схема за имунизация на опитни животни, в проведени от Димитрова и съавтори, 1988, експерименти са получени миши моноклонални антитела, означени като МА 4С11, МА 4Е6 и МА 4G12 (Dimitrova et al., 1988; Димитрова-Диканарова, 1989). Чрез тях са идентифицирани антигени, принадлежащи към групата на СОА. И трите МА разпознават човешки СОА с висока тъканна и видова специфичност, като чрез две от произведените МА са идентифицирани антигени, които са общи за ЧСП и, съответно, слюнка (МА 4С11) или човешко мляко (МА 4G12). За разлика от тях, МА 4Е6 разпознава епитоп, който е специфичен за ЧСП, като реагира положително само срещу ЧСП и човешки еякулатни сперматозоиди, независимо от кръвногруповата принадлежност и секреторния статус на изследваните лица. При изследване на влиянието на получените МА върху подвижни човешки сперматозоиди е установено, че и трите МА не притежават спармоаглутиниращa и спермоимобилизиращa в присъствието на комплемент активност. Но тези МА потискат пенетрацията на човешки сперматозоиди в говежди цервикален мукус, като блокиращият ефект на МА 4Е6, IgG_1 (λ) е значим (42,34%), а на МА 4С1 е сравнително слаб (25,78%), (Dimitrova et al., 1988; Димитрова - Диканарова, 1989). Установено е, че 4Е6 антигенът е съставен от три полипептида (с M_r = 70 000, 64 00 и 60 000, съответно) и има

обща M_r = 194 000, притежава висока термостабилност, като 4E6 - съответстващият епитоп е локализиран върху протеинов компонент на ЧСП (Dimitrova - Dikanarova et al., 1993) Възможността в естествени условия да бъде индуциран имунен отговор у човека срещу идентифицираните от нас чрез МА СОА, е потвърдена посредством установяване на спермоантитела срещу тези антигени в серуми на инфертилни пациенти, блокиращи свързването на МА 4E6 (Dimitrova - Dikanarova et al., 1993; Dimitrova and Marinova, 2000; Димитрова и Маринова, 2001) и МА 4C11 (Димитрова – Диканарова, 1989) със съответните им антигени. Въз основа на получените данни се предполага възможността идентифицираният чрез МА 4E6 антиген в естествени условия да бъде включен в индуцирането на определен тип хуморален имунен отговор, свързан с имунологично обусловеното безплодие при човека (Димитрова – Диканарова, 1989; Dimitrova - Dikanarova et al., 1993; Dimitrova and Marinova, 2000; Димитрова и Маринова, 2001).

Разработен е нов експериментален подход за създаване на човешки моноклонални анти-спермални антитела при съчетаването на трансформиране на периферни кръвни лимфоцити (от инфертилни пациентки с висок титър на спермоимобилизиращи антитела в серума) чрез вируса на Epstein - Barr и клониране на позитивните клонове. Получени са три стабилни В-клетъчни линии, секретиращи имобилизиращи човешки IgM анти-спермални антитела (означени като МА В1, МА В2 и МА D5) срещу антигени, локализирани върху сперматозоидната опашка (Dimitrova-Dikanarova et al., 1996a; 1996b). Идентифицираните мембранни сперматозоидни антигени са с различна специфичност и разпределение в мъжката репродуктивна система. Един от тях (разпознаван от МА В2) е специфичен за нея, секретира се от епителните клетки на ductus epididymidis и се свързва към сперматозоидите в лумена на дуктуса. Проведените експерименти с тези антитела допълват опитите за установяване на етиологията и механизмите в развитието на имунологично обусловено безплодие при човека и продукцията на спермоантитела (Dimitrova - Dikanarova et al., 1996b).

Анализирана е чрез Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction и DNA sequence методи нуклеотидната последователност на гените, кодиращи вариабилните области на μ - веригите на получените спермоимобилизиращи моноклонални антитела (МА). Установено е, че имуноглобулиновите гени, кодиращи МА В2 и МА D5, показват изключително висока хомоложност (с

минимални соматични мутации) с предполагаемите герминативни човешки Ig - гени, кодиращи "естествени" автоантитела, продуцирани от CD5+ B клетки. Получените от Dimitrova et al., 1996b резултати дават основание да се допусне, че MA B2 и D5 не са идентични с антителата, произвеждани от CD5 отрицателни B клетки след екзогенна антигенна стимулация, чиито V - кодиращи области, сравнени с тези на зародишните Ig - гени, са с множество соматични мутации. Изказана е хипотезата, че най-вероятно MA B2 и MA D5 са сходни по своята характеристика с антителата, секретирани в началния стадий на образуване на патогенни спермоантитела (Dimitrova - Dikanarova et al., 1996b). След фузия на миеломни клетки със спленоцити от вазектомирани мишки, в чиито серуми се доказват спермоантитела във високи титри, е получено MA 4A11. MA 4A11 реагира с антиген, локализиран в сперматозоидната опашка на миши и плъши живи сперматозоиди, но не показва кръстосана реактивност със сперматозоиди на други животински видове и със соматични тъкани на мишка. Съответстващият антиген е протеин с M_r = 67 000. MA 4A11 статистически значимо блокира in vitro оплождането на миши овоцити. Анализирани са нуклеотидните последователности на гена, кодиращ разпознавания от моноклоналното анти-спермално антитяло MA 4A11антиген, и е установена 54% хомоложност с бактериален ген, кодиращ сукрозо – специфичен фосфотрансферазен ензим II (Nakamura et al., 1994; Nakata et al., 1995). Изказани са съображения относно патогенезата на спермоантителата у пациенти с имунологично обусловено безплодие (Nakata et al., 1995). Предполага се, че някои бактериални антигени биха могли да бъдат причина за индуциране на анти – спермален автоимунитет. Ако тези антигени се използват при имунизации в бозайници, това би довело до нови възможности за разработване на контрацептивни ваксини (Nakamura et al., 1994).

Имунологични проблеми могат да възникват на всеки един от етапите на репродуктивния процес (Bronson et al., 1982, 1999; Shulman and Shulman, 1991; Naz and Menge, 1994; Nakov, 1996; Diekman et al., 1999). СА (спермоантитела) се образуват чрез различни етиопатогенетични механизми (Димитрова и сътр., 2001a; 2002a), както у някои мъже, така и у някои жени, и това би могла да бъде една от причините за субфертилитет и инфертилитет в човешките популации. По данни от международни изследвания СА се откриват в 20 - 25 % от безплодните двойки (Marshburn and Kutteh, 1994). В Българската популация, при изследване на

инфертилни пациенти, спермоаглутиниращи антитела се доказват при 31% от мъжете и при 21 % от жените (Димитрова и сътр., 2001b). Методите, използвани за диагностика на СА, имат различна специфичност, чувствителност и разкриват различни антиген-антитяло системи (Димитрова и сътр., 2002b). При диагностиката на имунологично обусловеното безплодие е необходим комплексен подход, свързан с прилагането на комбинация от тестове за СА, въвеждане на нови техники, както и добра корелация между лабораториите по диагностика на СА и клиничните центрове.

Независимо от това, че отдавна е било установено наличието на СА в серума на някои инфертилни пациенти (Rumke and Hellinga, 1959), както и корелацията между фертилния статус и титъра на тези СА (Rumke et al., 1974), и до днес съществуват противоречиви становища относно чувствителността, специфичността и клиничната значимост на многобройните тестове за СА. Счита се също така, че не е достатъчно да се установи присъствието на СА, а също така е необходимо определяне на имуноглобулиновия клас, специфичността, локализацията и преди всичко титъра на тези антитела (Lenzi, 1986; Cropp and Schaff, 1990; Fichorova and Anderson, 1991; Gandini et al., 1991; Jarow and Sanzone, 1992; Fichorova and Nakov, 1993). Така напр., СА в серума и в цервикалния мукус, които реагират с антигени на сперматозоидната опашка, потискат транспорта на сперматозоидите през женския репродуктивен път, СА срещу антигени на сперматозоидната главичка, за които се счита, че са от важно клинично значение, повлияват взаимодействието на гаметите и водят до редукция на оплождането in vivo и in vitro (Bronson et al., 1982; Clarke et al., 1985; De Almeida et al., 1989). Наличието на тези СА обаче не оказва влияние върху параметрите, отчитани при семинологичния анализ, напр. общ брой, концентрация, подвижност на сперматозоидите (Adeghe et al., 1989; De Almeida et al., 1991).

Продукцията на спермоантитела (СА) е една от основните причини за имунологично обусловеното безплодие при човека (Nakov, 1996; Bronson, 1999). Поради това се счита, че диагностиката на СА в хода на изследването на субфертилни и инфертилни двойки, е от много важно клинично значение (Rumke et al., 1974; Bronson et al., 1984; Matson et al., 1988; Krapez et al., 1998) и е задължителна част от комплексен подход при пациенти с неизяснени причини за безплодието (Фичорова, 1993).

2.2. Изследвания върху хуморалния имунен отговор срещу нискомолекулни стресови протеини и участието им като антигени в имунопатологията

Hsp играят роля на модулиращи сигнали за имунната система. Повишените вътреклетъчни нива на Hsp допринасят за толерантността на клетката спрямо инфламаторни цитокини като TNFα и interleukin-1. Противно на това обаче, когато Hsp присъстват на повърхността на клетките или се освободят в непосредствената екстрацелуларна среда по време на некротична клетъчна смърт или вирусна инфекция, тези белтъци имат имуностимулиращо действие.

Съществуват данни, според които някои Hsp могат да участват в представянето на ендогенни и екзогенни пептиди и да взаимодействат с MHC молекулите в клетката (Manara GC. et al., 1993). Доказано е, че те могат неспецифично да усилват Т-клетъчния имунен отговор срещу даден антиген (Breloer M. et al., 1999; Chen W. et al., 1999). Съществува субпопулации от антиген представящи клетки (АПК), способни да интернализират комплекси Hsp/пептид и да осъществяват представяне на екзогенни пептиди посредством MHC клас I. Този процес на интернализиране се осъществява с участието на рецептор за Hsp, открит върху повърхността на АПК, означен като CD91.

2.2.1. Роля на Hsp при имунологично обусловено безплодие

Важно е да се отбележи, че Hsp се свръхекспресират на места на остро и хронично възпаление. Те са имунодоминантни антигени за редица микробни патогени напр. *E. coli, Salmonella spp*, както и за *Chlamydia trachomatis*- един от най-честите полово предавани микробни патогени при пациенти в репродуктивна възраст., (Cerrone, M.C. et al., 1997), което означава, че тези микроорганизми се разпознават от имунната система чрез представяне най-вече на Hsp епитопи и се индуцира имунен отговор срещу тези епитопи. Hsp са филогенетично консервативни - структурната хомоложност между Hsp на прокариоти и на бозайници е над 50% (Lamb, J.R. et al., 1989; Jones, D.B., 1993). Следователно, произведените антитела биха могли да реагират кръстосано с нормално експресиращите се в собствените тъкани Hsp със сходни или еднакви епитопи, както и с някои органноспецифични антигени, което може да доведе до отключване на автоимунен процес. (Kaufmann, S.H., 1990). Тоест, тези белтъци са връзката между инфекциозните и автоимунните заболявания. Това би могло да

има отношение към безплодието, както и към успеваемостта на техниките на асистиралата репродукция (ART), тъй като много безплодни двойки, след прекарани инфекциозни заболявания, може да са сенсибилизирани към Hsp епитопи. Няма обаче достатъчно данни за ролята на Hsp и особено за нискомолекулните стресови протеини (sHSP) в тези процеси.

Инфекцията с *C. trachomatis* при жените е основна причина за инфертилитет. Доказано е, че повечето пациентки с безплодие, дължащо се на тубарна оклузия са били изложени на персистираща хронична хламидиална инфекция (Kaufmann, S.H., 1990). Ин витро фертилизацията заобикаля изискванията за проходими фалопиеви тръби и така става възможно лечение за жени с оклузия или увреждане на фалопиевите тръби. Напоследък обаче започва да се отчита факта, че освен причина за тубарен блокаж, инфекцията води и до сенсибилизация към хламидиалните и човешки Hsp, която може да има негативни последствия и след оплождането, нарушения в имплантацията и ранната бременност (Spandorfer, S.D. et al., 1999 a,b). Изяснена е ролята на Hsp60, които се експресират първи в ранното ембрионално развитие, както и последиците от имунологична сенсибилизация към тях за репродуктивния изход при пациенти, подложени на ин витро оплождане (Witkin S.S. et al., 1997).

Поради мониторирането на пациентките, подложени на IVF, те са идеални за изучаване на ефектите от предшестващо сенсибилизиране към белтъците на топлинния шок върху предимплантационното развитие на ембриона и имплантацията. За да се оцени по-задълбочено дали хуморален имунитет срещу Hsp60 оказва влияние върху ембрионалнто развитие ин витро, е създаден модел с миши ембрионални култури. Така е доказано, че наличието на моноклонални антитела срещу Hsp 60 от бозайници значително нарушава ин витро развитието на миши ембриони (Witkin, S.S. et al., 1997).

Проведени са серия изследвания на концентрации на IgA срещу Hsp60 в цервикална слуз, фоликуларна течност и течност от хидросалпинкс и корелацията с изхода от бременността (Witkin, S.S. et al., 1997). Авторите достигат до изключително важни изводи, а именно: пациентки, подложени на IVF, които не съобщават за хламидиална инфекция, но са позитивни за цервикални антихламидиални IgA антитела в крайна сметка са с по-ниска честота на забременяване в сравнение с жените, отрицателни за тези антитела. Ин витро инкубирането на човешки ембриони в начални фази на делене, в среда съдържаща

майчин серум, е пагубна за ембрионалното развитие, ако серумът е позитивен за антитела срещу човешки Hsp60. В друго проучване същите автори доказват, че способността на човешките Hsp60 да предизвикат лимфоцитна пролиферация (клетъчно-медииран имунитет) корелира с анамнеза за ранни спонтанни аборти. Според тях, автоимунни реакции срещу Hsp60 вероятно повишава риска от ранна загуба на бременността.

Обобщените резултати от тези проучвания показват, че предхождаща инфекция с *Chlamydia trachomatis* и последващата имунологична сенсибилизация към епитопи на хламидиалните хитшокови протеини се свързва с лоша репродутивна прогноза и по-лош резултат от ин витро оплождането. Няма данни за ролята на нискомолекулните стресови протеини при хламидийни инфекции.

При асистираните репродуктивни технологии се извършват редица манипулации, които са стресови за ембрионите - преместване, оксидативен стрес, вариация в температурата и напълно променена заобикаляща клетъчна среда. Преждевременен трансфер в матката на етап 4-8 клетки може също да доведе до хранителен стрес (породен от промяна в условията на заобикалящата среда). Логично е да се предположи, че стресовите условия в ин витро култура усилват експресията на Hsp в ембрионите. Съответно на това е установено, че нивото на Hsp70 е 5 до 15 пъти по високо в култивирани миши ембриони (Christians, E. et al.,1995). Индуцираната експресия на Hsp поради фактори на заобикалящата среда и конститутивната Hsp експресия вероятно са основно изискване за успешно развитие на ембриона в променящата се околна среда. Свръхекспресията на Hsp в този случай е вероятно от полза за развиващия се ембрион. Обратно на това, недостатъчната Hsp експресия и имунен отговор срещу Hsp могат да доведат до фатални последици за растящия ембрион ин витро. В изследвания на Buteva-Hristova, I. et al., (2009) са установени повишени концентрации на антитела срещу α-кристалини в серуми от жени с репродуктивни неуспехи - неуспешно IVF, с неизяснени причини за безплодие и аборти.

2.3. HSP и ендокринни заболявания, свързани с инфертилитет

Много ендокринни заболявания се свързват с инфертилитет при жената: синдром на поликистозните яйчници (PCOS), автоимунен тиреоидит, хипертиреоидизъм, затлъстяване (Живкова и сътр. 2013). Механизмите за това са слабо проучени, но се предполага, че хормоналните нарушения не са

единствената причина за инфертилитет. Напоследък редица проучвания сочат експресията на стресовите протеини и имунния отговор срещу тях като важни фактори за нарушения в процесите на гаметогенеза, оплождане, имплантация, ранно ембрионално развитие и бременност, (Witkin S.S. and I.M. Linhares, 2010). Някои стресови белтъци се откриват само при нормални физиологични условия и изпълняват функциите на шаперони с клетъчно-протективна роля, като медиатори на сигнали, с роля във вродения и придобит имунитет. Други стресови протеини се експресират в отговор на стрес (промени в температурата, свободни кислородни радикали, инфекции, исхемия, шок и др.) с цел да защитят клетъчните белтъци от ефектите на стресовите фактори, (Witkin S.S. et al., 2000).

Синдромът на поликистозните яйчници засяга между 10 и 21% от жените в репродуктивна възраст, като в над две трети от случаите остава недиагностициран (Marsh et al.,2010; Boyle, J and H. J. Teede, 2012). Характеризира се с повишена концентрация на андрогени, често с видими изражения (акне, увеличено окосмяване), нередовна менструация и овулация, наличие в яйчника на множество кисти (т.е. неовулирали фоликули), понижена плодовитост и в редица случаи – инсулинова резистентност (поради намаляване на броя и чувствителността на инсулиновите рецептори в таргетните клетки) и компенсаторна хиперинсулинемия и наднормено тегло. Това са и диагностични критерии за PCOS. Значението на синдрома като водеща причина за инфертилитет заедно с неблагоприятното му отражение върху общото физическо и психологическо състояние на пациентките, обуславя обществената му значимост. Той е актуален проблем с демографско и социално изражение.

Причините за PCOS и механизмите, отговорни за неговото развитие, са сложни и все още не докрай изяснени. Смята се, че той до голяма степен е наследствено обусловен и е комплексно генетично заболяване, развиващо се в резултат на генетичното предразположение и взаимодействие с факторите на средата (Ben-Shlomo, I. and J. S. Younis, 2014). Освен генетичната теория в литературата се обсъжда и теорията за т. нар. „повишено адренархе” на Samuel Yen (1980). Според тази теория се наблюдава повишена секреция на мъжки полови хормони от надбъбречните жлези, които се метаболизират до женски полови хормони в подкожната мастна тъкан. Това води до повишена продукция от хипоталамуса на лутеотропен хормон в сравнение с тази на фоликулостимулиращ хормон (ФСХ), разрастване на яйчниковата тека интерна,

нарушения в развитието на фоликулите, повишена продукция на андрогени и патологичният процес се затваря чрез тяхното метаболизиране до естрогени в подкожната мастна тъкан (Н. Генов, 2006).

PCOS води до дълбоки промени в структурата на яйчника, развитието на фоликулите и диференцирането на овоцитите (Живкова и сътр., 2013). Самото име „синдром на поликистозните яйчници" предполага, че яйчниковите кисти са крайъгълният камък в патологията на заболяването. В действителност обаче PCOS може да се прояви дори при отсъствие на кисти. Наблюдават се и нарушения, засягащи надбъбречната кора, които не се нормализират след отстраняване на яйчниците (Aziz et al., 2013). Честотата на PCOS е неколкократно повишена при жени с диабет от I тип, което вероятно се дължи на приложеното интензивно лечение с инсулин (Codner et al., 2006). Налага се изводът, че овариалните кисти не са основна причина за PCOS, а по-скоро една от проявите на това комплексно състояние, чиято патология съвсем не се ограничава с устройството и функцията на яйчника. PCOS е най-честата причина за ановулаторно безплодие, като ановулацията се характеризира с арест на нарастващите и антралните фоликули.

В последно време при редица заболявания с неизяснена етиология се допуска роля на автоимунни процеси. В определени случаи тази роля е доказана, например при автоимунния тиреоидит (McLachlan, S. M. and B. Rapoport, 2000) и диабета от I тип, който е свързан с повишен риск от развитие на PCOS.

Различни колективи съобщават противоречиви данни за органно-неспецифичните автоантитела при пациентки с поликистоза на яйчника. Според някои автори концентрацията им е ниска и сравнима с тази при контролите (Peknicova et al., 2015), докато други откриват повишено съдържание на антитела срещу хистони и двуверижна ДНК при PCOS (Hefler-Frischmuth et al., 2010; Samsami et al., 2014). Доколкото обаче по своята клинична картина PCOS значително се отличава от типичните органно-неспецифични автоимунни заболявания, тези антитела най-вероятно са вторични и само съпътстват основното нарушение. Това предположение се подкрепя и от съобщенията на част от изследователите, че нивото на органно-неспецифичните автоантитела при PCOS се повишава след лапароскопска намеса (Samsami et al., 2014).

По-голям интерес представлява евентуалното наличие на органно-специфични автоантитела у жените с PCOS. На първо място, разбира се, следва да

се проучи хуморалният имунен отговор срещу антигените на най-пряко засегнатия орган – яйчника. Търсенето на анти-овариални антитела при пациентките с поликистоза обаче като цяло дава отрицателни резултати. Някои ранни изследвания съобщават за наличие на автоантитела срещу гранулозните клетки (van Gelderen & Gomes dos Santos, 1993), но са опровергани от по-късни публикации, според които анти-овариалните антитела при PCOS не показват значими разлики спрямо контролите (Rojansky et al., 1997; Luborsky et al., 1999; Alborzi et al., 2009).

Функцията на яйчника би могла да се наруши и от автоантитела, насочени не срещу негови компоненти, а срещу хипофизните хормони, регулиращи неговата функция. PCOS се отличава с повишено съотношение на лутеинизиращия към фоликуло-стимулиращия хормон. Във връзка с това интерес представляват наблюденията за асоциация на PCOS с антитела срещу фоликуло-стимулиращия хормон. Тези антитела обаче показват зависимост от броя проведени цикли на *in vitro* оплождане, което предполага, че най-вероятно се образуват в отговор на хормоналната стимулация на пациентките и нямат значение за патогенезата на самото заболяване (Haller et al., 2007).

Редица изследвания в последно време разкриват, че не яйчникът, а щитовидната жлеза често става прицел за автоимунна атака при PCOS. Публикация от 2003 г. установява значимо понижени концентрации на тироксин при поликистоза независимо от това дали пациентките са с наднормено тегло (Erel et al., 2003). Авторите не изследват причините за наблюдавания хипотиреоидизъм. На следващата година друг екип съобщава за трикратно повишена честота на автоимунен тиреоидит при PCOS – 26,9% срещу 8,3% при контролите (Janssen et al., 2004). В това изследване се регистрират нормални концентрации на щитовидните хормони, но наднормен тиреотропин се установява шест пъти по-често при поликистоза, отколкото при контролите (10,9% срещу 1,8%). Едно от цитираните по-горе съобщения за наличие на антинуклеарни антитела при PCOS установява значителна корелация между тяхното съдържание и концентрацията на тиреотропин в серума (Hefler-Frischmuth et al., 2010). Впоследствие и други автори потвърждават връзката между PCOS, хипотиреоидизъм (изявен или субклиничен) и автоимунитет (Kachuei et al., 2012; Al-Saab & Haddad, 2014; Peknicova et al., 2015; Calvar et al., 2015; Novais Jde et al., 2015; Arora et al., 2016). Доколкото тиреоидитът и нарушенията във функцията на

щитовидната жлеза често са субклинични към момента на изследването, много от цитираните автори препоръчват тази функция системно да се следи при пациентките с PCOS.

Корелацията между поликистоза и автоимунно увреждане на щитовидната жлеза е двупосочна: при изследване на подрастващи момичета с хроничен лимфоцитен тиреоидит се установява, че те много по-често от контролите имат PCOS – 46,8% срещу 4,3% (Ganie et al., 2010). Някои автори свързват хипотиреоидизма и анти-тиреоидните антитела не със самия PCOS, а с метаболитния синдром, който често го съпровожда (Anaforoglu et al., 2011). От друга страна обаче, установена е зависимост между повишеното съдържание на антитела срещу тиреоидната пероксидаза и прогнозата за лечение с естрогенния агонист-антагонист кломифен-цитрат, който е високо ефективен за инициация на овулацията при жени с PCOS. Съответните антитела се откриват по-често у жени, резистентни спрямо този препарат, отколкото у поддаващите се на лечение с него, и разликата е значима (Ott et al., 2010). Тази зависимост позволява да се предположи специфична причинна връзка между автоимунното възпаление на щитовидната жлеза, нарушението на нейната функция и поликистозните промени в яйчника.

Горният преглед на литературните данни очертава съвременното състояние на проблема. Както показва големият брой цитирани работи от последните години, познанията и схващанията в тази област се развиват бързо. Засега обаче в публикуваните трудове не е достатъчно изследвана връзката между PCOS и имунологично обусловеното безплодие. Според неотдавнашни изследвания на нашия колектив пациентки със синдрома на поликистозните яйчници, съпроводен с безплодие и затлъстяване, показват повишена концентрация на анти-спермални антитела в сравнение с контролната група и разликата е статистически значима (Gateva et al., 2014; Lazarov et al., 2015). Наличието на анти-спермални антитела може да се съчетава с повишена концентрация на антитела срещу антигени от други органи в имунологична изолация (Dinkova, 2016). Тази находка разкрива интересна връзка между PCOS и „неуместен" хуморален имунен отговор срещу антигени, спрямо които биологично оправдана е имунологичната толерантност. Необходими са обаче допълнителни изследвания, включващи широк набор от методи.

В заключение може да се каже, че изследванията върху възможната роля на автоимунитета в етиологията и патогенезата на PCOS и безплодието при човека, разкриват повишената опасност от развитие на тиреоидит при пациентките и така позволяват навременни мерки за лечение на евентуалния хипотиреоидизъм и безплодието. От фундаментално-научна гледна точка проблемът е интересен пример как един патологичен процес може да хвърли светлина върху сложните взаимовръзки между имунната система и различните отдели на ендокринната система и функционирането им като единно цяло, в което всяко възникнало нарушение може да има далечни последствия.

Наблюдава се връзка и между други ендокринни заболявания и инфертелитет и е търсена връзка с ролята на стресови протеини. Известно е, че експресията на стресовите протеини и имунният отговор срещу тях са тясно свързани с гаметогенезата, оплождането и ембрионалното развитие (Witkin, S.S and I. M. Linhares, 2010). При тези процеси са изследвани HSP60 и HSP70, но участието на sHSPs, включително αA- and αB-кристалините е слабо проучено. В наше предишно изследване сме доказали висока концентрация на антитела срещу α-кристалините в серумите на жени с неуспешно IVF, неизяснен инфертилитет, хабитуални и спонтанни аборти. Тези резултати насочват към наличие на имунологичен конфликт между майката и плода с участието на тези антитела (Buteva-Hristova et al., 2009). Експресията на някои стресови протеини е изследвана в случаи на ендокринни заболявания при двойки с безплодие. Съществуват данни за протективната роля на HSP72 при инсулин резистентен диабет тип I. Whitham M and MA Febbraio, 2010 доказват при някои случаи с диабет тип I повишени концентрации на антитела срещу HSP 60 и HSP70. Prumell MF и съавтори, 1977 доказват повишена концентрация на антитела срещу HSP72 при хипертиреоидизъм (Graves' disease) и обсъждат тяхната роля в патогенезата на заболяването. Оскъдни са обаче данните за експресията на αB-crystallin и имунен отговор срещу него при пациенти с ендокринни заболявания, свързани често с проблеми в репродукцията.

През последните десетилетия интересът към проблемите на имунологично обусловеното безплодие нараства. Данните за ролята на антигените в изолация, включително сперматозоидни антигени и нискомолекулни стресови протеини, върху процесите на оплождане, ембрионалното развитие и нормалното протичане на бременността, за сега са оскъдни. Поради това настоящият труд има за цел да

проследи хуморалният имунен отговор срещу антигени в изолация в семейни двойки с репродуктивни проблеми.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Поради големия интерес през последните десетилетия към проблемите на имунологично обусловеното безплодие и липсата на достатъчно данни за ролята на антигените в изолация, включително сперматозоидни антигени и нискомолекулни стресови протеини, върху процесите на опложданe, ембрионалното развитие и нормалното протичане на бременността, целта на настоящото проучване е да се проследи хуморалният имунен отговор срещу тях в семейни двойки с репродуктивни проблеми.

За осъществяване на поставената цел бяха разработени следните задачи:

1. Изолиране на алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и човешка очни лещи чрез физико-химични методи (гелна хроматография)
2. Получаване и характеризиране на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски пречистения алфа-кристалин на свинска очна леща.
3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в човешки ембрионални и фетални тъкани.
4. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация

   а) изследване за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез аглутинационни, имобилизационни методи и ELISA

   б) изследване за наличие на антитела срещу алфа-кристалини в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез ELISA

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Опитни животни

За получаването на антисерум срещу хроматографски изолирани класове кристалини на човешка очна леща, бяха използвани мъжки зайци, порода „Белгийски великан", на около 6 месечна възраст, с тегло 3,5 – 4,0 кг (Вивариум на - ИБИР, БАН).

При работата с опитните животни са спазени всички нормативни документи, свързани с използването на опитни животни в преподавателската и експерименталната работа: Закон за ветеринарномедицинската дейност, обн., ДВ, бр. 87 от 1.11.2005г., Наредба №15 от 3.02.2006 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, както и Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета на Европа от 22.09.2010г.

1.2. Антигени

- Водно-солеви екстракти от свинска очна леща ми бяха любезно предоставени от д-р Илиана Бътева – Христова, докторант към Катедрата по биология при МФ, МУ – София, защитила докторска дисертация през 2014г.
- Recombinant Human Crystallin Alpha B (CRYAB human), ProSpec – Tany TechnoGene Ltd.
- Нормален човешки серум и лиофилизирана плазма от Национален център по хематология и трансфузиология.

1.3. Антитела

1.3.1. Имунен серум срещу алфа-, бета- и гама кристалинови фракции (предоставени ми от д-р Н. Трифонова).

1.3.2. Моноспецифични серуми срещу нискомолекулните стресови протеини на фирмите Santa Cruz Biotechnology, Inc и Abcam

1.3.2.1. Срещу αB-crystallin (FL-175):sc-22744, Santa Cruz Biotechnology, Inc – заешко поликлонално антитяло

1.3.2.2. Срещу p-αB-crystallin (hSer 59) – R : sc-22509-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc, – заешко поликлонално антитяло

1.3.3. Второ антитяло – goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated; rabbit anti-human IgG, Sigma

1.3.4 Визуализираща система - за проследяване експресията на нискомолекулните стресови протеини в клетки и тъкани на репродуктивната система е използвана следната визуализираща система: Rabbit ABC Staining System: sc-2018, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

1.4. Материали от човек - ***При изследванията е спазен „Медицински стандарт по Клинична патология", Държавен вестник, бр. 82/27.08.2002г. и допълнения на Медицинския стандарт.***

1.4.1. Тъкани от ембриони (получени от аборти по желание) - парафинови блокчета предоставени от д-р Стефан Петров, началник на Отделение по Клинична патология, УМБАЛ „ Св. Анна", гр. София. Точната възраст на всеки ембрион бе определена в гестационни седмици (г.с.), считано от първия дена на последната редовна менструация.

1.4.2. Тъкани от човешки фетус - парафинови блокчета предоставени от д-р Н.Трифонова, Катедра по биология, Медицински университет-София.

1.4.3. Серуми от пациенти

Серумите от пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми са събирани и са ни предоставени и подробно описани с придружаващи данни за клиничния статус и лабораторните изследвания от Проф.д-р Здравко Каменов, Ръководител на Клиниката по Ендокринология и на Катедрата по Вътрешни болести на МФ. Контролните серуми са събирани в Лабораторията по имунология на размножаването към Катедрата по биология.

Част от серумите ни бяха любезно предоставени от Проф. д-р Ватев.

Контролните серуми бяха събирани в Лаборатория по имунология на размножаването към Катедрата по биология.

1.4.3.1. Серуми от пациенти за изследване на хуморален имунен отговор срещу антигени на сперматозоидите:

- 178 инфертилни жени с ендокринни заболявания (Синдром на поликистозните яйчници (PCOS) (n=69); Хипертиреоидизъм (n=26); автоимунен тиреоидит (Хашимото) (n=31), Диабет тип I (n=11), Затлъстяване (n=39)

- 104 от фертилни жени (контроли) в репродуктивна възраст

1.4.3.2. Серуми от пациенти за изследване на хуморален имунен отговор срещу алфа-кристалини:

- 169 жени с ендокринни заболявания (Синдром на поликистозните яйчници (PCOS) (n=68); Хипертиреоидизъм (n=26); автоимунен тиреоидит (Хашимото) (n=32), Диабет тип I (n=10), Затлъстяване (n=33)

- 60 фертилни жени (контроли) в репродуктивна възраст

Серумите бяха замразявани в микровидалови епруветки в количество по 200 мкл и съхранявани при -20˚C до провеждане на изследването за наличие на авто- и алоантитела срещу имунологично секвестираните антигени (анти-сперматозоидни и анти-алфа-кристалинови антитела).

2. Методи

2.1. Приготвяне на водно-солеви екстракти от свински очни лещи

Приготвени бяха екстракти от човешки и свински очни лещи за целите на имунодифузия във физиологичен разтвор, а за хроматографско разделяне на класовете кристалини в 0.05M Трис-HCl буфер с pH 7,5. След декапсулиране и механично хомогенизиране на очните лещи и последващо центрофугиране при 12 000g на 4˚C надстоящите течности бяха събирана и съхранявани на -20˚C до провеждане на изследването.

За приготвянето на екстрактите от очни лещи на човешки ембриони методът бе модифициран съобразно малките размери на лещите. Отделянето им извършвахме с помощта на стереомикроскоп и спринцовка, а хомогенизирането в малки стъклени видалки с помощта на стъклено бутало от шлифовано стъкло, пригодено към размерите на епруветката. Отделената след центрофугирането надстояща течност бе използвана в двойна имунодифузия за търсене на кристалини от различните класове.

2.2. Хроматографско изолиране на фракции от водно-солеви екстракти на човешки очни лещи

За целта бе използвана колона от Biogel A-5m, с обхват на фракциониране на глобуларни белтъци с молекулна маса от 10 до 5000 kD; с размери 2,6/94см. Елуентът бе буферът, с който е извършена екстракцията на кристалините. Нанасяни бяха проби от по 2 мл, с общо белтъчно съдържание 80мг. Елуентът бе събиран по 2.5мл в епруветки при едновременно автоматично определяне на белтъчното му съдържание със спектрофотометър при дължина на вълната 280nm и регистриране на белтъчната елуентна крива с рекордер. Като маркери за молекулни маси бяха използвани: Blue Dextran 2000 kD, Thyroglobulin 669 kD, Ferritin 440 kD, Aldolase 158 kD, Serum albumin 67 kD, Ovalbumin 43 kD, Chimotripsinogen A 25 kD. Събиран бе елуатът от епруветките, съответстващи на върховите участъци от всеки пик. Получените фракции бяха лиофилизирани и тестирани чрез двойна имунодифузия по Ouchterlony. Те бяха използвани за имунизация на опитни животни, като антигени в ЕЛИЗА за търсене на антитела срещу лещените кристалини в серуми на здрави лица и пациенти.

2.3. Имунизация на зайци за получаване на хиперимунен серум срещу алфа кристалин

Зайците бяха имунизирани с хроматографска фракция, съдържаща алфа- кристалин, изолиран от водно-солеви екстракт на свинска очна леща. Белтъчното съдържание на антигена бе доведено до 0,5 mg/ml. Той бе инжектиран подкожно на четири места в шийната област на заека по следната схема:

Първа имунизация - 500 μl от фракцията + 500 μl пълен адювант на Фройнд;

Втора имунизация - след 14 дни, 500 μl от фракцията + 500 μl непълен адювант на Фройнд;

Трета имунизация - след 14 дни, 500 μl от фракцията + 500 μl непълен адювант на Фройнд;

Седем дни след третата имунизация бе направено пробно кръвопускане чрез вземане на 0.5 ml кръв от ухото на заека и тестиране на отделения серум чрез двойна имунодифузия по Ухтерлони и ензимно свързан имуносорбентен метод (ELISA) за доказване на антитела срещу α-кристалините.

След 7 дни бяха взети 10мл кръв от ухото на заека. Кръвта беше оставена на 37°C за 1 час, след което съсирекът бе отделен от стените на епруветката и оставен за цяла нощ на 4°C. На следващия ден, отделеният като жълтеникава течност над кръвния съсирек, серум беше отпипетиран. След центрофугиране (1000g) за отстраняване на евентуално останали кръвни клетки, серумът беше разфасован в епендорфови епруветки по 500 μl и съхраняван на -20°C до употребата му.

2.4. Определяне на белтъчно съдържание на екстракти

Белтъчното съдържание на водно-солевите екстракти и фракции от очна леща бе определено спектрофотометрично при дължина на вълната 280 nm с използването на спектрофотометър, Amersham Pharmacia Biotech; Ultrospec 1000; UV/Visible Spectrophotometer.

2.5. Имунохистохимична оцветяваща техника

Тази техника позволява визуализация на наличието и локализацията на тъканни/клетъчни антигени. Тя се основава на свързването на специфичното първо антитяло с търсения белтък (алфаВ-кристалин), на второто маркирано с ензим антитяло с първото и реакцията на ензима с безцветен субстрат-хромоген, при което се образува цветен краен продукт. В настоящото изследване е използван индиректен метод за визуализация, включващ две стъпки, при който ензим-маркираното второ антитяло реагира с антиген-свързаното първо антитяло. Използвана е визуализираща система rabbit ABC Staining System: sc-2018 Santa Cruz biotechnology, Inc.

Изследването на експресията на нискомолекулните стресови протеини в репродуктивни клетки и тъкани на бозайници бе проведено върху парафинови срези. Последните бяха подготвени по следния начин:

1. Фиксиране на материала – използва се 10% формалин Merck, стандартни редици от алкохол и ксилол и включване в парафиново блокче.

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

3. Депарафиниране и рехидратиране

3.1. депарафиниране чрез процедури на преминаване на препарата през:

ксилол 1 – 10 мин.

ксилол 2 – 10 мин.

ксилол 3 – 10 мин.

3.2. Рехидратиране чрез последователно прекарване на препаратите през етанол – 100 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 % - х 5 мин., попиване с филтърна хартия и промиване с дестилирана H_2O.

4. Визуализация при спазване на протокола на производителя на кита, който включва следните стъпки, проведени при стайна температура във влажна камера.

- Препаратите се инкубират за 5 -10 минути в 0,1 до 1,0% H_2O_2 в PBS за блокиране на ендогенната пероксидаза.

- Блокиране с 2,5 % конски серум за 30 мин., изтръскват се хубаво от блокиращия буфер.

- Накапване на първо антитяло – за една нощ в хладилник при 4ºC. Като първо антитяло са използвани хиперимунен заешки серум срещу алфа-кристалин и фирмени антитела срещу алфа-кристалин и Hsp27 (Santa Cruz biotechnology, Inc).

- Миене 3 х 5 мин. с PBS в кювета.

- Накапване на второ антитяло за 30 мин. Като второ антитяло в кита е включен мише анти-заешко антитяло на Santa Cruz biotechnology, Inc

- Миене 3 х 5 мин. с PBS 1 х

- АВ ензимен реагент (avidin и biotinilated horseradish peroxidase) се накапва и плаките се инкубират 30 мин.

- Миене 3 х 5 мин. с PBS 1 х

- Проявяване с DAB :

– 5 ml d H_20 + 2 капки буфер – разбърква се + 4 капки от р-р на DAB разбърква се + 2 капки H_2O_2 - разбърква се, накапва се върху средата до покафеняване и реакцията се стопира с d H_2O

(проявяването се осъществява на тъмно)

- Оцветява се с Hematoxylin неразреден за 25 сек.

и изплакване с чешмяна вода – 10 – 15 мин.

- Дехидратиране – етанол 50 %, 70 %, 90%, 96%, 100 % - х 5 мин.

- Ксилол 4 и Ксилол 5 – х 5 мин.

Препаратите внимателно се подсушават се с филтърна хартия, слага се по една капка канадски балсам + покривно стъкло, въздухът се изгонва внимателно с леко натискане на покривното стъкло и препаратите се оставят до следващия ден да изсъхнат. Наблюдават се под микроскоп. Като позитивна реакция (експресия на кристалини) се приема наблюдаването на кафяво оцветяване на различни клетъчни участъци според локализацията на търсения антиген.

Отчитането на имунохистохимичните реакции е извършено в Катедрата по биология и Отдел „Научна Документация" МУ-София с използването на инвертен микроскоп Olympus SC30 и на микроскоп Amplival, Carl Zeiss. Резултатите са онагледени на снимки, направени на използваните микроскопи.

2.6. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA)

Принципът на ензимносвързан имуносорбентен тест (ELISA) може да бъде обобщен по следния начин: единият от компонентите на реакцията антиген-антитяло (антигенът или антитялото) е адсорбиран върху твърда фаза (напр. полистиролови плаки); вторият компонент е свързан пряко или непряко с ензим; реакцията се визуализира в резултат на ензимното превръщане на съответен субстрат в продукт, който дава възможност за визуализация и автоматично отчитане на реакцията.

Индиректната ELISA протича в следните основни етапи:

1. натоварване на ямките на плаката с антиген (антигенът се свързва неспецифично към пластмасовите ямки)
2. блокиране на останалите несвързани места в ямките чрез прибавяне на индиферентен белтък (напр. албумин, сухо мляко) или с Tween в неколкократно по-голяма концентрация от тази в миещия буфер
3. инкубиране с антитяло (нарича се първо антитяло), най-често това е търсеното антитяло, или антитялото, което се охарактеризира
4. инкубиране с конюгирано с ензим антитяло (второ антитяло), свързващо се специфично с първото антитяло
5. прибавяне на субстрат и наблюдаване на цветна реакция

6. след стопиране с 10% сярна киселина отчитане при дължина на вълната 492nm.
7. Между отделните стъпки плаките се измиват трикратно за отстраняване на несвързаните реагенти (антигени и антитела) с миещ буфер

За характеристика на имунния серум ELISA бе проведена по следния начин:

Антигенът бе накапван върху 96-ямкова PVC плака (U-bottm, Costar, Cambridge, USA) по 50 μl/ямка антиген разтворен в 0,05 М карбонатен буфер ($NaHCO_3/Na_2CO_3$, pH 9,6) и плаките бяха инкубирани на стайна температура 1 час и на 4^0C за 16-18 часа. Използвани бяха следните антигени: хроматографски пречистен алфа-кристалин с б.с. 7μg/ml; нормален човешки серум и алфа-кристалин в падащи разреждания.

- 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.
- След трикратно промиване с миещ разтвор, плаките бяха инкубирани за 120 мин. на стайна температура с по 50 μl/ямка от антисерума в падащи разреждания (в блокиращ буфер) за титриране на серума и в постоянно разреждане срещу антигени в падащо разреждане.
- Плаките бяха отново промити и инкубирани за 60 мин. на стайна температура с по 50 μl /ямка анти-заешко IgG, белязано с пероксидаза в подходящо разреждане в блокиращ буфер.
- След трикратно промиване ензимната активност бе проявена с по 50 μl/ямка разтвор на o-phenylendiamine (OPD) (Sigma, USA) в цитратен буфер (pH 5,0), съдържащ 0,015% H_2O_2 , стопиране с 10% сярна киселина и оптичната плътност бе отчетена на ELISA-ридер (Labsystems Multyscan) при дължина на вълната 492 nm.

За доказването на анти-лещените антитела (ALAbs) бе приложен ензим-свързан имуносорбентен тест, адаптиран за целта от нас. След адсорбиране на антигена ненатоварените протеинсвързващи места на плаката бяха блокирани за 60 минути на 37^oC с 150 мкл на ямка 0,2% Tween 20 /PBS. Изследваните серуми, предварително разредени 1:100 в PBS, бяха накапвани в обем по 50 мкл на ямка.

OD стойностите на серумите от контролната група бяха използвани за определяне интервала на физиологичното ниво на серумни имуноглобулини, реагиращи с антигените на очната леща. OD стойности, по-високи от средната стойност на OD на контролната група плюс два пъти стандартното отклонение бяха приети за сигнификантно повишени спрямо физиологичното ниво и серумните проби бяха отчетени като високо титърни положителни за анти-лещени антитела.

За доказване на анти-сперматозоидни антитела чрез ELISA сперматозоиди бяха имобилизирани на PVC плаки, предварително третирани с poly-L-lysine Hydro bromide, и след това фиксирани с 30% метанол . *ELISA* индекс I беше определен по формулата $I = A/B$, където A е оптичната плътност на тестирания серум, а B е средната стойност на оптичната плътност на всички серуми от тестираната група; Определена бе бариерна стойност за *ELISA* $I_b = \bar{x} + 2SD$, където $\bar{x}$ е средната стойност на оптичната плътност на серумите от контролната група, а *SD* е стандартното отклонение. Серуми с $I \geq I_B$ бяха приети за положителни.

Буфери:

Цитратен буфер, pH 5.0:

1.03g лимонена киселина, 3.67g Na_2HPO_4, 100ml dH_2O.

PBS pH 7.2:

0.24g KH_2PO_4 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4, 8.0g NaCl, 1L dH_2O.

Блокиращ буфер, pH 5.8-8.2:

1% телешки албумин в буфера (1.21g Tris HCl, 2.94g NaCl, 100ml dH_2O).

Карбонатен буфер, pH 9.6:

0.159g Na_2CO_3, 0.293g $NaHCO_3$, 100ml dH_2O

2.7. Методи за доказване на антитела срещу сперматозоиди

Освен чрез ЕЛИЗА антитела срещу сперматозоидни антигени могат да бъдат установени чрез голям брой методи при изследване на кръвен серум, семинална плазма, сперматозоиди и цервикален мукус в специализирани центрове

по репродуктивна медицина. Голяма част от тези методи са включени като стандартни протоколи в съответни издания на Световната Здравна Организация (Rose et al., 1976; WHO Reference Bank for Reproductive Immunology, 1977). Методите за доказване на спермоантителата (AS Abs) са описани детайлно от други автори и модифицирани в нашата лаборатория. При всички тестове за СА бяха използвани ”swim up” сперматозоиди от здрави донори.

Най-широко използвани са методите за определяне на серумни антитела от имуноглобулиновите класове IgG, IgM и IgA. Те могат да бъдат открити с прилагането на:

2.7.1. Спермоаглутинационни тестове

Феноменът, на базата на който се провеждат тези методи, е слепването на сперматозоидите в големи групи, които са видими с невъоръжено око - желатинов спермоаглутинационен тест – GAT, на Kibrick или се отчитат микроскопски - тест на Franklin-Dukes - TSAT, и микроспермоаглутинационен тест на Friberg – TAT, на Friberg. Аглутинацията зависи от разположението по сперматозоидната повърхност на антигените, срещу които са насочени специфични антитела. В образуваните аглутинати подвижността на сперматозоидите е запазена. Тези методи изискват използване на донорни спермални проби с високо качество и при тяхното провеждане изследваните пациентски серуми се прилагат в серии от падащи разреждания (Ватев, 1977). Това позволява определяне на титъра на тестирания серум, като най-често, според литературните данни, както и в нашата лаборатория, за клинично значими се приемат при GAT титри = или > 16, а при TAT – титри = или > 32. Според разработената от експерти на СЗО класификация (Rose et al., 1976) се различават 5 основни типа аглутинация: глава с глава (head to head, h-h); опашка с опашка (tail to tail, t-t); опашен край с опашен край (tail tip to tail tip, tt-tt); смесена (mixed, m) – едновременно се наблюдават ясно групи сперматозоиди, аглутинирани глава с глава и други – опашка с опашка; т.нар.тангентна (tangle, t) – сперматозоидите са с усукани опашки, като главите се допират до опашките. Типовете аглутинация показват локализацията на участващите в реакцията аглутиногени.Счита се, че СА, предизвикващи аглутинация от типа t-t, са главно от IgG клас и се доказват по-добре с теста на Kibrick, докато аглутинацията от типа h-h се свързва с антитела от IgM клас и GAT е относително нечувствителен за откриването й (Shulman, 1986). Тестът на

Friberg- TAT, е чувствителен метод за доказване на спремоаглутинини от двата типа. Методът, който ние използваме е микроспермоаглутинационен тест на Фриберг, който дава възможност за качествена оценка (като тип на аглутинацията) и количествена оценка (титър) на спермоаглутинационната активност на изследвания серум.

2.7.2. Аглутиниращ тест на Фриберг (TAT)

В ямките на микротитърни плаки на Terassaki бяха накапвани по 5 мкл серуми, тестирани в падащи разреждания. Повърхността на плаката беше покрита с течен парафин с помощта на Пастьорова пипета. Донорна нормоспермична еякулатна проба бе втечнявана на 37˚C за 30 минути и разредена с 0,1% разтвор на глюкоза в PBS, pH 7,2 до крайна концентрация на сперматозоидите 40.10^6 /мл. Глюкозният разтвор бе внимателно надслояван с тънка пастьорова пипета над спермалната проба, която след това беше поставяна в термостата при 37˚C за 1 час под ъгъл 45˚. Към всяка ямка под парафина бяха накапани по 1 мкл от аспирирания надстоящ слой на спермалната проба (счита се, че подвижните жизнени сперматозоиди са “изплували” в горния надслоен глюкозен пласт, наречен “swim up” феномен). Накапването се извършваше чрез спринцовката на Хамилтон, като се започваше от най-малкото серумни разреждане и между отделните серуми се изхвърлят по две стъпки (2 мкл). Плаката бе инкубирана за 1 час при 37C и резултатът отчитан под инвертен микроскоп. Определян беше типът на аглутинацията и степента на аглутинацията. Като контроли бяха използвани: PBS, отрицателен серум, познат положителен серум, предварително титриран.

2.7.3. Спермоимобилизираща тест на Изожима (SIT)

Основното явление, което се отчита, е имобилизацията на спрематозоидите с участието на комплемент, т.е. откриват се антитела от IgM и IgG (без IgG4 субклас) класове, които могат да фиксират комплемента. За позитивиране на тези тестове от значение е и мястото на свързване на антителата върху сперматозоидната повърхност. Много антитела срещу антигени на сперматозоидната главичка не водят до загуба на подвижността, макар, че намаляват способността за пенетрация в клетката.

SIT е високо специфичен, фалшиво положителни резултати се наблюдават рядко. Счита се, че SIT е по-малко чувствителен от спермоаглутинационните тестове, което се свързва с факта, че спермоаглутиниращите антитела не винаги принадлежат към комплемент-фиксиращи имуноглобулинови класове (Bronson et al., 1982; Shulman, 1985). Спермоимобилизиращият тест в неговия полуколичествен вариант се основава на реакция спермоимобилизация в присъствие на комплемент и се отчита полуколичествено (титър) и ниво на спермоимобилизация (SIV) на изследвания серум.

Микротестът на Изожима бе провеждан като във всяка ямка на микротитърна плака Terassaki бяха накапани по 10 мкл от съответния серум. Плаката беше покривана с течен парафин по 2 мкл неинактивиран комплемент или по 2 мкл инактивиран комплемент (съответно в две ямки), предварително тестиран за спермоцитотоксичност и активност. Инактивирането на комплемент се провеждаше на водна баня при 56˚C за 30 минути. След това във всяка ямка бе накапана по 1 мкл сперматозоидна суспензия чрез спринцовката на Хамилтон. Спермалната проба трябваше да отговаря на същите изисквания и бе обработена по същия начин, както при спермоаглутинационния тест. Плаките бяха инкубирани за 1 час на 37˚C в термостата, след което резултатът беше отчетен качествено под инвертен микроскоп.

За определяне на статистически значимо повишени концентрации анти-сперматозоидни и анти-кристалинови антитела в серумите на изследваните пациентки и контролни лица е проведен статистически анализ с използването на χ^2 test, Mann-Whitney test, Fisher's exact test.

2.8. Двойна имунодифузия по Ухтерлони

Приложен бе микровариант на метода двойна имунодифузия в агаров гел по Ухтерлони. Върху диапозитивни стъкла 37/35 мм бе разливан 1% разтвор на агар Difco Laboratories във физиологичен разтвор при дебелина на слоя 1.5 мм. След втвърдяването на гела бяха изрязани ямки с диаметър 6 мм на разстояние 5 мм по шаблон. Пробите бяха инкубирани 12 часа на стайна температура и 48 часа в хладилник във влажна камера. След промиване на плаките във физиологичен разтвор 48 часа, те бяха изсушени в термостат под филтърна хартия и оцветени с 0.5% с Coomassie brilliant blue R-250.

2.9. Абсорбиране на заешки имунен серум със суха човешка кръвна плазма

За отстраняване на ‘’неспецифично взаимодействащите антитела в поликлоналния заешки серум с протеини, намиращи се в нормалния човешки серум бе осъществена абсорбция на заешкия серум с нормален човешки серум и с нормален миши. За целта към 5 мл от имунния заешки серум беше прибавено 500 мг суха кръвна плазма и съответно равен обем миши серум. Сместа бе инкубирана за една нощ на 4^0C. На следващия ден серумът бе центрофугиран на 5000 об. за 20 мин, за да се отделят получените агрегати от комплексите антиген-антитяло.

2.10. SDS-PAGE

Полиакриламидна гел електрофореза (PAGE) е техника, използвана за разделяне на макромолекули, обикновено протеини или нуклеинови киселини, според тяхната електрофоретична подвижност. Последната е функция на големината, конформацията и заряда на молекулата. В нашата работа методът бе използван за доказване на състава и чистотата на фракциите I, IIа, IIб, IIв на свинска леща, получени чрез гелна хроматография.

Използвани бяха следните буфери и разтвори:

Буфер за разделящия гел pH 8.8 (4 пъти концентриран)
Трис 18.16 g в 50 ml дест вода; корекция на pH с 1 M HCl;
10% SDS 4 ml;
довеждане до 100 ml с дест. вода

Буфер за концентриращия гел pH 6.8 (4 пъти концентриран)
Трис 6.056 g в50 ml дест вода; корекция на pH с 1 M HCl;
10% SDS 4 ml;
довеждане до 100 ml с дест. вода

Електрофоретичен буфер pH 8.3
3.02 g Tris +14.4 g Glycine + 1 g SDS, довежда се до 1 литър с дестилирана вода.

Буфер за пробите за електрофореза при редуциращи условия

Глицерин	1 ml
2-меркаптоетанол	0.5 ml
10% SDS	3 ml
Stacking buffer pH 6.8	1.25 ml
0.1% Bromophenol Blue	

Пробата се смесва с буфера в равни части и се кипи на водна баня 5 мин, след което се нанася в кладенчетата на гела.

Буфер за пробите за електрофореза при нередуциращи условия

Глицерин	1 ml
10% SDS	3 ml
Stacking buffer pH 6.8	1.25 ml
0.1% Bromophenol Blue	

Оцветяващ разтвор

Coomassie Brillant Blue – 0.5 g

CH_3OH	100 ml
CH_3COOH	20 ml
Дестилирана вода	80 ml

Обезцветяващ разтвор

CH_3OH	180 ml
CH_3COOH	40 ml
дест. вода	220 ml

Според очакваната молекулна маса на белтъците, бе използван разделящ гел (running gel) 12% и концентриращ гел (stacking gel) 4,5%.

Running gel 12%

- Acrylamid 2400 µl
- Running buffer 1500 µl
- Aqua distillata 2070 µl
- Am. Persulfate 10 % - 30 µl
- TEMED 6 µl

Буфер за концентриращия гел 4.5%

- Acrylamid 390 µl
- Stacking buffer 650 µl
- Aqua distillata 1534 µl
- Amm. persulfate 10% - 50 µl
- TEMED 3 µl

ОСНОВНИ СТЪПКИ

Касетата бе сглобявана по указанията на фирмата производител (LKB)

Концентриращият и разделящ гел бяха изливани последователно по метода на Laemmli. В концентриращия гел се поставяше гребенче за очертаване на кладенчетата за нанасяне на пробите. Тъй като въздухът инхибира полимеризацията на акриламида, разделящият гел се покриваше с тънък пласт от вода с изопропилов алкохол. След пълното и хомогенно полимеризиране изопропанолът се отстраняваше и се изливаше концентриращия гел.

При нередуциращи условия пробата се смесваше със съответния буфер в равни части, след което се нанася върху гела. При редуциращи условия пробата се

смесва със съответния буфер в равни части, след което се кипваше на водна баня 5 минути и нанасяше в кладенчетата на гела. Електрофорезата протичаше при следните условия: докато пробата е в концентриращия гел се поддържаше напрежение 80 V, а след навлизане в разделящия гел се задаваше напрежение 140 V.

За визуализиране на белтъчните ивици след приключване на електрофорезата гелът се оцветяваше с 0,25% Coomassie Brillant Blue в оцветяващ разтвор за една нощ при стайна температура. Обезцветяваше се в обезцветяващия разтвор до изчистване на фона.

2.11. Western блот

Методът се състои в пренасяне на електрофоретично разделени (чрез PAGE, IEF, или двумерна електрофореза) белтъчни молекули (антигени) върху имобилизиращи мембрани. Това дава възможност антигените да бъдат идентифицирани чрез свързването им със съответни антитела и последващо визуализиране на свързването.

В нашето проучване антигените се разделят електрофоретично чрез SDS-PAGE и се прехвърлят върху PVDF Hybond-P мембрана. Последната се блокира с 3% обезмаслено мляко в TRIS-буфер. Имунните серуми (произведени от нас и закупени от Santa Cruz), разредени съобразно получените при титрирането в ELISA резултати или по инструкциите на фирмата производител, се нанасят върху PVDF стриповете. След инкубация за една нощ при 4°C се инкубират с второ антитяло (анти-заешки IgG, конюгиран с пероксидаза, специфичен за гама веригата) в разреждане 1:5 000 за 1 час на стайна тепература. Между всяко стъпало се извършва трикратно миене с PBS, съдържащ 0.05% Tween-20; Ивиците се визуализират с използването на DAB и реакцията се стопира след 10 минути с дестилирана вода.

Буфери

за пренос - 25 mM Tris, 192 mM глицин, 20% етанол

Ponceau S (0,1% Ponceau S; 5% methanol)

блокиращ буфер – TTBS (трис буфериран физиологичен разтвор, pH7,9, съд.0,2% Tween-20)

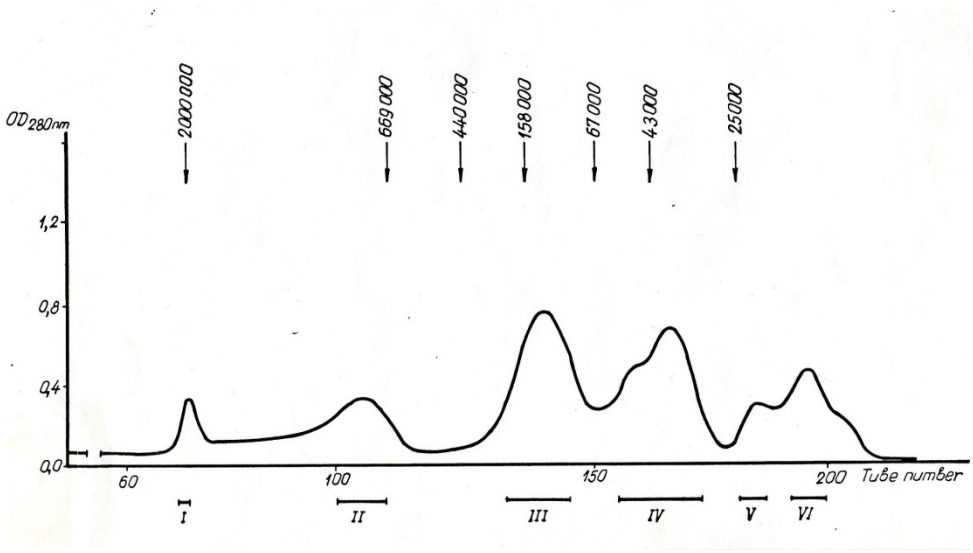
Основни стъпки:

- След приключване на разделянето (чрез PAGE), гелът се инкубира за 10 мин. в буфер за пренос
- В буфера за пренос се сглобява "сандвич", съставен от 3 броя филтърна хартия Whatman, нитроцелулозната мембрана, гела, 3 броя филтърна хартия Whatman.
- "Сандвичът" се поставя в електроблотера ориентиран по следния начин: катод - филтърна хартия – гел - мембрана – филтърна хартия – анод.
- Преносът се осъществява при 0,8 mA на кв. см. за около 1 час.
- След края на преноса, мембраната се оцветява с разтвор на Ponceau S и след оценка на преноса, багрилото се отмива с дестилирана вода.
- Нитроцелулозната мембрана се поставя за 1 час в блокиращ буфер при 37^0C за блокиране на свободните белтък-свързващи места.
- Инкубиране за 2 часа със съответните антитела при 37^0C.
- След трикратно измиване по 10 мин. с TTBS, мембраната се инкубира с второ ензим-белязано антитяло за 1 час при 37^0C.
- Следва ново измиване – двукратно с TTBS и еднократно с TBS.
- Реакцията се визуализира чрез инкубиране на мембраната с хромогенен субстрат (например при ензим пероксидаза субстратът е DAB или AEC (3-amino-9-ethylcarbazole), разтворени в 1 мл диметилформамид и прибавени на капки към 4 мл Na-ацетат (0,1 M; pH 4,0) и 20 μl H_2O_2.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Изолиране на алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и на човека очни лещи чрез физико-химични методи (гелна хроматография)

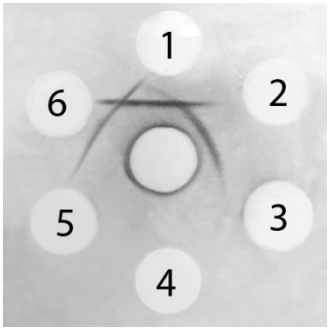
За изолиране на алфа-кристалини от екстракти на човешки и свински очни лещи бе приложена гелна хроматография върху Biogel A5m.



Фиг. 1 Гелна хроматограма на водно-солеви екстракти от очни лещи на възрастни хора, предоставени ми от Проф. Трифонова върху Biogel A-5m. Размери на колоната 2,6/104, нанесена проба от 2 ml, с белтъчно съдържание 80 mg, елуентен разтвор 0,05M TRIS буфер pH 7,2, скорост на изтичане на елуата 2,5 ml/min, обем на елуата в епруветка по 5ml. Като маркери за молекулни маси са използвани: Blue Dextran 2000 kD, Thyroglobulin 669 kD, Ferritin 440 kD, Aldolase 158 kD, Serum albumin 67 kD, Ovalbumin 43 kD, Chimotripsinogen A 25 kD.

Получената елуентна крива (фиг.1) има пет пика. Първият пик включва фракции, които изтичат с празния обем на колоната и съдържа белтъци с молекулна маса съответстваща на маркер 2000 kD. Алфа-кристалините (с молекулна маса над 44kD) се съдържат във втория пик, формиран от белтъци с молекулна маса около 670 kD. Третият и четвъртият пик включват белтъци с молекулна маса, съответна на бета кристалините, която по литературни данни е между 28 и 220 kD. Петият пик съдържа белтъци с мол. маса, съответстваща на гама кристалините, които са полипептиди с мол. маса под 25kD.

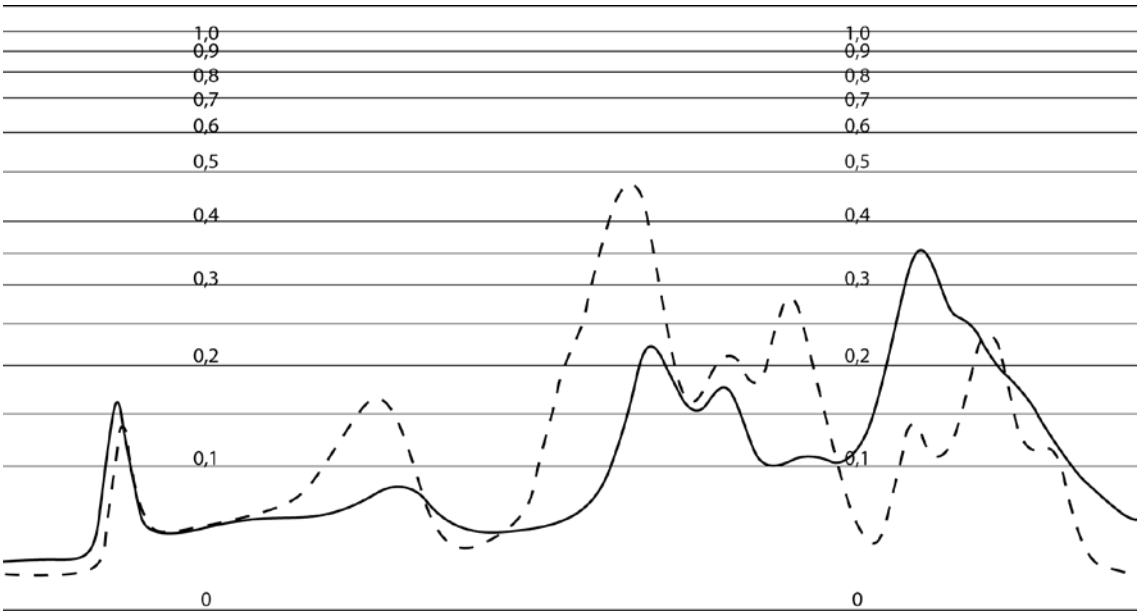
Събраните фракции от всеки пик бяха тестирани чрез двойна имунодифузия по Ухтерлони с използването на заешки хиперимунен серум срещу екстракт от човешка очна леща (ЗАЛС), предоставен ми от проф. Трифонова.



Фиг. 2 Двойна имунодифузия в агаров гел
В централната ямка е накапан ЗАЛС, а в периферните ямки: 1 – събрани фракции от втори пик 2; 2 – събрани фракции от пети пик; 6 – събрани фракции от трети и четвърти пик; 3, 4, 5 – физиологичен разтвор

Резултатите показват, че приложената гелна хроматография дава възможност за изолиране на отделните класове кристалини от човешки лещи, но получените количества са недостатъчни - вторият пик е със сравнително ниска екстинкция за белтъчно съдържание.

За преодоляване на това ограничение проведохме сравнителни хроматографски експерименти със екстракти от човешка и свинска очна леща (фиг. 3)

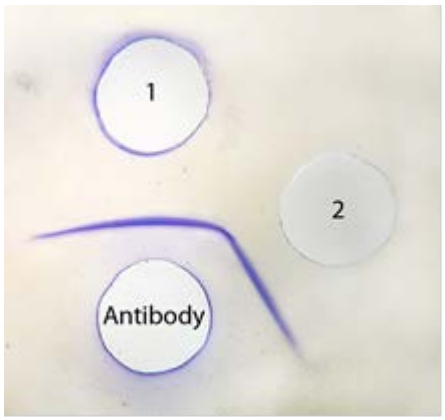


Фиг. 3. Гелна хроматограма на водно-солеви екстракти от свински лещи (отбелязани с пунктир) и от фетални човешки очни лещи (отбелязани с непрекъсната линия) върху Biogel A5m. Размери на колоната 2,6/104, нанесена проба от 2 ml, с белтъчно съдържание

80 mg, елуентен разтвор 0,05M TRIS буфер pH 7,2, скорост на изтичане на елуата 2,5 ml/min, обем на елуата в епруветка по 5ml. Върху абсцисата са представени поредните фракции (от 60-та до 210-та).

Получените елуентни криви имат по пет добре оформени пика. Първият пик включва фракции, които изтичат с празния обем на колоната и съдържа кристалини от трит класа, вторият пик съответства на интересуващите ни алфа- кристалини, третият и четвъртият съответстват на бета-кристалините, а петият пик на гама кристалините.

Фракциите, включени във вторите пикове от хроматографското разделяне на белтъците от екстрактите на човешка и свинска очна леща, бяха тестирани за антигенно сходство чрез двойна имунодифузия по Ouchterlony. Резултатите са представени на фиг. 4.

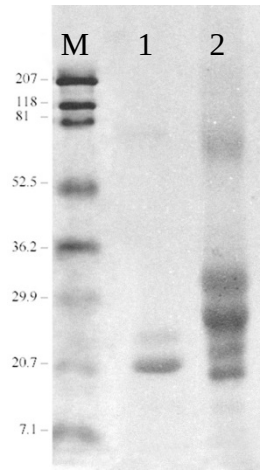


Фиг. 4. Двойна имунодифузия по Ouchterlony в 1% агаров гел. В централната ямка е накапан серум, съдържащ антитела срещу изолирани алфа-кристалини на човешка очна леща. В ямка 1 е накапан α-кристалин от човешка очна леща, а в ямка 2 – α-кристалин от свинска очна леща.

От фигурата се вижда, че алфа-кристалините от двата екстракта (от свинска и от човешка очна леща) реагират с антителата срещу човешки алфа-кристалини като образуват по една добре изразена преципитационна ивица. Двете ивици се сливат в израз на пълна антигенна идентичност.

За по-нататъшните изследвания е използвана фракцията на алфа-кристалините от свинска очна леща.

Чистотата на тази фракция бе проверена чрез полиакриламидна електрофореза (фиг.5).



Фиг. 5 SDS PAGE на фракцията от втори пик, получена чрез гелна хроматография на екстракт от свинска очна леща. В старта М е поставен стандартен маркер за молекулна маса, с 1 – изследваната фракция (втори пик), 2 – пълен екстракт от свинска очна леща

Както се вижда от фигурата, алфа-кристалините дават две ивици в областта на 20 – 25 кD, т.е. те съдържат двете субединици, съответстващи на – αA- и αB-кристалините.

2. Получаване и характеризиране на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски пречистения алфа-кристалин на свинска очна леща

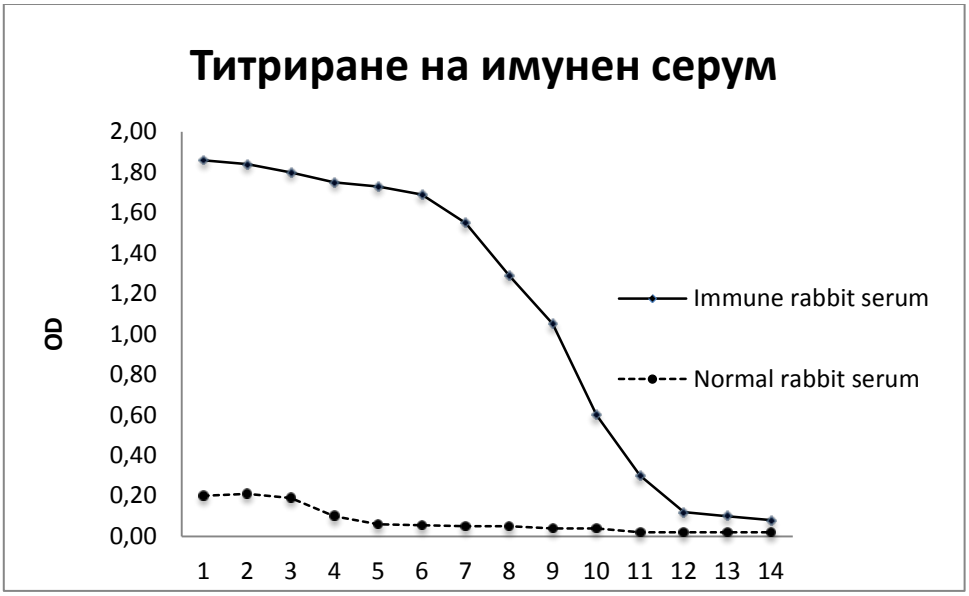
С така получената фракция, съдържаща алфа-кристалини, беше проведена субкутанна имунизация на зайци от породата Белгийски великан по схема, описана в главата „Материали и методи”. След пробно кръвопускане и доказване наличието на анти-кристалинови антитела, беше направено кръвопускане на 10 мл кръв от ушната вена и получен около 5 мл хиперимунен серум.

Характеристиката на серума включва определяне на неговия титър и доказване на специфичността му.

2.1. Определяне титъра на серума

Титърът на серума беше определен чрез тестиране в падащи разреждания срещу постоянни концентрации на антигена (алфа-кристалини) с използване на ензимносвързания имуносорбентен метод (ELISA). 96 ямкова полистиренова (PS) плака бе натоварена с алфа-кристалин с белтъчно съдържание 5μg/мл в 0.05M карбонатен буфер pH 9,6. Полученият имунен серум е накапан в двукратни повторения в падащи разреждания от 1/100 до 1/800000. Като контрола е

използван в същите падащи разреждания серум, получен от заека преди започване на имунизацията. Резултатите от титрирането на серума са представени на фиг . 6.



Фиг. 6. Тестиране на имунния заешки серум (като контрола – неимунен заешки серум, получен от заека преди започване на имунизацията) в падащи разреждания от 1:100 до 1:800 000 срещу алфа-кристалин с постоянна концентрация – 5мкг/мл

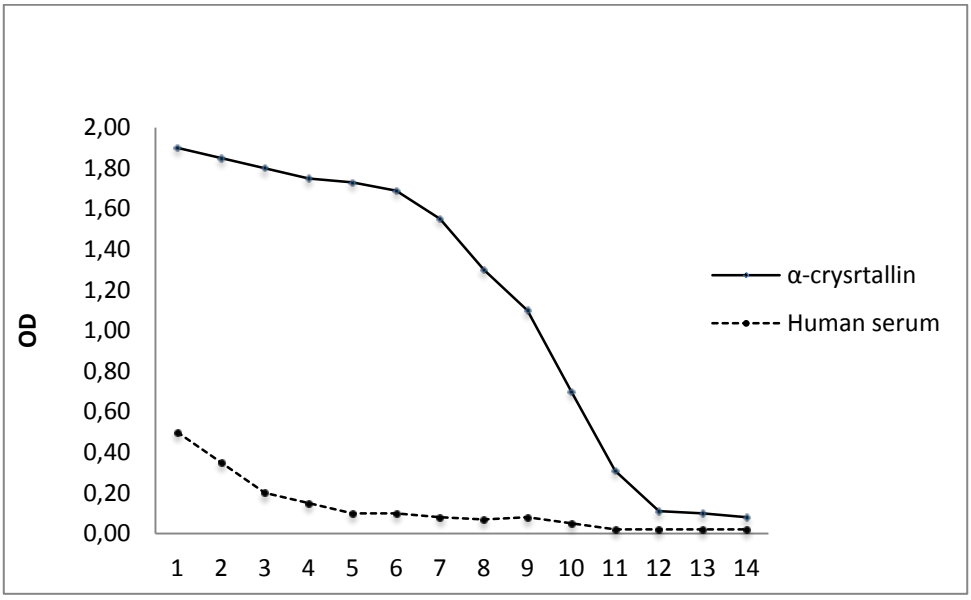
Получената графика показва, че заешкият имунен серум срещу алфа-кристалин реагира дозо-зависимо, което е указание за специфичен характер на реакцията антиген-антитяло. Най-силна е реакцията при концентрация на серума 1/100 – отчетена екстинкция над 1.86. С намаляване на концентрацията екстинкцията спада до стойност около 0.08 при разреждане 1/200 000. Контролният нормален заешки серум дава слаба реакция срещу антигена до разреждане 1:400 и няма реакция след това разреждане.

Въз основа на данните от титрационната крива като най-подходящо работно разреждане в ELISA бе избрано 1/12 000.

2.2. Оценка на специфичността на серума и довеждането му до моноспецифичност

За да се провери наличието на кръстосано реагиращи антитела или на антитела с други специфичности в заешкия имунен серум, същият бе тестиран чрез

ELISA срещу падащи разреждания на нормален човешки серум и съответния антиген (алфа-кристалин) (фиг. 7.)

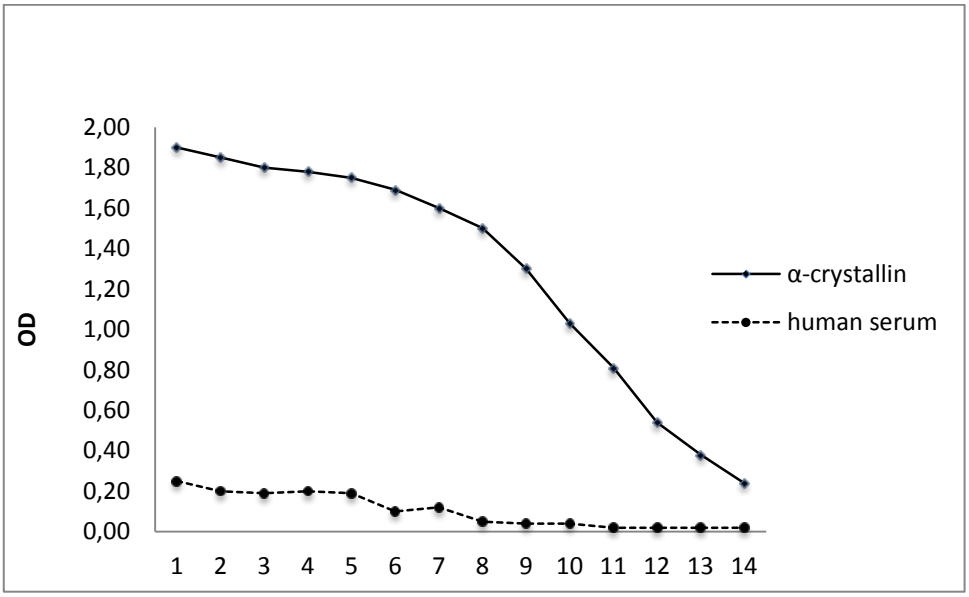


Фиг. 7. Тестиране на имунния заешки серум в постоянно разреждане 1:12000 срещу алфа-кристалин в падащи разреждания (от 1/2 до 1/32 000) и нормален серум от човек 1/20 до 1/320000.

Получените резултати показват, че серумът притежава макар и значително по-слаба активност и срещу белтъци на нормалния човешки серум. Получава се дозо-зависима крива, не само срещу алфа-кристалините, но и срещу човешкия серум. За отстраняване на ”неспецифично” взаимодействащите антитела в поликлоналния заешки серум с протеини, намиращи се в нормалния човешки серум бе осъществена абсорбция на имунния заешкия серум с нормален човешки.

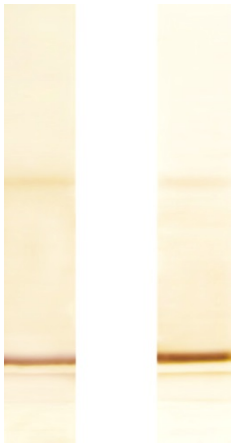
За целта към 1 мл от имунния заешки серум беше прибавено еквивалентно количество нормален човешки серум и сместа бе инкубирана за една нощ на 4^0C. На следващия ден серумът бе центрофугиран, за да се отделят получените агрегати от комплексите антиген-антитяло. Преинкубираният по този начин серум тестирахме чрез ELISA срещу антигените – алфа-кристалин и нормален човешки серум, накапани на плаката в падащи разреждания от 50 до 0,05 μg/ml. Представената на фиг. 7 графика доказва, че след преабсорбцията, имунният заешки серум не притежава реактивност срещу нормален човешки серум , а доза-

зависима крива срещу антигена алфа-кристалин доказва запазване на високата специфичност на имунния серум срещу съответния му антиген.



Фиг. 8. Тестиране на имунния заешки серум в постоянно разреждане 1:12000 след проведена с абсорбция с нормален човешки серум срещу алфа-кристалин в падащи разреждания (от 1/5 до 1/50000) и нормален серум от човек 1/10 до 1/100000.

За потвърждаване специфичността на получения от нас заешки имунен серум, той бе сравнен със серума срещу αB-crystallin (FL-175):sc-22744, Santa Cruz Biotechnology, Inc чрез имуноблот (Фиг.8а). От фигурата се вижда, че двата серума разкриват по една интензивна и една по-слаба ивици в областта на нискомолекулните белтъци (около 20 kD) и по една допълнителна ивица с много по-слаб интензитет, съответстваща на по-високомолекулни белтъци.



1 2

Фиг.8а. Имуноблот на разделен чрез SDS PAGE електрофореза алфа-кристалин трансфериран върху нитроцелулозна мембрана и проявен 1. С произведен от нас имунен серум срещу алфа-кристалин 2. имунен серум срещу алфа-кристалин на фирмата Santa Cruz (анти-CRYAB).

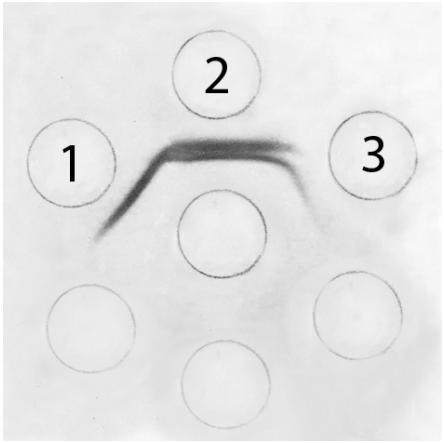
3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани

За проследяване експресията на алфа-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани бяха използвани абортивни материали при доброволно или терапевтично прекъсване на бременността.

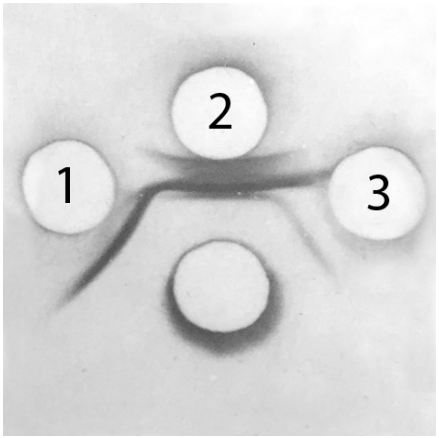
За да се установи най-ранната експресия на кристалините в очната леща и съставът им в онтогенезата бяха приготвени екстракти от лещи на възраст – 5 и 6-та гестационна седмица, както и от възрастни човешки лещи. Екстрактите са приготвени по метода, описан в глава Материали и методи.

1.1. Проследяване експресията на алфа-кристалини чрез двойна имунодифузия по Ouchterlony

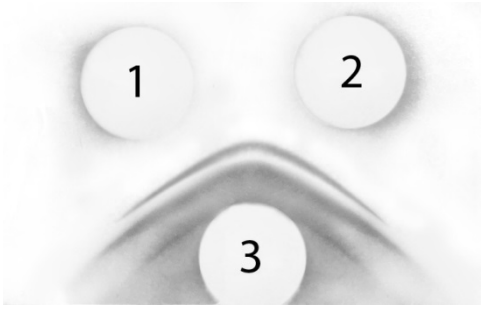
Екстрактите бяха тестирани чрез двойна имунодифузия в 1% агар във физиологичен разтвор с използването на заешки хиперимунен серум срещу пълен екстракт на човешка очна леща.



Фиг. 8б Двойна имунодифузия в агаров гел. В централната ямка е накапан екстракт от ембрион на възраст 5-та гестационна седмица, а в периферните ямки: 1 – заешки серум срещу бета кристалини; 2 – заешки серум срещу пълен екстракт на очна леща; 3 – заешки серум срещу алфа-кристалини



Фиг. 8в Двойна имунодифузия в агаров гел. В централната ямка е накапан екстракт от ембрион на възраст 6-та гестационна седмица, а в периферните ямки: 1 – заешки серум срещу бета кристалини; 2 – заешки серум срещу пълен екстракт на очна леща; 3 – заешки серум срещу алфа-кристалини



Фиг. 8г Двойна имунодифузия в агаров гел. В ямка 1 е накапан екстракт от човешка леща на възраст 20г., в ямка 2 – екстракт на очна леща от 40-годишен човек; 3 – заешки серум срещу пълен екстракт на човешка очна леща

От фигурите се вижда, че екстрактът от очна леща на човешки ембрион 5-та гестационна седмица съдържа два класа кристалини – алфа и бета (фиг. 8б), а този от ембрион – 6-та гестационна седмица съдържа трита класа кристалини (алфа, бета и гама) (фиг. 8в) . Екстрактите от възрастни (20 и 40 г.) човешки очни лещи демонстрират наличие и на трите класа кристалини (фиг. 8г) .

1.2. Проследяване експресията на алфаВ-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани

За проследяване наличието и промените на алфа-кристалините по време на вътреутробното развитие на човека бяха изследвани парафинови срези на тъкани от ембриони и фетуси чрез имунохистохимични методи с използване на антитела срещу нефосфорилирана и фосфорилирана форма на алфа-кристалини. (приложение 1, снимки с номера1-18).

1.2.1. Експресия на нефосфорилиран алфаВ-кристалин в тъкани на 8 седмичен ембрион

В много от ембрионалните тъкани се наблюдава позитивна реакция

- първа фарингеална дъга: позитивни първични ядки на вкостяване, позитивни ядра и цитоплазма на клетките на повърхностния епител на лигавицата; отрицателни ядра и цитоплазма на клетките в подлежащите слоеве и в подлежащата съединителна тъкан; преобладаващата част от ядрата и цитоплазмата на мускулните клетки са силно позитивни, само единични ядра са негативни (снимка 1а).
- в епителa на носна лигавица, включително олфакторен епител се наблюдава позитивиране на почти всички ядра в герминативния и повърхностен слой и на ядра от останалите слоеве, както и позитивна зърнистост в цитоплазмата на епителните клетки (снимка 2а).
- силно позитивни ядра и цитоплазма на зачатъка на зъб и на повърхностния слой епител на лигавицата (снимка 3а)
- мозък – отрицателни ядра, положително оцветени аксони (снимка 4а)
- в тимуса се наблюдава слабо позитивна реакция (снимка 5а)
- дуктус кохлеарис – силно позитивни първични ядки на вкостяване в костния лабиринт (положителни ядра и цитоплазма), отрицателен перихондриум; преобладават отрицателни ядра и позитивна цитоплазма на клетките от ципестия лабиринт (снимка 6а)
- сърце и перикард – преобладават позитивни ядра, позитивна цитоплазма със зърнистост и стриираност; (снимка 7а)

- аортата е с позитивен ендотел, положителна съединителнотъканна обвивка, а клетките в туника медиа са с негативни ядра и позитивна цитоплазма (снимка 8а)
- бял дроб – отрицателен бронхиален епител (снимка 9а)
- черво – отрицателен епител (снимка10а)
- ръка – позитивни ядра и цитоплазма на мускулни клетки, кожен епител и първични ядра на вкостяване, хрущял – негативен (снимка 11а)
- надбъбречна жлеза – слабо позитивна цитоплазма, преобладават отрицателни клетки (снимка 12а)
- мезонефрос – отрицателни ядра и цитоплазма (снимка 12а)
  гонада (семенник) – единични позитивни клетки (цитоплазма); надсеменник – силно позитивни клетки на еферентните каналчета (снимка 12а)

1.2.2. Експресия на фосфорилиран алфаВ кристалин в тъкани на 8 седмичен ембрион

- първа фарингеална дъга: отрицателни хондроцити, позитивен перихондриум, позитивни ядра и цитоплазма на повърхностния епител на лигавицата, отрицателни ядра и цитоплазма на подлежащите слоеве и съединителната тъкан; част от ядрата и цитоплазмата на мускулатурата са позитивни, (снимка 1б).
- в епителa на носна лигавица, включително олфакторен епител се наблюдава отрицателна реакция (снимка 2б).
- позитивни ядра и цитоплазма на зачатък на зъб и на повърхностния слой епител (снимка 3б).
- мозък – част от ядрата на невроните са позитивни, положително оцветени аксони (снимка 4б)
- в тимуса се наблюдава отрицателна реакция (снимка 5б).
- дуктус кохлеарис – отрицателни ядра и цитоплазма на хрущялите на лабиринта, липсват ядки на вкостяване, позитивен перихондриум; преобладават отрицателни ядра и цитоплазма на клетките от ципестия лабиринт (снимка 6б).
- сърце и перикард – преобладават позитивния ядра, позитивна цитоплазма със зърнистост и стриираност (снимка 7б).

- аорта позитивен ендотел, съединителнотъканна обвивка и негативни ядра и позитивна цитоплазма на клетките в туника медиа (снимка 8б).
- бял дроб – слабо позитивен бронхиален епител (снимка 9б).
- черво – позитивна цитоплазма на епителa (снимка 10б).
- ръка – позитивни ядра и цитоплазма на мускулни клетки, кожен епител , хрущял – негативен, позитивен перихондриум (снимка 11б).
- надбъбречна жлеза – позитивна цитоплазма и единични ядра (снимка 12б).
- мезонефрос – отрицателни ядра и цитоплазма (снимка 12б).
- гонади (семенник) – единични позитивни клетки (цитоплазма); надсеменник – силно позитивни клетки на еферентните каналчета (фиг. 12б).

1.2.3. Експресия на нефосфорилиран алфаВ кристалин в тъкани на 20 седмичен фетус

- миокард – позитивни ядра и цитоплазма – със зърнистост и раираност; позитивни Z ивици (снимка 13а)
- мозък – негативни ядра и слабо позитивна на места цитоплазма (снимка 14а)
- тимус – позитивна цитоплазма на епителните клетки и на лимфоцитите; силно позитивни Хасалевите телца (снимка 15а)
- бъбрек – отрицателна реакция в гломерулите и положителна в епителa на извитите каналчета (снимка 16а)
- чревен епител - негативен (снимка 17а)
- черен дроб – негативен (снимка 18а)

1.2.4. Експресия на фосфорилиран алфа-кристалин в тъкани на 20 седмичен фетус

- миокард – позитивни ядра и цитоплазма – със зърнистост и раираност (снимка 13б)
- мозък – позитивни ядра и цитоплазма (снимка 14б)
- тимус – позитивна цитоплазма на лимфоцитите; слабо позитивна цитоплазма на епителните клетки (снимка 15б)
- бъбрек - позитивна реакция в гломерулите, особено в капсулата и в епителa
- на извитите каналчета (снимка 16б)
- чревен епител – слабо позитивна цитоплазма на епителa (снимка 17б)

- черен дроб – позитивни ядрена и цитоплазмена реакция (снимка 18б)

Резултатите от имунохистохимичното изследвани на тъкани от осем седмичния ембрион са обобщени на таблица 1.

1.2.5. Приложение – микроснимки от тъкани на ембриони и фетуси

Таблица 1. Експресия на алфа-кристалини (нефосфорилиран и фосфорилиран) в тъкани на ембрион и фетус, изследвана чрез индиректна имунопероксидазна реакция на парафинови срези с първо антитяло срещу алфа-кристалини.

Орган / тъкан	8 седмичен ембрион		20 седмичен фетус	
	Антитяло с/у не-фосфорилиран алфа-кристалин	Антитяло с/у Фосфорилиран алфа-кристалин	Антитяло с/у не-фосфорилиран алфа-кристалин	Антитяло с/у фосфорилиран алфа-кристалин
Тимус	Слабо положителна реакция	++ цитоплазма на лимфоцити +++ Хасалеви телца	отрицателен	++ цитоплазма на лимфоцити, +/- Хасалеви телца
Носна лигавица	+++ епител	отрицателна	(-)	0
Първа фарингеална дъга хрущял	Хрущял (-); в ядките на вкостяване (++) ядра	Хрущял (-) с (-) ядра ядки на вкостяване		
Перихондриум	(-)	(-)		
Кожа лигавица	(++) ядра и цито-плазма в повър-хностен слой	(++) ядра и цито-плазма в повър-хностен слой		
Напречно набраздени мускулни клетки	(++) ядра и цитоплазма	(++) ядра и цитоплазма		
Ектодермална зъбна пластинка и пъпка	(+++) ядра и цитоплазма	(+++) ядра и цитоплазма		
Ductus cochlearis Хрущял и перихондр. Ядки на вкостяване Ципест лабиринт	 (-) Я и Ц (+++) (+++)	 (+/-) Я и Ц (-) (-)		
Сърце	(++) Я и Ц	(++) Я и Ц	(+++) Ц	(+++) Ц
Аорта	(++) Я и Ц на ендотела и tunica adventicia, tunica media (-)	(++) Я и Ц на ендотела и tunica adventicia, tunica media(-)		
Перикард	(++) Я и Ц	(++) Я и Ц		
Бял дроб	(-)	(-)	(-)	(-)
Ръка – напр. набр. Мускули Хрущял Ядра на вкостяване перихондриум	Я и Ц (++) (-) (++) (-)	Я и Ц (++) (-) (-) (+)		
Главен мозък	(-)	Послойна локализация на (+) Я и (-) ядра	(-) Я; (+/-) Ц	(++) Я и (++) Ц
Гръбначен мозък	(++)	(+++)		
надбъбрек	(-)	(++) Ц и единични (+) Я		
Мезонефрос / метанефрос	(-)	(++)	(-) гломерули (+) Я и Ц на епител в извити каналчета	(+) гломерули, (+)капсула и мембрана (+) Я и Ц на епител в извити каналчета
Тестис	(-)	(-)		
Епидидимис	(+) Я и Ц	(+++) Я и Ц		
Чревен епител	(-)	(+) Ц	(-)	(+/-)
Черен дроб	0	0	(-) Я и Ц	(++) Я, (+) Ц

2. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация

За проследяване на имунния отговор срещу антигени в имунологична изолация и с роля в имунологично обусловеното безплодие бяха изследвани серуми от пациенти с репродуктивни проблеми.

2.1. Изследване на хуморалния имунен отговор срещу сперматозоидни антигени

Тъй като антителата срещу сперматозоиди се различават по функция и по епитопите, които разпознават, бяха приложени различни тестове: за доказване на спермоаглутиниращи антитела - микроспермоаглутинационен тест на Friberg (TAT), за спермоимобилизиращи антитела - спормоимобилизационен тест на Изожима (SIT), а за различни антигени върху и под повърхността на сперматозоидите - ELISA. При метода ELISA са използвани меки полистеренови плаки, предварително обработени за повишаване на адхезивния капацитет с poly-L-lysine hydrobromid и натоварвани с по 50 мкл на ямка сперматозоидна суспенсия ($5x10^6$ сперматозоида на мкл.).

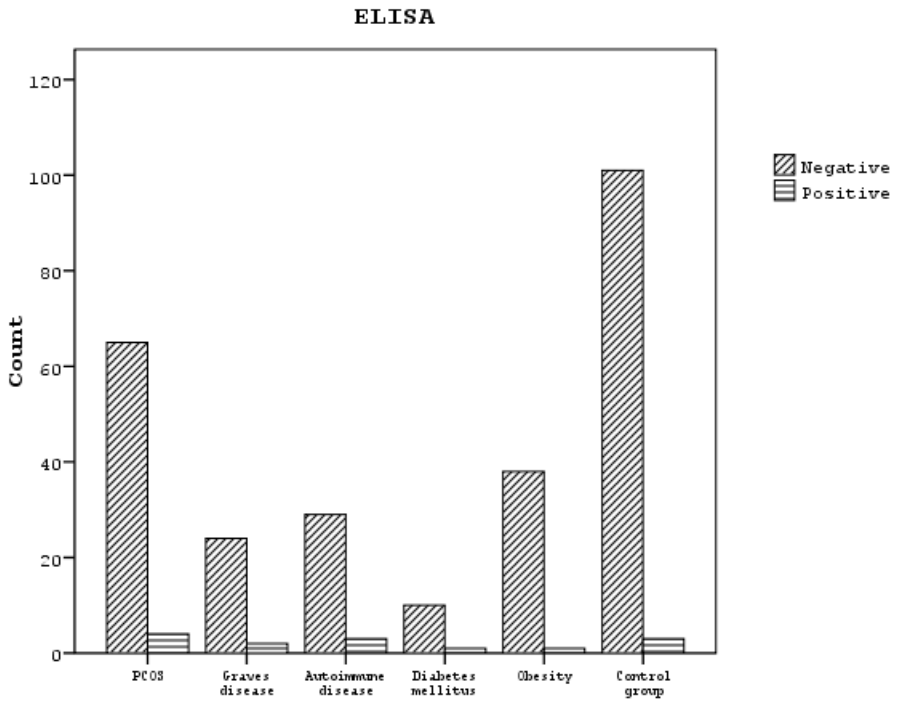
Клинично значимите титри на откриване на антитела при различните използвани от нас методи бяха определени както следва: за TAT – титър ≥ 32 за SIT – SIV≥2, за ELISA – OD стойности над средната стойност на OD на контролната група серуми плюс 2 пъти стандартното отклонение ($\overline{X}$ + 2SD).

Изследвани бяха серуми от 104 фертилни и 107 пациентки с ендокринни заболявания, имащи отношение към репродукцията. Те бяха разделени в групи както следва: синдром на поликистозни яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I, затлъстяване.

При изследване на 104 серума от фертилни лица (контролната група), с използването на три метода - TAT, SIT и ELISA бяха получени следните резултати: при ELISA - 2,88% (фиг.9), при TAT – 1,92% (фиг.10) и при SIT – 4,81% (фиг.11) позитивни серуми.

При изследването чрез ELISA на 177 пациентки с ендокринни заболявания положителни срещу сперматозоидни антигени бяха 11 (6,21%) (табл. 2, фиг.9).

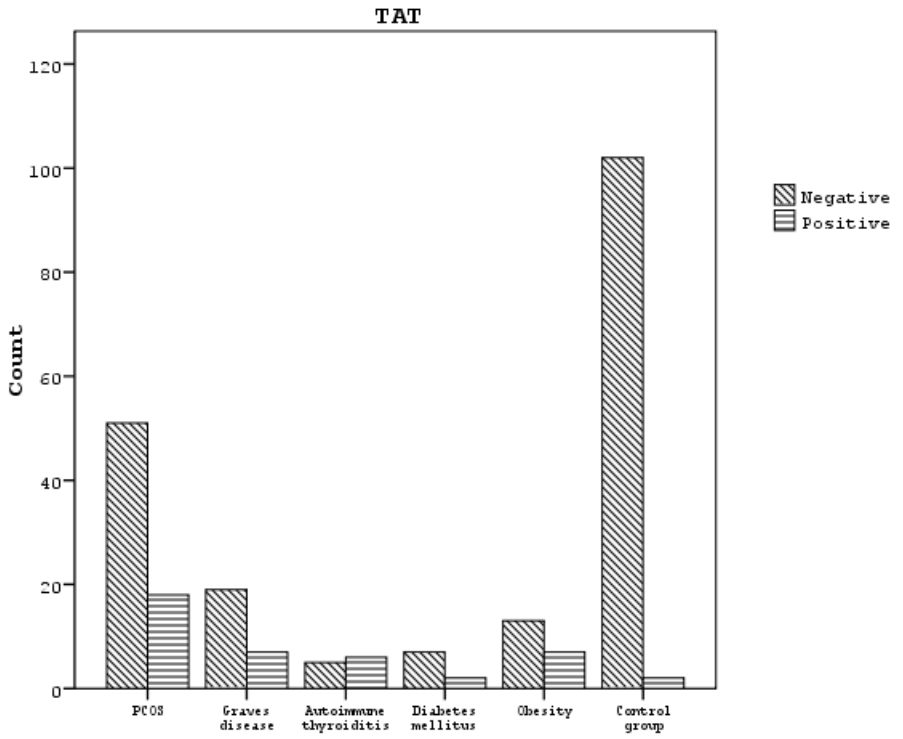
При разделянето на пациентките по групи с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми бе установено, че от 69 изследвани жени със синдрома на поликистозните яйчници 4 са положителни (5,79%) и 65 са отрицателни; от 26 пациентки с тиреотоксикоза – 2 са позитивни (7,69) и 24 негативни; от 32 пациентки с автоимунен тиреоидит положително са реагирали 3 (9,38%) срещу 29 отрицателни; от 11 пациентки с диабет тип I – при една серумът е положителен (9,09%), а при 10 е отрицателен; от жените със затлъстяване (39), позитивен е само един серум (2,56%), а останалите 38 са негативни. От контролните 104 серума 3 са позитивни (2,88%). Резултатите са представени на фиг. 9.



Фиг. 9. Честота на позитивните и негативни серуми, изследвана чрез ELISA в пациентските групи (синдром на поликистозните яйчници, тиреотоксикоза,

автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I), затлъстяване и контролната група.

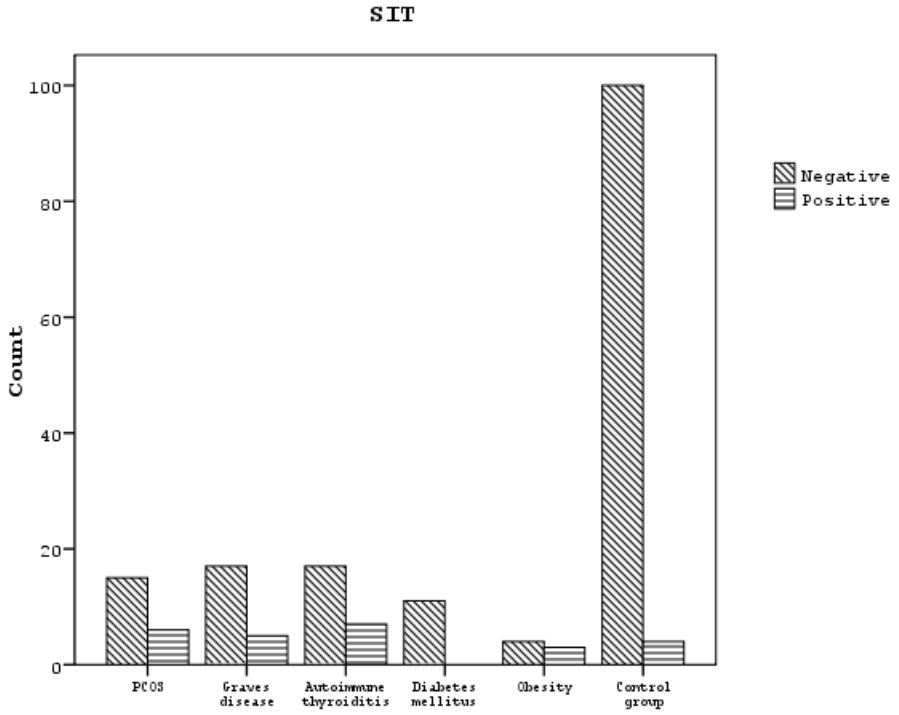
При изследването чрез спермоаглутинационния тест на Фриберг (TAT) (фиг. 10) на 135 пациентки с ендокринни заболявания 40 серума (29,62%) показват спермоаглутинационна активност в клинично значими стойности. При разделяне на серумите по групи ендокринни заболявания бе установено, че от 69 изследвани жени със синдрома на поликистозните яйчници 18 (26,09%) са позитивни и 51 са негативни; от 26 пациентки с тиреотоксикоза – 7 са позитивни (26,92%) и 19 негативни; от 11 пациентки с автоимунен тиреоидит позитивните са 6 (54,55%) срещу 5 негативни; от 9 пациентки с диабет тип I при 2 пациентки серумът е позитивен (22,22%), а при 7 е негативен; от жените със затлъстяване (20), позитивни са 7 серума (35%), а 13 са негативни. От контролните 104 серума два са положителни (1,92%) (фиг.10).



Фиг. 10. Честота на позитивните и негативни серуми, изследвана чрез TAT в пациентските групи (синдром на поликистозните яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I) и затлъстяване) и контролната група.

При тестирането на 85 серума за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени чрез метода на спермоимобилизация (SIT) бе установено че, 21 серума

(24,7%) проявяват спермоимобилизираща активност. При разделянето на пациентките по групи ендокринни заболявания бяха получени следните резултати: от 21 жени със синдрома на поликистозните яйчници 6 са позитивни (28,57%) и 15 са негативни; от 22 с тиреотоксикоза – 5 са позитивни (22,72) и 17 негативни; от 24 пациентки с автоимунен тиреоидит позитивните са 7 (29,16%) срещу 17 негативни; от 11 пациентки с диабет тип I – всички бяха негативни; от жените със затлъстяване (7), позитивни са 3 серума (42,86%), а 4 са негативни. От изследваните 104 контролни серума 5 са положителни (4,81%) (фиг.11).



Фиг. 11. Честота на позитивните и негативни серуми, изследвана чрез SIT в пациентските групи (синдром на поликистозните яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I) и затлъстяване) и контролната група.

Обобщените резултати от проведените изследвания на хуморалния имунен отговор при пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми са представени на таблица 2.

Таблица 2. Честота на позитивните серуми срещу сперматозоидни антигени сред пациентките със синдром на поликистозните яйчници (PCOS), тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I и затлъстяване.

Метод	**TAT**		**SIT**		**ELISA**	
Заболяване	бр. тес-тирани	позитивни / процент	бр. тес-тирани	позитивни / процент	бр. тес-тирани	позитивни / процент
1.Синдром на поликистозните яйчници	**69**	**18/26,09%**	**21**	**6 / 28,57%**	**69**	**4 / 5,79%**
2. Други ендокринни заболявания	**68**	**22 / 14,7 %**	**64**	**15 / 23,43%**	**108**	**7 / 6,48%**
тиреотоксикоза	26	7 / 26,92%	22	5 / 22,72%	26	2 / 7,69%
автоимунен тиреоидит	11	6 /54,55%	24	7 / 29,16%	32	3 / 9,38%
диабет тип I	9	2 / 22,22%	11	0/0%	11	1 / 9,09%
затлъстяване	20	7 / 35%	7	3 / 42,86%	39	1 / 2,56%
ОБЩО	**135**	**40/29,62%**	**85**	**21 / 24,7%**	**177**	**11 / 6,21%**
Контролна група	**104**	**2 / 1.92%**	**104**	**5 / 4,81%**	**104**	**3 / 2,88%**

Изследването на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоидите при пациентките със синдрома на поликистозните яйчници чрез

метода ELISA установи честота на положителни серуми 5,79%, която не се различава статистически значимо от честотата на позитивните серуми (2,88%) при контролната група (P>0.05, Chi-Square Test). Изследването на серумите от пациентките със синдрома на поликистозните яйчници за антитела срещу антигени на сперматозоидите чрез методите TAT и SIT обаче, показа статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени (P< 0.001, Chi-Square Test).

Сравняването на честотите на позитивните серуми сред пациентките с останалите изследвани ендокринни заболявания (тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I, затлъстяване) спрямо контролната група чрез Chi-Square Test показа статистически значимо различие при изследването на серумите чрез TAT – P < 0.001 и чрез SIT – P < 0.001. Сравняването на честотите на позитивните в метода ELISA серуми от пациентки с ендокринни заболявания (тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I, затлъстяване) спрямо контролната група фертилни жени не показа статистически значимо различие (P>0.05, Chi-Square Test).

2.2.Изследване на хуморалния имунен отговор срещу алфа-кристалини в пациенти с репродуктивни проблеми

За проследяване на хуморалния имунен отговор срещу нискомолекулния стресов протеин – алфа-кристалин при жени с различни ендокринни заболявания и репродуктивни неудачи бяха изследвани серуми за наличие на антитела срещу алфа-кристалините чрез ELISA. Плаките бяха адсорбирани с α-кристалин, изолиран от свински очни лещи, който е антигенно идентичен с този от човешка очна леща (Trifonova et al., 2002), а човешките серуми бяха разредени 1 : 20 във физиологичен разтвор.

В ELISA концентрацията на антителата срещу α-кристалини е отчетената като оптична плътност (OD) при дължина на вълната 492 нм. Статистическият анализ е проведен с непараметричен метод. Контролната негативна група включва жени без репродуктивни проблеми. За позитивни са приети серумите с OD > от средната стойност на контролната група + 2 пъти

стандартното отклонение ($\overline{X}$ + 2SD), а при стойности на OD по-ниски от тях, серумите се приемаха за отрицателни. За сравняване нивото на OD, което е пропорционално на концентрацията на антителата в серумите на изследваните групи, бе използван теста на Mann-Whitney. За сравняване на честотите на положителните серуми в пациентските и контролната група бе използван Fisher's exact test.

Разпределението на OD в изследваните групи пациенти и в контролната група е показано на фиг. 12 чрез блот-бокс графика и на таблица 2, а честотите на позитивните серуми в същите групи – на фиг.13 и таблица 3.

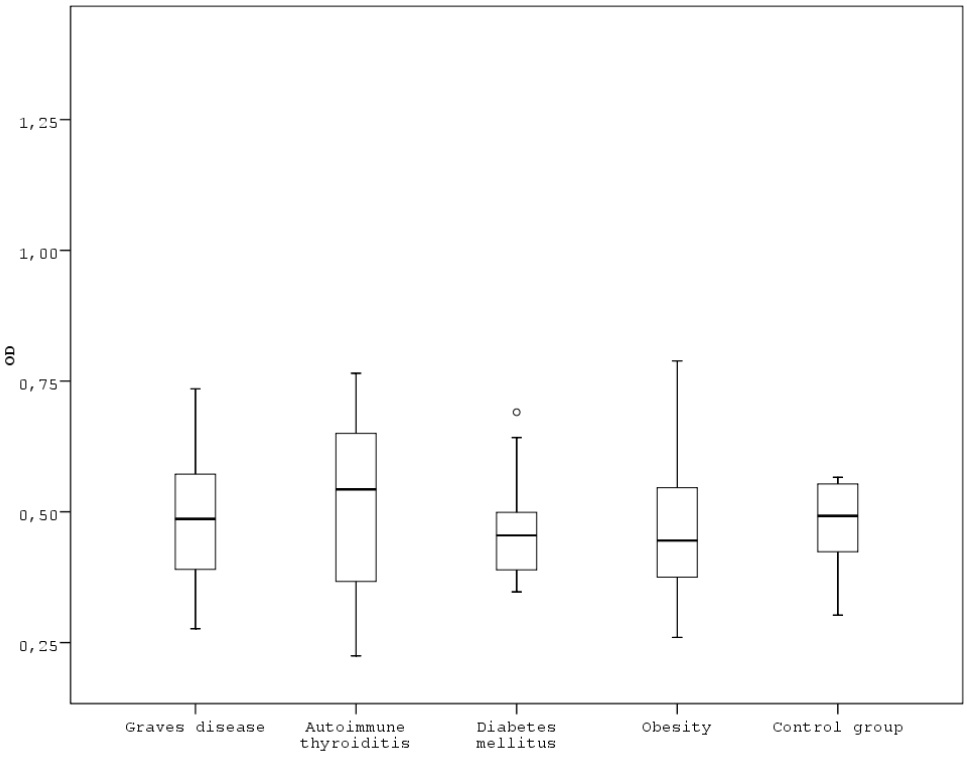
Таблица 3. Нива на концентрация на анти-α-crystallin антитела и честотата на позитивни серуми сред пациентки с ендокринни заболявания

Заболяване	Брой изследвани пациенти	Концентрация на антителата (OD) и честота на позитивните пациенти	
		медиана OD_{492nm} (минимална-максимална стойност на OD)	Брой позитивни (%)
Болест на Graves	26	0.4865 (0.2765-0.7350)[a]	3 (11.5)[b]
Автоимунен тиреоидит	32	0.543 (0.2245-0.7650)[a]	8 (25)[c]
Захарен диабет тип I	10	0.455 (0.3470-0.6905)[a]	1 (10)[b]
Затлъстяване	33	0.445 (0.2600-0.7885)[a]	5 (15.2)[b]
Контролна група	12	0.4979 (0.4230 – 0.5980)	0 (0)

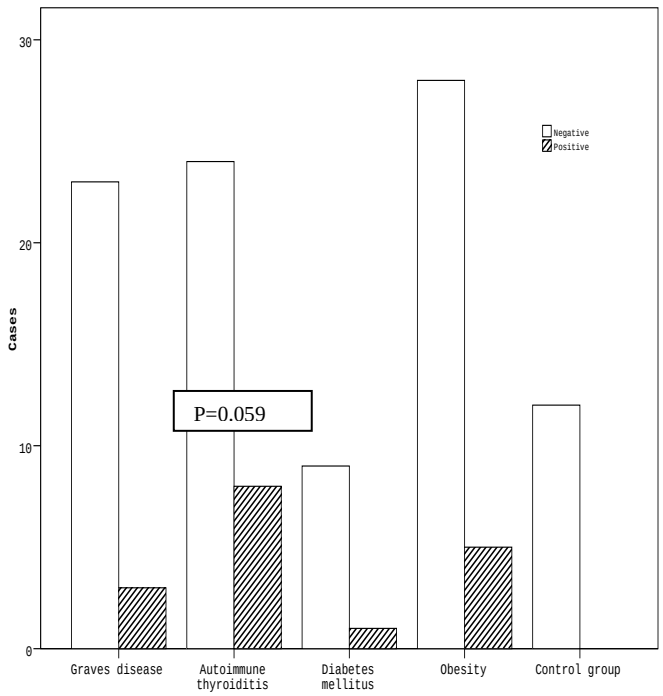
a (P>0.05, Mann-Whitney test
b (P>0.05, Fisher's exact test)
c P=0.059

Проведеният статистически анализ с използването на теста на Mann-Whitney показа, че не съществува достоверно повишаване на концентрацията на анти-α-кристалин антитела в серума на пациентките от всяка една група спрямо контролната група (P>0.05). Прави впечатление обаче, че при пациентките с автоимунен тиреоидит,

честотата на позитивните серуми спрямо тази в контролната група е на границата на статистическата значимост (P=0.059) (табл.3).



Фиг. 12. Концентрация на анти-α-crystallin антитела, определена чрез OD при 492нм при групи пациентки с ендокринни заболявания (тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I) и затлъстяване). Няма статистически значимо повишена концентрация на антитела срещу алфа-кристалини в серумите на пациентките спрямо контролната група (P>0.05, Mann-Whitney тест)



Фиг. 13. Честота на позитивните и негативни серуми в пациентските групи (тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I) и затлъстяване) и контролната група. Няма статистически значимо повишена честота на позитивните за анти-алфа-кристалинови антитела в пациентските и контролната група (P>0.05, Fisher's exact test)

От изследваните 26 жени с тиреотоксикоза серумите на 3 показаха в ELISA OD над средната плюс два пъти стандартното отклонение (11,5%).

Резултатите от изследването на групата жени със синдрома на поликистозните яйчници (PCOS) за промени в концентрацията на антитела срещу алфа-кристалина и на честотата на позитивните серуми (с OD по-високи от средната + 2SD) са представени на фигури 14 и 15 и на таблица 4.

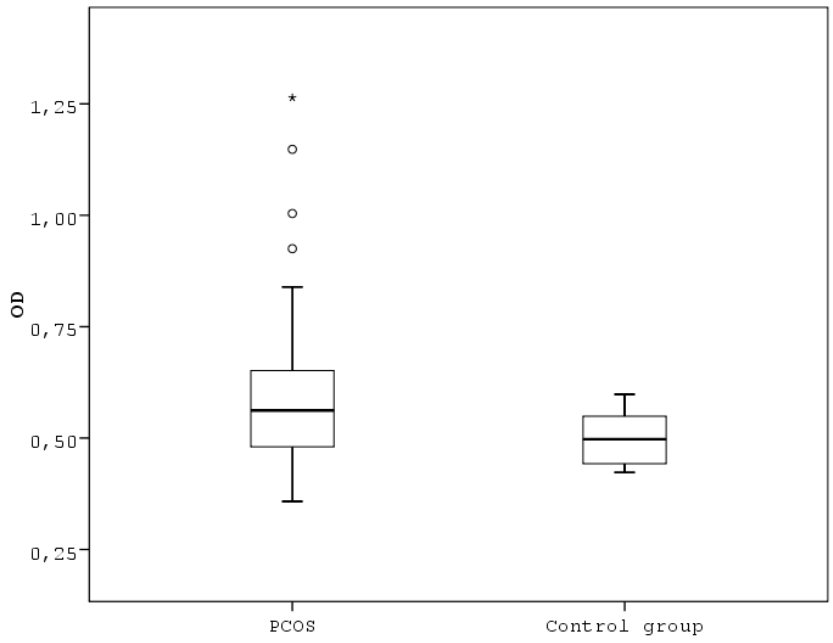
Таблица 4.

Нива на концентрацията на анти-α-crystallin антитела и честота на позитивните серуми сред пациентките със синдром на поликистозните яйчници (PCOS)

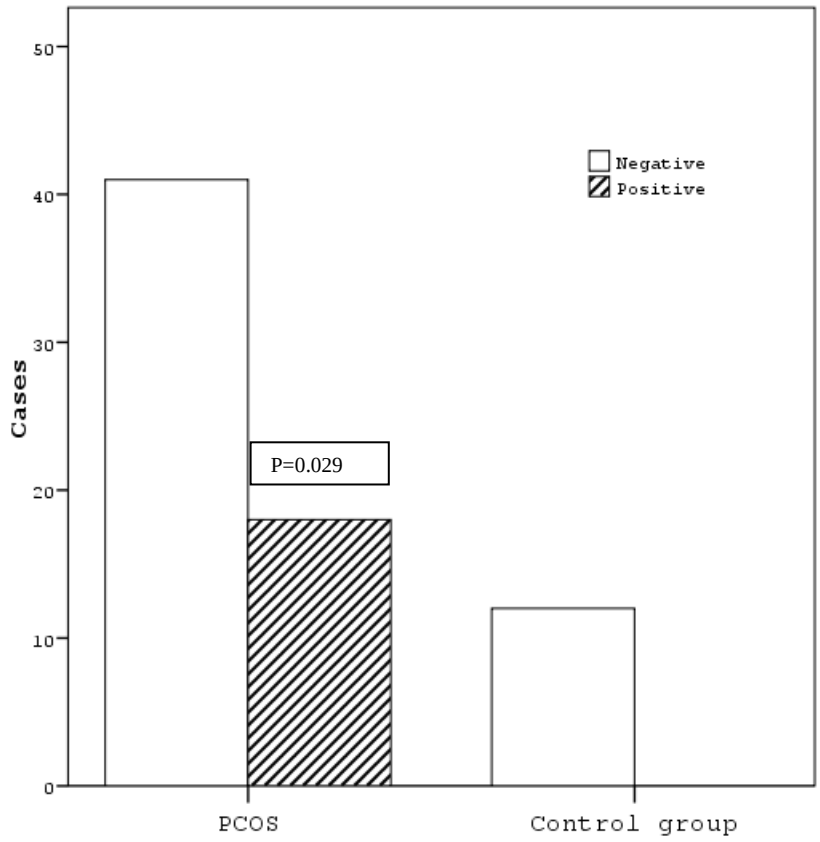
Заболяване	Брой тестирани пациентки	Концентрация на антитела и процент позитивни пациенти	
		медиана OD_{492nm} (минимална-максимална стойност на OD)	Брой позитивни пациенти (%)
PCOS	59	0.6031 (0.3580 – 1.2640)[a]	15 (25.4)[b]
Контролна група	12	0.4979 (0.4230 – 0.5980)	0

[a] Статистически значимо повишена концентрация на антитела спрямо контролната група (P<0.05, Mann-Whitney test)

[b] Статистически значимо повишена честота на позитивни пациенти спрямо контролната група (P<0.05, Fisher's exact test)



Фиг. 14. Концентрация на анти-α-crystallin антитела, определена чрез OD при 492нм при групи пациентки със синдрома на поликистозните яйчници (PCOS) в сравнение с контрола група жени. В серумите от групата жени с PCOS е на лице статистически значимо повишаване концентрацията на антитела в сравнение с контролната група. (P<0.05, Mann-Whitney тест)



Фиг. 15 Честота на позитивните и негативни серуми в групата на жените със синдрома на поликистозните яйчници и контролна група. В групата с PCOS има статистически значимо по-висока честота на позитивни серуми за антитела срещу α-crystallin в сравнение с контролната група. (P<0.05, Fisher's exact test)

Изследването на разпределението на оптичните плътности в групата на пациентките със синдрома на поликистозните яйчници показа, че концентрацията на антителата, която е пропорционална на оптичната плътност, в групата на пациентките е повишена спрямо контролната група. С използването на теста на Mann-Whitney бе доказана достоверно по-висока концентрация на антитела в пациентската група, спрямо контролната (P<0.05, Mann-Whitney тест).

Проведеният статистически анализ за сравняване честотите на позитивните серуми сред пациентките и контролната група с използването на Fisher's exact test показа, че установеният по-висок процент на позитивни серуми сред жените със синдрома на поликистозните яйчници (25,4%) се различава значимо от този при контролната група (0%) (P<0.05, Fisher's exact test).

V. ОБСЪЖДАНЕ

Анализът на представената в дисертационния труд литература показва, че в част от случаите на безплодие при човека се откриват антитела, насочени срещу антигени в имунологична изолация. Те могат да бъдат автоантитела у мъжа, антитела у жената, насочени срещу антигени на партньора й, автоантитела у жената срещу антигени на овоцита и такива срещу антигени на зародиша, както и антитела срещу някои нискомолекулни стресови протеини. Гаметите са относително честа „мишена" за автоимунен отговор, защото половите жлези, където те се диференцират и експресират тъканно-специфичните си антигени, са органи в имунологична изолация. В своеобразна имунологична изолация са и някои нискомолекулни стресови протеини, напр. алфа-В кристалина в очната леща, която е обвита от непропусклива за молекули с големина на белтъци капсула.

1. Изолиране на алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и на човешка очни лещи чрез физико-химичен метод (гелна хроматография)

Най-висока концентрация на алфа-кристалини има в очната леща, където те изпълняват основно структурна функция и участват в поддържането на прозрачността и еластичността на лещата. Най-достъпен материал за изолиране на човешки алфа-кристалини са оперативно отстранени катарактни лещи. Изолирането на α-кристалини в чист вид от човешки катарактни лещи обаче е почти невъзможно, тъй като в постналния период различните класове кристалини започват да се интегрират в комплекси и между някои молекули възникват ковалентни връзки. По-подходящ източник за пречистени фракции на основните три класа кристалини се оказват лещи от фетуси (Трифонова, 1985), но получаването на последните е затруднено поради нормативни и организационни трудности. Тъй като кристалините са антигени с ниска видова специфичност, то източник за изолирането им биха могли да бъдат и лещи от различни бозайници. Поради доказана чрез ELISA антигенна идентичност между кристалините на човешка и свинска очна леща от Trifonova, N. et al., 2002, ние изолирахме кристалини именно от водно-солеви екстракти на свински очни лещи.

Приложената гелна хроматография върху Biogel A5m на екстракти от прозрачни очни лещи, събрани в Катедрата по Съдебна медицина, ВМИ – Плевен от загинали при инциденти хора на възраст между 30 и 40 години, показа че този метод дава възможност за изолиране на отделните класове кристалини (α-, β- и γ-кристалини), като във втория пик се съдържат белтъци, съответстващи по молекулна маса на алфа-кристалините. При тестирането им чрез двойна имунодифузия те показват антигенно различие от белтъците в третия, четвъртия и петия пик. Количеството на фракциите от втория пик обаче е недостатъчно за целите на по-нататъшното изследване, тъй като този пик е със сравнително ниска екстинкция за белтъчно съдържание. Гелната хроматография на екстракт от фетални човешки лещи демонстрира втори пик с по-високи екстинкции и показва, че те са много подходящи за изолиране на алфа-кристалини. Тези резултати потвърждават данните на Трифонова, 1985, получени чрез гелна хроматография върху Sephadex G200. Набавянето на достатъчно фетални човешки лещи обаче е трудно. Ето защо, ние сравнихме изолирането на алфа-кристалини от екстракти на свински и фетални човешки лещи. При проведената гелна хроматография върху Biogel A5m се получават сходни елуентни криви с добре оформени пет пика. Тестирането на фракциите чрез ELISA доказва, че пречистени алфа-кристалини се откриват във втория пик. SDS PAGE показа, че фракциите от втория пик са добре пречистени и дават две ивици, съответстващи по молекулна маса на субединиците на алфа-кристалините. Алфа-кристалините, изолирани от свинска и човешка леща, изследвани чрез двойна имунодифузия по Ухтерлони за антигенно сходство, показаха пълна антигенна идентичност. ***Тези резултати потвърждават установеновената от Трифонова и сътрудници, 2002, чрез ELISA и имуноабсорбция антигенна идентичност на свински и човешки алфа-кристалини.***

Въз основа на тези резултати приехме, че за по-нататъшните изследвания най-подходящо е изолирането на алфа-кристалини чрез гелна хроматография на екстракт от свински очни лещи върху Biogel A5m.

2. Получаване и характеристика на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски изолиран алфа-кристалин от водно-солеви екстракт на очна леща

За решаване на поставените задачи бе необходимо получаването на хиперимунен серум, съдържащ антитела срещу алфа-кристалини. Те са основните белтъци на очната леща и представляват 90% от нейната маса. Капсулата на очната леща е непропусклива за молекули с големината на белтъци (Cotlier, 1975) и изолира лещата на ембриона от имунната система още преди формирането на тимуса. Поради това кристалините се оказват в своеобразна имунологична изолация, която от една страна възпрепятства изработването на толерантност към тях по време на ембрионалното развитие, а от друга не допуска възникването на имунологичен конфликт до тогава, докато тази бариера не бъде нарушена (Вълчанов и Попиванов, 1972), т.е. те спадат към антигените в имунологична изолация и представляват потенциални автоантигени. Алфа-кристалините са много консервативни широко разпространени белтъци. Те се откриват лещите на всички видове и в извъночни тъкани на почти всички видове. Следователно те са с ниска видова и не с толкова висока органна специфичност, както се смяташе преди 20 - 30 години. Имуногенността на кристалините е обект на изследвания на редица автори. Установено е, че алфа-кристалините, въпреки високия си консерватизъм са с добра имуногенност в условия на ксеноимунизация, докато ало- и автоимунизацията на зайци без прибавяне на адювант рядко е успешна (Wu Shou-Shan et al., 2000). При имунизация с тях да се използват подходящи схеми, включващи прибавяне на адюванти. При човека, в условия на автоимунизация при травма на окото, имунен отговор след се наблюдава само, когато изтичането на кристалини от очната леща е съпроводено с възпалителен процес, най-често причинен от стрептококи, стафилококи или туберкулозни бактерии.

Приложената в настоящата дисертация схема за имунизация с хроматографски изолирани алфа-кристалини от водно-солеви екстракт на очна леща, при която антигенът се въвежда в равни количества с пълен адювант на Фройнд, трикратно през две седмици, субкутанно в шийната област на заека (Трифонова, 1985).

Полученият имунен серум срещу алфа-кристалините е тестиран чрез ELISA. Той показа, че концентрацията на анти-алфа-кристалинови антитела е висока и подходящото работно разреждане при използването му в ELISA е 1:12000.

В резултат на проведена абсорбция имунният серум е доведен до моноспецифичност. Получената при титриране на серума чрез ELISA доза-зависима крива доказва ***високата специфичност на имунния серум срещу алфа-кристалина.***

3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в човешки ембрионални и фетални тъкани чрез имунохистохимични методи.

Нискомолекулните стресови протеини са едни от най-широко разпространените семейства молекулярни шаперони, открити в повечето организми. При стрес тяхната експресия се индуцира много бързо и така се осигурява протекция на клетките от неблагоприятни въздействия. Алфа-кристалините са главните белтъци на очната леща. Те са съставени от две субединици αA и αB, които при човека са в съотношение 3:1 (Horwitz et al.,1999). Доказано е, че този белтък е молекулярен шаперон, осигуряващ защита на клетките чрез потискане на агрегацията на денатурираните протеини (Ahmad M et al. 2008; Glover J.R. and S Lindquist, 1998; Gottesman S., 1998). Алфа-кристалините може да бъдат фосфорилирани при различни стимули. АлфаВ кристалините може да бъдат фосфорилирани на три места – S19, S45 и S59 (Ito, H. et al., 1997). Експресията на фосфорилиран αB-кристалин на място S59 се усилва при стресови състояния.

Изследванията върху експресията на алфа-кристалините в човешки ембриони показват, че тя започва твърде рано в ембрионалното развитие на очната леща – още с формирането на лещеното мехурче (5-та г. седмица). Първи се появяват алфа- и бета-кристалините, а от шеста гестационна седмица се включва синтезът на трите класа кристалини и те се откриват в екстрактите на всички възрасти, тъй като в очната леща те не се подлагат на разграждане и са на възрастта на индивида. Причисляването на алфа-кристалините към стресовите протеини, които изпълняват шаперонова функция дава известно обяснение на устойчивостта на белтъците, изграждащи очната леща, през която непрекъснато преминават и се пречупват светлинни лъчи.

Както бе споменато, αB-crystallin се експресира освен в лещата и в извъночни тъкани, но в малки концентрации. Известно е, че той регулира динамиката на актиновите филаменти, стабилизира ги чрез постранслационно фосфорилиране и протектира интегритета на интермедиерните филаменти (IF) в

условия на стрес. Фосфорилираната по серин 59 форма на αB-crystallin показва колокализация с цитоскелетните компоненти и действа като протектор на цитоскелета (Launay N. et al., 2006).

Много експерименти с миши ембриони показват ролята на стресовите протеини в основните етапи на ембрионалното развитие (Morange et al.,1984; Voss et al., 2000). През последните 2-3 десетилетия се натрупаха данни относно участието им в клетъчното делене, апоптозата и движението на клетките, като се предполага, че те играят важна роля в генната експресия (Christians, ES, 2003). Нискомолекулните стресови протеини Hsp25, Hsp27 и CRYAB (HspB5 - alphaB crystalline) се експресират в ранната ембриогенеза на някои бозайници (напр. мишки) и изпълняват различни функции: шаперонова (Hsp25, Hsp27, HspB5), цитоскелетна (Hsp25, Hsp27), анти-апоптотична функции (HspB5) (Christians, E.S et al., 2003). Логично е да се допусне, че както при други бозайници, напр. мишки, тези белтъци играят изключително важна роля в хода на онтогенезата на човека.

Нашите изследвания доказват експресията им в ранната ембриогенеза при човека. Имунохистохимичният анализ върху парафинови срези показа, че двете форми на алфаВ-кристалина (нефосфорилирана и фосфорилирана форма) се откриват в редица извъночни тъкани през различните стадии на ембрионалното и фетално развитие.

В тъканите на осемседмичен човешки ембрион се наблюдава различна експресия на двете форми на алфа-В кристалин. Нефосфорилираният алфа-В кристалин не се открива в тимуса, хрущялите, мезонефроса, мозъка, белия дроб, гонадата, надбъбрека и интестиналния епител. Умерена до силна експресия се наблюдава в назалния епител, ядрата на вкостяване, сърцето, аортата, скелетните мускули, кожен епител, средното ухо и дуктус кохлеарис, епидидима и зачатъка на зъб.

Форсфорилираната форма на този стресов протеин обаче, се наблюдава ясно в тимуса (цитоплазмата на лимфоцитите и телцата на Хасал), сърце, в надбъбречната жлеза, мезонефроса, интерстициналния епител, зачатък на зъб, скелетни мускули, кожен епител. За разлика от нефосфорилирания алфаВ кристалин, фосфорилираният липсва в ядките на вкостяване и дуктус кохлеарис.

В един по-късен етап от индивидуалното развитие – 20 седмичен фетус, когато е завършена диференциацията на всички тъкани и органи, алфа-В кристалин се доказва в ядра и цитоплазма на миокарда и в Z ивиците, в епителa на

извитите каналчета на бъбрека и в цитоплазмата на лимфоцити и епителни клетки на тимуса, като най-добре изразена е реакцията в Хасалевите телца. Фосфорилираната форма на алфа-В кристалина се наблюдава също в миокарда – ядра и цитоплазма, Z – ивици; в мозъка – ядрена и цитоплазмена локализация; в тимуса – цитоплазмена локализация в лимфоцити и епителни клетки; в гломерулите, най-вече позитивна е капсулата, в епителa на извитите каналчета; слабо е позитивирана цитоплазмата на чревни и чернодробни клетки. Всичко това показва, че по време на ембрионалното развитие, когато протичат усилени процеси на клетъчно делене, придвижване, апоптоза и дерепресия на гени, свързана със специализация на клетките, експресията на нискомолекулните стресови протеини – алфа-кристалини е важна за предпазване на ембрионалните тъкани от различни въздействия.

Редица автори са доказали експресията на алфа-кристалина в сърдечната мускулатура на възрастен човек, а в настоящото изследване ясно е доказана тази експресия в клетките на миокарда на ембриона и фетуса. С ин витро експерименти е установено, че алфа-кристалините се свързват с актина и с дезмина (Bennardini F.1992). Имуноцитохимичната локализация на αВ-кристалин в кардиомиоцитите е показана от Bennardini F.1992. Той наблюдава експресия на белтъка централно в областта на I банда (Z-линията), където е локализиран дезминът. Предполага се още, че алфа-кристалинът предпазва актина от агрегация в условия на исхемия. Протективната му роля е доказана експериментално при термичен стрес, при който актинът образува агрегати в отсъствие на алфа-кристалин. Това обяснява особено интензивното оцветяване на миокарда на ембриона и фетуса в сравнение с някои от другите изследвани тъкани. ***Засилената експресия на αВ-кристалина в кардиомиоцитите на човешки ембрион и фетус подкрепят наблюдаваната от Benjamin IJ et al., 1997, силна експресия на този белтък в сърце на миши ембриони.***

Според Ivaki, T. et al., 1992, αВ-кристалинът притежава клетъчна и тъканно-специфична експресия и извън условия на стрес по време на развитието на организма. При бозайниците αВ-кристалинът е основният белтък на очната леща, където е свързан с αA-crystallin (HspB4) в големи хетероолигомерни структури. Предполага се, че играе структурна функция, като участва в правилното подреждане на кристалините в лещените влакна, което осигурява прозрачността и еластичността на очната леща (Трифонова, Н, 1985). В тъканите с висока степен

на оксидативен метаболизъм при мишка и плъх – сърце, скелетни мускули, участъци на бъбреците нискомолекулните стресови протеини се експресират интензивно (Barouky R., 2007). Различията в степента на конститутивна експресия на алфаВ crystallin в тъканите на бозайници вероятно е свързано с механизмите на защита на белтъците на тези клетки срещу стрес или с изпълнението на специфични нейни функции. (Barouky R., 2007).

Нашите изследване показват, че най-интензивна е експресията на αB-crystallin в сърдечната и скелетна мускулатура, в кожния епител и ядките на вкостяване.

Получените от нас, макар и първоначални резултати ни дават основание да допуснем, че нискомолекулните стресови протеини, които се експресират с различна локализация и интензивност в точно определени моменти на репродуктивния цикъл, най-вероятно играят роля за оплождането, имплантацията и развитието на ембриона и фетуса.

4. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация

Антигените на органи, намиращи се в имунологична изолация, поради липса на контакт с имунокомпетентните клетки в резултат на формиране на бариера в ранната ембриогенеза са потенциални автоантигени. При нарушаване на тази бариерата те влизат в контакт със съответните лимфоцити и биха могли да индуцират имунен отговор. Резултат от този отговор може да бъде отключване на имунопатологичен процес. Имунологични фактори могат да бъдат една от причините за безплодие при човека. При някои двойки то се свързва с повишени концентрации на анти-спермални, анти-зона пелуцида, анти-овариални, анти-фосфолипидни и други антитела.

Понастоящем методите за доказване на спермоантитела са рутинен диагностичен тест, заедно с другите класически и съвременни методи при изясняване причините за инфертилитет. В последните десетилетия в репродуктивната биология все по-голям интерес представляват изследванията върху друга група имунологично изолирани белтъци и тяхната роля в процесите на оплождане, ембриогенеза и протичане на нормална бременност. Това са нискомолекулните стресови протеини, към които спада алфаВ кристалинът, който се намира в особена имунологична изолация.

4.1. Изследване за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез аглутинационни, имобилизационни методи и ELISA

В проведените от нас проучвания бяха изследвани серуми от пациентки със синдрома на поликистозните яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I и затлъстяване и репродуктивни проблеми. Приложени бяха методи за доказване на антитела срещу сперматозоидни антигени с различна локализация и изотипна специфичност: TAT, SIT и ELISA.

Феноменът, на базата на който се провеждат аглутинационните методи, е слепването на сперматозоидите в големи групи, които се отчитат микроскопски – (микроспермоаглутинационен тест на Friberg – TAT). Тези методи изискват използване на донорни спермални проби с високо качество и при тяхното провеждане изследваните пациентски серуми се прилагат в серии от падащи разреждания (Ватев, 1977). Това позволява определяне на титъра на тестирания серум, като при TAT – най-често за клинично значими се приемат титри = или > 32. Този метод е чувствителен и доказва спремоаглутинини от клас IgG, предизвикващи аглутинация от типа опашка с опашка, и спермоаглутинини от клас IgM, предизвикващи аглутинация от типа глава с глава.

При проведените от нас изследвания на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоиди при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници чрез TAT клинично значими титри са установени в 26,09% от изследваните пациентки. При пациентките с други ендокринни заболявания положително реагиращите в TAT бяха 14,7%. Следователно от общ брой изследвани 135 пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми, процентът на положително реагиращите е 29,62% . В контролната група (104 фертилни) тази честота беше 1,92%. Изследването на серумите от пациентките с поликистозни яйчници за спермоаглутиниращи антитела чрез TAT показва статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени ($P<0,001$).

При анализа на литературните данни, включително и на тези, отнасящи се до българската популация се установява, че чрез теста на Friberg – TAT, спермоантитела се доказват в 4% до 36% при мъжете и в 8% до 28% при жените (Генов и сътр., 1979; Menge et al., 1980; Fichorova et al., 1992). При проведени изследвания на серуми от инфертилни пациенти (обем на извадката, n=326) чрез

аглутинационните методи (GAT и TAT) диагностично значими титри на спермоантитела се установяват в 4,8% от мъжките серуми и в 0% от женските чрез GAT и в 31% от мъжките и 21,6% от женските серуми чрез TAT (Димитрова и Калайджиев, 2001). Описва се и положителна линейна корелация между наличието на СА в тестираните серуми, доказани чрез GAT и TAT. Резултатите от това изследване показват известно увеличаване на честотата на спермоантитела както в TAT, така и в SIT и ELISA в Българската популация (Димитрова и Калайджиев, 2001).

Нашите резултати са в съответствие с цитираните литературни данни, касаещи честотата на спермоантитела, доказани чрез TAT в българската популация.

Феноменът, на базата на който се провеждат спермоимобилизационните методи е имобилизацията на сперматозоидите с участието на системата на комплемента и нейното активиране по класическия път, като се откриват антитела от IgM и IgG (без IgG4 субклас) класове. Чрез тези методи се идентифицират антигени с определена локализация върху сперматозоидната повърхност, като много антитела срещу антигени на сперматозоидната главичка не водят до загуба на подвижността, но намаляват способността за пенетрация в яйцеклетката.

Счита се, че SIT, при който фалшиво положителни резултати се наблюдават рядко е по-малко чувствителен от спермоаглутинационните тестове, поради това, че спермоаглутиниращите антитела не винаги принадлежат към комплемент-фиксиращи имуноглобулинови класове (Bronson et al., 1982; Shulman, 1985).

При проведените от нас изследвания на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоиди при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници чрез SIT клинично значими титри са установени в 28,57% от изследваните пациентки. При пациентките с други ендокринни заболявания положително реагиращите в SIT бяха 23,43%. Следователно от общ брой изследвани 85 пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми, процентът на положително реагиращите е 24,7%. В контролната група (104 фертилни) тази честота беше 4,81%. Изследването на серумите от пациентките с поликистозни яйчници за спермоаглутиниращи антитела чрез SIT показва статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени ($P<0,001$).

Според литературните данни в серумите на 13% - 15% от жените, страдащи от безплодие с неизяснена причина, се доказват спермоимобилизиращи антитела при проучвания, обхващащи дълъг период от време (Koyama et al., 1988; Isojima., 1992) или при изследване на различни човешки популации, от различни географски области (Galazyuk et al., 1996). За българската популация данните, касаещи позитивирането на SIT, са доста противоречиви и варират от 0% до 25% при серуми от инфертилни мъже и от 0% до 20% при серуми от инфертилни жени (Калотов, 1976; Генов, 1979; Налбански и сътр.,1986; Fichorova et al., 1992; Димитрова и Калайджиев, 2001). Това би могло да се дължи на обема на изследваната извадка, подбора на пациентите, включени в нея (предварително скриниране и подбор на тестираната група), както и с начина на отчитане на резултатите - полуколичествен метод за определяне на SIV (спермо-имобилизационно ниво) при нашите изследвания. При проведените проучвания, касаещи българската популация е установена корелация между резултатите от SIT, TAT, GAT и ELISA (Димитрова и Калайджиев, 2001), като всички серуми, положителни в SIT, са положителни и в TAT. Според някои автори високо титърните спермоимобилизиращи антитела най-добре корелират с фертилния статус на пациентите (Mettler et al., 1985), без обаче SIT да може да бъде използван като единствен метод при диагностиката на имунологично обусловеното безплодие.

Нашите резултати, касаещи честотата на доказване на спермоимобилизиращи антитела в изследваната група пациентки с репродуктивни проблеми са в съответствие с по-горе цитираните литературни данни, касаещи честотата на спермоантитела, доказани чрез SIT в българската популация.

От съвременните методи за доказване на спермоантитела широко приложение намира методът ELISA.

При проведените от нас изследвания като антигени бяха използвани цели сперматозоиди от сперматозоидна суспенсия, получени чрез метода “swim up” от фертилни донори и плаки с повишена лепяща способност в резултат на обработване с поли-L лизин хидробромид. Предимствата на ELISA в сравнение с класическите спермоаглутинационни и спермоимобилизацинни тестове се състоят във високата чувствителност и възможност за тестиране на голям брой серуми едновременно. Счита се, че по-високата честота на позитивните в ELISA серуми, при използване на цели сперматозоиди като антиген, включително и в

контролните фертилни групи, се дължи на неспецифично свързване на циркулиращи имунни комплекси и IgG-Fc фрагменти със сперматозоидите (Mettler et al., 1985). Фиксацията на сперматозоидите преди реакцията с тестирания серум може да доведе до денатурация на сперматозоидните антигени или до мембранни увреждания, даващи фалшиво положителни или лъжливо отрицателни резултати. Според някои автори, използването на разтворими антигени дава по-рядко фалшиво положителни резултати и по-добра корелация с клиничния статус (Alexander and Bearwood, 1984; Mettler et al., 1985).

При проведените от нас изследвания на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоиди при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници чрез ELISA клинично значими концентрации на спермоантитела са установени в 5,79% от изследваните пациентки. При пациентките с други ендокринни заболявания положително реагиращите в ELISA бяха 6,48%. Следователно от общ брой изследвани 177 пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми, процентът на положително реагиращите е 6,21%. В контролната група (104 фертилни) тази честота беше 2,88%. Изследването на серумите от пациентките с поликистозни яйчници за спермоаглутиниращи антитела чрез ЕЛИЗА не показва статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени ($P > 0,05$).

Fichorova и Nakov (1993) при изследване чрез ELISA на серуми от безплодни пациенти, положителни и отрицателни в класическите тестове за спермоантитела, установяват позитивиране на ELISA в 38,3% от всички пациенти, като 30,85 са положителни в класическите тестове, а 7,45% - са отрицателни в тези тестове.

Стратегията, която се използва сега при изследването на спермоантитела в световните водещи центрове по репродуктивна медицина и у нас, е свързана с използването на повече от два метода (Bronson, 1999; Krapez et al., 1998;); (Lenzi et al., 1997); (British Andrology Society, 1998); MAR и TAT (Ватев и сътр., 2000). В нашата лаборатория тази комбинация включва: GAT, TAT, SIT, ELISA.

В заключение, на базата на анализираните литературни данни, като и на опита на нашата лаборатория по Репродуктивна имунология, може да бъде направен изводът, че ***методите, използвани за диагностика на спермоантитела, имат различна разкриват различни антиген-***

специфичност, чувствителност, антитяло системи. При диагностиката на репродуктивни проблеми, свързани с хуморален имунен отговор срещу сперматозоидни антигени е необходим комплексен подход, включващ прилагането на комбинация от тестове за спермоантитела, въвеждане на нови техники, както и добра корелация между лабораториите по диагностика на спермоантитела и клиниката.

4.2. Изследване за наличие на антитела срещу алфа-кристалини в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез ELISA

Алфа-кристалините са много консервативни белтъци. Откриват се при различни прокариоти и еукариотни организми, както и в различни тъкани и органи на човека, включително и в репродуктивни органи (плацента, тестис, овариум) (Бътева И.,2014; Zapryanova, S., 2014***). В настоящата работа е установена умерена до силна експресия в различни тъкани на човешки ембрион и фетус на различните форми на алфаВ кристалините. Повишените концентрации на циркулиращи антитела срещу тях биха могли да бъдат причина за репродуктивни проблеми – напр. имунологичен конфликт на майчино-феталната граница, който влошава фето-плацентарната перфузия и може да доведе до спонтанен аборт.*** Възможно е през плацентата да преминат антитела срещу алфа-кристалините, които са индуцирани от прекарани инфекции, причинени от бактерии, експресиращи този стресов протеин. Достигайки до фетуса в резултат на имунна реакция с експресираните антигени, те биха могли да доведат до имунни реакции, увреждащи тъканите на плода. ***Изучаването на хуморалния имунен отговор срещу стресови протеини би могло да даде нов аспект в изясняване етиологията на безплодието и нови насоки в лечението му.***

Водещо място сред нарушенията на овулацията, причиняващи безплодие, заема синдромът на поликистозните яйчници (PCOS). Съществуват данни, че определени групи на жени с поликистоза, имат повишена концентрация на серумни анти-спермални антитела. Съществуват данни за органно-неспецифични автоантитела при пациентки с поликистоза на яйчника. Такива антитела биха могли да бъдат насочени срещу стресови протеини, например анти-алфаВ кристалинови антитела. Ето защо бе ***проследен хуморалният имунен***

отговор срещу сперматозоидите и срещу алфа-кристалините, тъй като и двата са в своеобразна имунологична изолация и са потенциални автоантигени.

Проведеното изследване чрез ELISA на серуми от пациентки с поликистоза на яйчниците и пациентки с други ендокринни заболявания за антитела срещу алфа-кристалините показа, че ***при PCOS е на лице повишена концентрация на антитела срещу алфа-кристалините, както и повишена честота на позитивни серуми.*** Повишената концентрация и честота на позитивни пациентки е статистически значимо спрямо контролната група ($P < 0.5$, Mann-Whitney test). ***Статистически значимо е повишена и честота на позитивните за анти-алфа-кристалинови антитела в пациентските и контролната група*** ($P < 0.05$, Fisher's exact test).

Известно е, че промотора на гена за алфаВ кристалин освен конститутивна нискодозова тъканно специфична синтеза, може да медиира повишена експресия на белтъка, причинена от стресови фактори. Bakthisaran R. Et al., 2015, откриват повишено ниво на експресия на αB-crystallin в тъкани, подложени на продължителен оксидативен стрес.

Buteva-Hristova et al. 2009, доказват наличие на алфа-кристалини в миши яйчници. Чрез имунопероксидазна реакция и използване на анти-αB антитела те установяват експресия на αB-crystallins във фоликули са различна степен на зрялост. Най-интензивна реакция се наблюдава в последните стадии на зреене (Graafian follicle). Свръхекспресията на sHSP27 в овоцити, изолирани от пациентки с PCOS, води до инхибиция на овоцитното зреене, но повишава потенциала на ембрионалното развитие (L. Cai et al, 2013) При жени с PCOS, овулацията често е невъзможна, което води до фоликуларен арест (Zhivkova R. et al., 2013). Това може да доведе до увеличено количество на стресови протеини във фоликуларната течност, която би могла да влезе в контакт с имунната система при възпалителни процеси, съпътстващи PCOS (Gao H., 2013).

През последните години в литературата възникна дискусия относно ролята на α-кристалините като автоантигени. Оценката на αB-crystallin като автоантиген се дължи преди всичко на доказването на специфични антитела срещу този нискомолекулен стресов протеин. При изследване кинетиката на свързване между αB-crystallin и антитела срещу него Rothbard et al. (2017), доказват, че комплексите, получени при реакцията са по-стабилни в сравнение с тези при

типичната антиген-антитяло реакция. Те правят спекулативно заключение, че ролята на стресовите протеини като автоантигени, следва да бъде преразгледана и преоценена. От друга страна, Papuc et al, (2015), приемат, че α-crystallins са потенциални автоантигени, тъй като експресията на антитела срещу α-crystallins и други нискомолекулни стресови протеини са наблюдавани в ниски концентрации и при здрави контроли (определяни като естествени антитела), както и при пациенти, страдащи от Паркинсонова болест. С напредването на невро-дегенеративните заболявания концентрацията на антителата от клас IgG и клас IgM срещу αB-crystallin нараства, което предполага, че прогресията на болестта е свързана с активиране на имунен отговор. Независимо от причината за повишението на концентрацията на антителата срещу αB-crystallin ние смятаме, че те биха могли да бъдат включени като биомаркери при изследването на пациенти с ендокринни и репродуктивни проблеми.

VI. ИЗВОДИ

1. Изолирани са алфа-кристалини от водно-солеви екстракти на свинска и човешка очна леща чрез гелна хроматография върху Biogel A-5m.

2. Получен и характеризиран е хиперимунен заешки серум срещу хроматографски пречистени алфа-кристалини чрез субкутанна имунизация на зайци по имунизационна схема с използването на пълен адювант на Фройнд и е доведен до моноспецифичност чрез абсорбция с лиофилизирана човешка плазма.

3. Доказана е експресията на алфа-кристалини (нефосфорилирана и фосфорилирана форма) чрез имунохистохимични методи с използването на поликлонални хиперимунни серуми и моноклонални антитела:

а) върху парафинови срези от тъканите на човешки ембрион :

- нефосфорилираният алфа-В-кристалин не се открива в тимус, хрущял, мезонефрос, мозък, бял дроб, гонади, надбъбрек и интестинален епител. Умерена до силна експресия се наблюдава в назален епител, ядра на вкостяване, сърце, аорта, скелетни мускули, кожен епител, дуктус кохлеарис, зачатък на зъб.

- фосфорилираната форма на алфа-В-кристалин дава положителна цитохимична реакция в тимус, сърце, надбъбречни жлези, мезонефрос, интестинален епител, зачатък на зъб, скелетни мускули, кожен епител;

б) върху парафинови срези на тъкани на човешки фетус:

- нефосфорилираният алфа-В-кристалин не се експресира в хепатоцити, чревен епител, гломерули в бъбрека, тела на неврони в мозъка, но дава интензивна цитохимична реакция в миокард и епител на извитите каналчета в бъбрека

- фосфорилираният алфа-В-кристалин се експресира във всички изследвани тъкани – миокард, тимус, гломерули и извити каналчета на бъбрека, ядра на неврони, хепатоцити и чревен епител.

4. Анализиран е хуморалният имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация:

а) чрез изследване за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени на серуми от пациенти с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми с прилагане на спермоаглутинационни, спермоимобилизационни методи и ELISA е доказано статистически значимо повишена честота на

спермоимобилизационни и спермоаглутинационни антитела в серумите от пациентки с поликистозни яйчници.

б) чрез изследване за наличие на антитела срещу алфа-кристалини в серуми на пациенти с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми с прилагането на ELISA е установено статистически значимо повишена концентрация на антитела, както и честота на позитивните серуми при пациентките със синдрома на поликистозните яйчници.

в) установено е, че при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници съществува повишен хуморален имунен отговор срещу изследваните от нас антигени в имунологична изолация.

VII. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-теоретичен характер:

1. Получени са оригинални данни за експресията на нискомолекулния стресов протеин αB-crystallin (нефосфорилирана и фосфорилирана форма) в тъкани на човешки ембрион.
2. Получени са оригинални данни за експресията на нискомолекулния стресов протеин протеин αB-crystallin (фосфорилирана форма) в тъкани на човешки фетус.
3. Получени са потвърдителни данни за експресията на нискомолекулния стресов протеин αB-crystallin (нефосфорилирана форма) в тъкани на човешки фетус.

Приноси с научно-приложен характер:

1. Установена е повишена честота на спермоимобилизиращи и спермоаглутиниращи антитела в серуми от пациентки с поликистозни яйчници и репродуктивни проблеми.

2. Чрез ELISA са установени повишени концентрации на антитела срещу алфа-кристалини и честота на позитивни серуми при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници и репродуктивни проблеми.

3. Доказана е зависимост между синдрома на поликистозните яйчници и повишен хуморален имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация (сперматозоидни антигени и алфа-кристалини).

Приноси с методичен характер

1. Изолирането на алфа-кристалин от водно-солеви екстракти на очна леща чрез гелна хроматография има приносен потвърдителен характер.
2. Получаването на високотитърен моноспецифичен имунен серум чрез субкутанна имунизация на зайци с хроматографски изолиран алфа-кристалин и пълен адювант на Фройнд е с потвърдителен характер.

VIII. ЛИТЕРАТУРА

1. Буланов, И. Д., С. М. Живков, Л. С. Наков, К.И.. Серологични и имунофлуоресцентни проучвания върху ксено-антигените на сперматозоиди от човек и от някои бозайници. В: Имунолгия репродукции, IV Варна, Болгария, 1978, БАН, С., 1979, 228-230.
2. Буланов, И. Д. Проучвания сърху антигените на човешката семенна плазма. Канд. дисертация, С., 1976.
3. Бътева – Христова, И., Експресия и значение на нискомолекулни стресови протеини за репродукцията при експериментален модел и човек, София, 2014,
4. Ватев Ил. Микроспермоаглутинационен тест на Фриберг. В: Резюмета "Съвременни методи в медико-биологичните изследвания",София,1977, 7.
5. Ватев И., В. Дамянова, Д. Димитрова-Диканарова, С. Калайджиев. Първи успешни резултати от лечението на пациенти с клинично значими стойности на спермоантитела чрез методите на асистираната репродукция. Акушерство и гинекологияр Suppl. 1, 2000, 39, 13-15.
6. Вълчанов, В., Р. Попиванов, Имунологична характеристика на особените автоимунопатии у човека. – В кн: Автоантигенност и автоимунитет, С, Медицина и физкултура, 1972, с. 197-270.
7. Генов М. И., Л. С. Наков, С. М. Живков, Т. И. Еврев, И. Ц. Ватев, И. В. Младенов, Т. Братанова, К. Киров. Изследвания върху честотата на авто-и изо-спермоантителата у безплодни брачни двойки. Сборник с доклади от IV Междунаpаден симпозиум по имунология на репродукцията, Варна 19-22 септември 1978, БАН, София 1979, 288-294.
8. Генов, Н. Синдром на поликистозните яйчници. Medinfo, 4, 2006.
9. Димитрова-Диканарова Д.К. Характеристика на сперматозоидо-обличащи антигени, идентифицирани чрез моноклонални антитела. Автореферат на канд. дисертация., София, 1989.

10. Димитрова Д., С. Калайджиев, Л. Наков. Ролята на спермоантителата в индуцирането на имунологично обусловено безплодие при човека. Акушерство и гинекология, Vol. 40, №3, 2001a, 34 - 38 – обзор.
11. Димитрова Д. К., Св. К. Калайджиев, Л. Наков. Промени в честотата на спермоантителата у брачни двойки с неизяснен инфертилитет в България. Българска Медицина, Vol. IX, № 2, 2001b, 23 - 25.
12. Димитрова Д.К., Ц. Маринова. Приложима ли е количествената оценка на резултатите от някои имуноензимни и имуноцитохимични методи в анализа на биологичната роля на сперматозоидните антигени? Андрология, Vol. 10, №4, 2001, 12-16.
13. Димитрова Д. К., Св. К. Калайджиев. Промени в честотата на спермоантителата у брачни двойки с неизяснен инфертилитет в България. Българска Медицина, 2001, Vol. IX, №2, 23 – 25.
14. Димитрова Д., С. Калайджиев, Л. Наков. Методи за доказване на спермоантителата, свързани с имунологично обусловеното безплодие при човека. *Акушерство и гинекология*, Vol. 41, №3, 2002, 43-48. (SJR за 2002 – 0,102)
15. Димитрова Д., Л. Наков. Терапевтични подходи при безплодието, свързано с продукцията на спермоантитела. *Акушерство и гинекология*, Vol. 42, №6, 2003, 28-31. (SJR за 2003 – 0,102)
16. Димитрова Д. Сперматозоидните антигени като обект за разработване на контрацептивна ваксина. *Андрология*, Vol. 13, №1, 2004, 9-18.
17. Живков, С. М. Проучвания върху адсорбцията и десорбцията на груповите семенноплазмени антигени от сперматозоидите на човека. Канд. дисерт., С., 1975
18. Живкова Р., М. Пъневска, С. Делимитрева, М. Маркова, В. Николова, И. Чакърова, Т. Тенев, В. Хаджинешева, К. Майнхард, И. Ватев (2013). Изследване на цитокератиновите и виментиновите интермедиерни филаменти при поликистоза на яйчника (PCOS) – присъствие и характерна структура на телце на Балбиани в примордиалните фоликули. Акушерство и гинекология, 52 (7): 7-12.
19. Калотов П. С. Кандидатска дисертация, София 1976.

20. Маркова М., В. Николова, Цв. Маринова (2009). Наличие и асиметрично разпределение на цитоскелетния белтък виментин в сперматозоидната главичка при плъх. Андрология, т. 18, бр. 1: 3-5.
21. Маркова М., В. Николова, Цв. Маринова (2010). Имуноцитохимична локализация на цитокератини в главичката на човешки сперматозоиди. Андрология, т. 19, бр. 2: 14-16.
22. Наков, Л.С., С. М. Живков, Р.П. Попиванов, И. И. Подоплелов, И. А. Глинский, Г.П. Трибулев, В.Г Крюков. Об аутоантигенах тестит и култур тестис морксих свинок. В: Иммунология сперматозоидов и оплодотворения, БАН, С., 1969, 213-219.
23. Наков, Л.С., С. М. Живков, И.Д. Буланов, Т.И. Еврев, В. В. Диков, И. Ц. Ватев, И. В. Младенов, И. И. Подоплелов, М. М. Капичников. Получаване на клетъчно-специфичен анти-сперматозоиден серум и опит за солубилизиране на клетъчноспецифичен сперматозоиден антиген чрез автолиза. В: Имунология репродукции, IV, Варна, Болгария, БАН, С., 1979, 182-185.
24. Налбански Б. А., Р. К. Станиславов, С. Г. Иванов. Частота спормоантител у партнеров в бесплоднъйх семьях. Biologia et Immunologia Reproductionis 1986, 12, 48-50.
25. Попиванов, Р. Имуногенетика на човешките сперматозоиди. Съвр. Мед., 19, 1968, 5, 429-438.
26. Трифонова Н. Проучвания върху онтогенезата на водноразтворимите белтъци на Lens Crystallina у човека. София, 1985, Специализиран научен съвет по имунология при ВАК.
27. Фичорова Р. Н. Методи за доказване на серумни спемоантитела като част от комплексното изследване на пациенти с неизяснени причини за безплодие. Андрология, 1, 1993, 31 – 37.

28. Adeghe A. J. H., J. Zhang, J. Cuthbert et al. Antisperm antibodies and sperm motility: a study using timed exposure photomicrography. Int. J. Androl., 1989, 12, 281 - 285.
29. Ahmad M, Raman B, Ramakrishna T, Rao C: Effect of phosphorylation on alpha B-crystallin: differences in stability, subunit exchange and chaperone activity of homo and mixed oligomers of alpha B-crystallin and its

phosphorylation-mimicking mutant. *J Mol Biol* 2008, 375(4):1040-1051.

30. Alborzi, S., F. Tavazoo, A. S. Dehaghani, A. Ghaderi, S. Alborzi, M. Alborzi. Determination of antiovarian antibodies after laparoscopic ovarian electrocauterization in patients with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 91, 4, 2009, 1159-1163.

31. Allen, R.L., O'Brien, D.A., Jones, C.C. et al. (1988) Expression of heat shock proteins by isolated mouse spermatogenic cells. Mol. Cell Biol., 8, 3260- 3266.
32. Alexander N. J., D. Bearwood. An immunosorption assay for antibodies to spermatozoa: comparison with agglutination and immobilization test. Fertil. Steril., 1984, 41, №2, 270 – 276.
33. Al-Saab, R., S. Haddad. Detection of thyroid autoimmunity markers in euthyroid women with polycystic ovary syndrome: a case-control study from Syria. Int.. J Endocrinol. Metab., 12, 3, 2014, e17954.
34. Ambrosio, L. and Schedl, P. (1984) Gene expression during Drosophila melanogaster oogenesis: Analysis by in situ hybridization to tissuesections. Dev. Biol., 105, 80-92.
35. Anaforoglu, I., M. Topbas, E. Algun. Relative associations of polycystic ovarian syndrome vs metabolic syndrome with thyroid function, volume, nodularity and autoimmunity. J. Endocrinol. Invest., 34, 9, 2011, e259-e264.
36. Arora, S., K. Sinha, S. Kolte, A. Mandal. Endocrinal and autoimmune linkage: Evidences from a controlled study of subjects with polycystic ovarian syndrome. J. Hum. Reprod. Sci., 9, 1, 2016, 18-22.
37. Arrigo, A.P., Simon, S., Gibert,B., Kretz-Remy, C., Nivon,M., Czekalla, A., Guillet,D., Moulin,M., Diaz-Latoud, Ch., Vicart, P. Hsp27 (HspB1) and αB-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. Cellular Stress, Minireview, Edited by R. Barouki, FEBS Letter, 2007, 581, 19, 31: 3665–3674
38. Azziz, R., W. Y. Chang, F. Z. Stanczyk, K. Woods. Effect of bilateral oophorectomy on adrenocortical function in women with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 99, 2, 2013, 599-604.

39. Bagchi, M.K., Tsai, S.Y., Tsai, M.J.and O'Malley, B.W. (1991) Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, Hsp56, Hsp70. Mol. Cell. Biol., 11: 4998-500.
40. Bakthisaran R, R. Tangirala, Ch. M. Rao. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. Biochimica et Biophysica Acta. 2015; 291-319.
41. Barouki R, Volume 581, Issue 19, 31 July 2007, Pages 3665–3674 Hsp27 (HspB1) and αB- crystallin (HspB5) as therapeutic targets. FEBS Letter, Volume 581, Issue 19, 31 July 2007, Pages 3665–3674
42. Batova I. N., M. D. Ivanova, M. V. Mollova, S. D. Kyurkchiev. Human sperm surface glycoprotein involved in sperm – zona pellucida interaction. Int. J. Andr., 21, 1998, 141 – 153.
43. Benjamin IJ., Shelton J., Garry DJ, Richardson JA. Temporospatial expression of the small HSP/alphaB-crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. Dev. Dyn. 1997; 208 (1): 75-84.
44. Bennardini F., Wrzosek, A. and Chiesi, M. Alpha crystallin in cardiac tissue. Association with actin and desmin filaments. Circulation Research, 1992,Vol 71, 288-294.
45. Bensaude, O., Babinet, C., Morange, M. and Jacob, F. (1983) Heat-shock proteins, first major products of zygotic gene activity in the mouse embryo. Nature, 305, 331-333.
46. Ben-Shlomo, I., J. S. Younis. Basic research in PCOS: are we reaching new frontiers? Reprod. Biomed Online, 28, 6, 2014, 669-683.
47. Bhat SP, Nagineni CN (1989) Alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. Biochem Biophys Res Commun 158:319-325.
48. Biro, K, Jadnakovits, A., Kukorelli, T. et al. (1996) Biomoclomol (BRLP-42) ameliorates amelioratesipherial neuropathy in streptozotocin diabetic rats, Brain Res. Bull.,44: 259-263.
49. Boyle, J., H. J. Teede. Polycystic ovary syndrome - an update. Aust. Fam. Physician, 41, 10, 2012, 752-756.

50. Breloer M, Fleischer B, von Bonin A (1999) In vivo and in vitro activation of T cells after administration of Ag-negative heat shock proteins. J Immunol 162:3141 – 3147.
51. British Andrology Society. Seminal fluid analysis & Anti – sperm antibody testing. Standart operating procedures – laboratory manual, 1998, 14 – 17.
52. Bronson R. A., G. W. Cooper, D. L. Rosenfeld. Sperm – specific iso – and auto – antibodies inhibit binding of human sperm to human zona pellucida. Fertil. Steril., 38, 1982, 724 – 729.
53. Bronson R. A., G. W. Cooper, D. L. Rosenfeld. Sperm antibodies:Their role in infertility. Fertil. Steril., 1984, 42, 171 – 183.
54. Bronson R. A. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. J. Reprod. Immunol., 45, 1999, 159 - 183.
55. Buteva-Hristova, I., Trifonova, N., Genov, M., Bechev, B., Stamenova, M. (2009) Antibodies against alpha crystallins in women with reproductive failures. Compt. Rend. Acad.bulg. Sci., 62, 2: 285-291.
56. Cai L., X. Ma, S. Liu, J. Liu, W. Wang, Y. Cui, W. Ding, Y. Mao, H. Chen, J. Huang, Z. Zhou, J. Liu, Effects of upregulation of Hsp27 expression on oocyte development and maturation derived from polycystic ovary syndrome, PLoS One 8 (2013) e83402.
57. Calvar, C. E., S. V. Bengolea, S. I. Deutsch, R. Hermes, G. Ramos, M. Loyato. High frequency of thyroid abnormalities in polycystic ovary syndrome. Medicina (B. Aires), 75, 4, 2015, 213-217.
58. Cerrone, M.C., Ma, J.J. and Stephens, R.S. (1991) Cloning and sequence of the gene for heat shock protein 60 from Chlamydia trachomatis and immunological reactivity of the protein. Infect. Immun., 59, 79-90.
59. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H (1999) Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. J Immunol 162:32123219.
60. Christians, E., Campion, E., Thomson, E.M. and Renard, J.P. (1995) Expression of the hsp70.1 gene, a landscape of early zygotic gene activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. Development, 12, 113-12.
61. Christians, ES, Q. Zhou, JP. Renald and IJ. Benjamin, Heat shock proteins in mammalian development, Seminars in Cell and Development Biology, 2003; 14:283-290.

62. Chun-hong Xia, Haiquan Liu, Bo Chang , Catherine Cheng, Debra Cheung, Meng Wang, Qingling Huang, Joseph Horwitz, Xiaohua Gong (2006). Arginine 54 and Tyrosine 118 Residues of αA-Crystallin Are Crucial for Lens Formation and Transparency, 10.1167/iovs.06-0178 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 47 no. 7 3004-3010.
63. Ciocca D.R., A.O. Stati, M.A. Fanelli, M. Gaestel (1996). Expression of heat shock protein 25000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy. Biology of reproduction. 54:1326-1335
64. Clarke G. N., A. Lopata, J. C. McBain et al. Effect of sperm antibodies in males on human in vitro fertilization (IVF). Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 1985, 8, 62 – 66.
65. Codner, E., N. Soto, P. Lopez, L. Trejo, A. Avila, F. C. Eyzaguirre, G. Iniguez, F. Cassorla. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. J. Clin. Endocrino.l Metab., 91, 6, 2006, 2250-2256.
66. Cotlier E., The lens. – In: Adler's Physiology of the Eye.Clinical Aplication, Saint Luis, 1975: 275-298.
67. Curci, A., Bevilacqua A. and Mangia, F. (1987) Lack of heat shock response de in preovulatory mouse oocytes. Dev. Biol., 123, 154-160.
68. Curci, A., Bevilacqua, A., Fiorenza, M.T. and Mangia, F. (1991) Developmental regulation of heat shock response in mouse oogenesis: Identification of differentially responsive oocyte classes during Graafian follicle development. Dev. Biol., 144, 362-368.
69. De Almeida M., I. Gazadne, C. Jeulin et al. In – vitro processing of sperm with autoantibodies and in – vitro fertilization results. Hum. Reprod., 1989, 4, 49 – 53.
70. De Almeida M., R. Zouari, P. Jouannet et al. In vitro effects of antisperm antibodies on human sperm movement. Hum. Reprod., 1991, 6, 405 - 410.
71. Diekman, A. B., J. C. Herr. Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. Am. J. Rep. Immunol., 37, 1997, 111 – 117.
72. Diekman A. B., E. J. Norton, K. L. Klotz, V. A. Westbrook, J. C. Herr. Evidence for a unique N - linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. Immunol. Rev., 171, 1999, 203 - 211.

73. Dimitrova-Dikanarova D.K., S. D. Kyurkchiev, I.R. Kehayov, H.A. Spasov. Production and characterization of monoclonal antibodies against antigen epitopes specific to human seminal plasma. C.R. Bulg. Acad. Sci., 41, 4, 1988, 93-96
74. Dimitrova-Dikanarova D.K., Y. Tsuji, H. Shibahara, M. Mitsuo, T. Hashimoto, K. Koyama. Establishment of B cell line producing human antisperm antibodies by Epstein-Barr virus transformation of peripheral blood lymphocytes from infertile women with sperm immobilizing antibodies. In: Proceedings of the 10th Annual Meeting of Japan Society for Immunology of Reproduction, Held in Kurashiki, 16-17 December, 1995; Editor H. Tanaka, Published by JSIR, Center for Acad. Soc. Japan, Osaka, 1996a, 41-42.
75. Dimitrova-Dikanarova D.K., Y. Tsuji, Y. Nakata, H. Shibahara, M. Mitsuo, T. Hashimoto, J. Furuyama and K. Koyama. Characterization of anti-sperm antibodies and their coding cDNA sequences by Epstein-Barr virus transformed B cell lines from lymphocytes of infertile women possessing anti - sperm antibodies. J. Reprod. Immunol., 32, 1996b, 171-191
76. Dimitrova-Dikanarova D.K., Ts. Ts. Marinova. Quantitatively assessed blocking effect of sera from infertile patients on the activity of a monoclonal antibody against human sperm-coating antigen. C. R. Bulg. Acad. Sci., Vol. 53, №1, 2000, 97-100.
77. Dinkova, M. Humoral immune response to antigens in immunological isolation. 15th International Congress of Medical Sciences for Students & young doctors, 12-15 May, 2016, Medical University of Sofia, Bulgaria.
78. Dix, D.J. (1997) Hsp70 expression and function during gametogenesis. Cell Stress Chaperones, 2, 73-77.
79. Dix, D.J., Garges, J.B. and Hong, R.L. (1998) Inhibition of hsp70-1 and hsp70-3 expression disrupts preimplantation embryogenesis and heightens embryo sensitivity to arsenic. Mol. Reprod. Dev., 51, 373-380.
80. Dubova – Michailova, M., M. Mollova, M. Ivanova, I. Kehayov, S. Kyurkchiev. Identification and characterization of human acrozomal antigen defined by a monoclonal antibody with blocking effect on in vivo fertilization. J. Reprod. Immunol., 19, 1991, 251 – 268.
81. Ellis, R.J. (1987) Proteins as molecular chaperons. Nature, 328, 378-379.

82. Erel, C. T., L. M. Senturk, S. Kaleli, A. Gezer, B. Baysal, E. Tasan. Is serum leptin level regulated by thyroid functions, lipid metabolism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? Gynecol. Endocrinol., 17, 3, 2003, 223-229.
83. Espey, L.L. (1994) Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biol. Reprod., 50, 233-238.
84. Fichorova R., G. J. Anderson. Use of sperm viability and acrosomal status assays in combination with immunofluorescence technique to ascertain surface expression of sperm antigens. J. Reprod. Immunol., 1991, 20, 1 – 13.
85. Fichorova R, L.Nakov, I.Mladenov, R.Stanislavov. Comparative results of the classical sperm antibody assays applied to 940 infertile patients. Comp rend Acad bulg Sci 1992,45,133-136
86. Fichorova R. N., L. S. Nakov. The use of ELISA to evaluate human antibodies to to epididymal sperm from different species.Am. J. Reprod. Immunol., 1993, 29, 109 - 115.
87. Galazyuk L. V., V. P. Chernichov, D. Aravantinos, F. V. Dakhno, Yu. Djabarova, H. Donat, V. Ishev, M. Kurpisz, L. Nakov, S. Shulman, Z. Ulkova – Gallova. Frequency of sperm antibodies distribution in infertile couples from different human populations. Centr. Eur. J. Immunol., 1996, 21, 106 – 109.
88. Gandini L., F. Lombardo, A. Lenzi, F. Dondero. Radio – immunobinding test for auto – sperm antibody detection analysis and critical revision of various methodological steps. Andrologia, 1991, 23, 61 - 68.
89. Ganie, M. A., R. K. Marwaha, R. Aggarwal, S. Singh. High prevalence of polycystic ovary syndrome characteristics in girls with euthyroid chronic lymphocytic thyroiditis: a case-control study. Eur. J. Endocrinol., 162, 6, 2010, 1117-1122.
90. Gao H, J. Meng, Xu M, Zhang S, Ghose B, Liu J, Yao P, Yan H, Wang D, Liu L. Serum heat shock protein 70 concentrarion in relation to Polycystic ovary syndrome in non-obese chinese population. PloS One. 2013;8(6): e67729.
91. Gateva, A., Z. Kamenov, D. Dimitrova, M. Evrev, I. Vatev. Antisperm antibodies and infertility in PCOS patients. World congress of gynecological endocrinology, March 5-8 2014, Firenze, Italy.

92. Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell 94:73-82.
93. Gottesman S (1998) Protecting the neighborhood: extreme measures. Proc Natl Acad Sci U S A 95:2731-2732.
94. Grad I, Picard D (September 2007). "The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones". Mol. Cell. Endocrinol. 275 (1-2): 2-12.
95. Gruidl M., A. Buyuksal, A. Babaknia, A. T. Fazleabas, S. Sivarajah, P.G. Satyaswaroop, S. Tabibzadeh (1997). The progressive rise in the expression of α crystallin B chain in human endometrium is initiated during the implantation window: modulation of gene expression by steroid hormones. Molecular Human reproduction. (3-4):333-342
96. Hall HK, Karem KL, Foster JW (1995) Molecular responses of microbes to environmental pH stress. Adv Microb Physiol 37:229-272.
97. Haller K., A. Salumets, M. Grigorova et al., Putative predictors of antibodies against follicle-stimulating hormone in female infertility: a study based on in vitro fertilization patients, American Journal of Reproductive Immunology, vol. 57, no. 3, pp. 193–200, 2007.
98. Hefler-Frischmuth, K., K. Walch, W. Huebl, K. Baumuehlner, C. Tempfer, L. Hefler. Serologic markers of autoimmunity in women with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 93, 7, 2010, 2291-2294.
99. Heikkila, J.J., Miller, J.G.O., Schultz, G.A. et al. (1985) Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of Xenopus laevis. Dev. Biol., 107, 483-489.
100. Heikkila, J.J., Browder, L.M., Genamu, L. et al. (1986) Heat shock gene expression in animal embryonic systems. Can. J. Genet. Cytol., 28, 1093-1105.
101. Herman C, D'Ari R (1998) Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. Curr Opin Microbiol 1:204-209.
102. Horwitz J, Bova M, Ding L, Haley D, Stewart P: Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye (Lond)* 1999, 13(Pt 3b):403-408.
103. Hunt, C. Morimoto R.I. (1985) Conserved features of eucaryotic Hsp70 genes revalated by comparision with the nucleotide sequence of human Hsp70. Proc. Natle Acad. Sci. USA, 82:6455-6459.
104. Inaguma Y, Hasegawa K, Goto S, Ito H, Kato K (1995) Induction of the synthesis of hsp27 and alpha B crystallin in tissues of heat-stressed rats and its

suppression by ethanol or an alpha 1-adrenergic antagonist. J Biochem (Tokyo) 117:1238-1243.

105. Isojima S. My lifw work on gamete immunology. President's Address Fifth International Congress of Reproductive Immunology, 1992, Rome, Italy.
106. Ito, H., K. Okamoto, H. Nakajama, T. Isobe, K. Kato. Phosphorilation of crystalline in response to various types of stress. J. Biol. Chem. 272 (1997) 29934-29941.
107. Iwaki T., T. Wisniewski, A. Iwaki, E, Corbin, N. Tomokane, J. Tatieshi, JE Goldman. Accumulation of αB crystallin in central nevous system glia and neurons in pathological conditions. Mam J Pathol. 1992; 140: 345-350
108. Janssen, O. E., N. Mehlmauer, S. Hahn, A. H. Offner, R. Gärtner. High prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. Eur. J. Endocrinol., 150, 3, 2004, 363-369.
109. Jarrow J. P., J. J. Sanzone. Risk factors for male partner antisperm antibodies. J. Urol., 1992, 148, 1805 - 1807.
110. Jones, D.B., Coulson, A. F. and Duff, G.W. (1993) Sequence homology between hsp60 and autoantigens. Immunol. Today, 14, 115-118.
111. Kachuei, M., F. Jafari, A. Kachuei, A. H. Keshteli. Prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. Arch. Gynecol. Obstet., 285, 3, 2012, 853-856.
112. Kappé G, Franck E, Verschuure P, Boelens W, Leunissen J, WW dJ: The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10. *Cell Stress Chaperones* 2003, 8(1):53-61.
113. Kato K, Shinohara H, Kurobe N, Inaguma Y, Shimizu K, Ohshima K (1991) Tissue distribution and developmental profiles of immunoreactive alpha B crystallin in the rat determined with a sensitive immunoassay system. Biochim Biophys Acta 1074:201-208.
114. Kaufmann, S.H. (1990) Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today, 11, 129-136.
115. Kaye NW, Church RL, Piatigorsky J, Petrash JM, Lalley PA. (1985) Assignment of the mouse alpha A-crystallin structural gene to chromosome 17. Curr Eye Res., 4(12):1263-1268.
116. Khanna, A. Aten, R.F. and Behrmann, H.R. (1995) Heat shock protein-70 induction mediates luteal regression in the rat. Mol. Endocrinol., 9, 1431-

1440.

117. Koyama K., K Kubota, K. Ikuma M. Shigeta and S . Isojima. Application of the quantitative sperm immobilization test for follow – up study immobilizing antibody in sera of sterile women. Int. J. Fertil., 33, 1988, 201 -206.
118. Krapez J. A., Hayden C. J., A. J. Rutherford and A. H. Balen. Survey of the diagnosis and management of antisperm antibodies. Human Reprod., 1998, 13, 3363 – 3367.
119. Kregel K: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol (1985)* 2002, 92(5):2177-2186.
120. Kyurkchiev S.D., M. Shigeta, K. Koyama, S. Isojima. A human – mouse hybridoma producing monoclonal antibody against human sperm coating antigen. Immunology, 57, 1986, 489 – 492.
121. Cropp C. S., W. D. Schaff. Antispem antibodies. Arch. Immunol. Therapiae Exp., 38, 1990, 31 - 46.
122. Kyurkchiev S. D., M. Shigeta, K. Koyama, S. Isojima. A human - mouse hybridoma producing monoclonal antibody against human sperm coating antigen. Immunology, 57, 1986, 489 - 492.
123. Lamb, J.R., Bal, V., Mendez-Samperio, P. et al. (1989) Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. Intern. Immunol., 1, 191-196.
124. Launay N, Goudeau B, Kato K, Vicart P, Lilienbaum A: Cell signaling pathways to alphaB-crystallin following stresses of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 2006, 312(18):3570-3584.
125. Lazarov, V., D. Dimitrova, A. Gateva, Z. Kamenov, I. Vatev. Antisperm antibodies and infertility in patients with obesity. Folia Medica, 57, Suppl.1, 2015, 189.
126. Lee, S.J. (1990) Expression of HSP86 in male germ cells. Mol. Cell Biol., 10, 3239-3242.
127. Lenzi A. The new tests for sperm antibody detection. EOS Riv. Immunol. Immunofarm., 1986, 6, 67 - 70.
128. Lenzi A., L. Gandini, F. Lombardo, R. Rago, D. Paoli, F. Dondero. Antisperm antibody detection: 2. Clinical, biological and statistic correlation between methods. Am. J. Reprod. Immunol., 1997, 38, 224-230.

129. Lindquist, S. (1986). The heat shock response. Ann. Rev. Biochem., 55: 1151-1191.
130. Loones, M.T., Rallu, M., Mezger, V. and Morange, M. (1997) Hsp gene expression and HSF2 in mouse development. Cell Mol. Life Sci., 53, 179-185.
131. Luborsky, J. L., S. Shatavi, P. Adamczyk, C. Chiong, B. Llanes, J. Lafniztzegger, B. Soltes, P. McGovern, N. Santoro. Polycystic ovary syndrome and ovarian autoimmunity--assessment of ovarian antibodies by EIA. J. Reprod. Immunol., 42, 1, 1999, 79-84.
132. Manara GC, Sansoni P, Badiali-De Giorgi L, Gallinella G, Ferrari C, Brianti V, Fagnoni FF, Ruegg CL, De Panfilis G, Pasquineli G (1993). New insights suggesting a possible role of a heat shock protein 70-kD family-related protein in antigen processing/presentation phenomen in humans. Blood 82:2865-2871.
133. March, W. A., V. M. Moore, K. J. Willson, D. I.Phillips, R. J. Norman, M. J. Davies. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. Hum. Reprod., 25, 2, 2010, 544-551.
134. Mariani M.L., M.Souto, M.A. Fanelli, D.R. Ciocca (2000). Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal dvelopment, the oestrous cycle and early prenancy. Journal of reproduction and fertility. 120: 217-223
135. Markova M.D., V.P. Nikolova, Ts.Ts. Marinova (2011). Observations of interface between tail microtubules and outer dense fibers in human necrozoospermic spermatozoa. JBCR (Pleven) 4, No. 2: 82-85.
136. Markova M, Hadzhinesheva V, Zhivkova R, Nikolova V, Chakarova I, Delimitreva S (2016). Rearrangements of oocyte cytoskeleton during mammalian oogenesis. Acta Morph. Anthropol., 23, 145-8
137. Matson P. L., S. M. Junk, J. W. Spittle et al. Effects of antispermatozoal antibodies in seminal plasmaupon spermatozoal function. Int. J. Androl., 1988, 11, 101-106.
138. McLachlan, S. M., B. Rapoport. Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase - the common autoantigenic denominator. Int. Rev. Immunol., 19, 6, 2000, 587-618.
139. Meinhardt, A., Wilhelm, B. and Seitz, J. (1999) Expression of mitochondrial

marker proteins during spermatogenesis. Hum. Reprod. Update, 5, 108-119.

140.Menge A. C. In: Immunological aspects of infertility and fertility regulation. D. S. Dhindsa, G. E. Schumacher, eds., Elsevier North Holland, Inc., Amsterdam, 1980, 129 – 160.

141.Mettler L., A. B. Czuppon, N. Alexander et al. Antibodies to spermatozoa and seminal plasma antigens detected by various enzyme – linked immunosorbent (ELISA) assay. J. Reprod. Immunol., 1985, 8, 301 – 312.

142. Mineva, I., Russinova, A., Ahrend, M., Stamenova, M., Trifonova, N., Mainhard, K., Breipohl, W. (2005) Localization of low-molecular heat shock protein sHsp aB-crystallin in human placenta. Comt.rend.Acad.bulg Sci. 58:85-90.

143. Mizzen, L. (1998) Immune responses to stress proteins: Application to infectious disease and cancer. Biotherapy, 10:171-189.

144. Mladenov, Iv. L. Nakov, Iv. Bulanov. Spermoagglutination, hemagglutination and precipitation activity of extract from the root of Arum maculatum. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol., 7, 1985, № 2, 77.

145. Mollova M., G. Atanassova, S. Kyurkchiev, M. Ivanova, J. Peknicova. Monoclonal antibodies reacting against capacitated but not with freshly ejaculated boar spermatozoa. Am. J. Rep. Immunol., 36, 1996, 301 – 308.

146. Mollova M., Ts. Djarkova, M. Ivanova, M. Stamenova, S. Kyurkchiev. Isolation and biological characterization of boar sperm capacitation – related antigen. Am. J. Rep. Immunol., 42, 1999, 254 – 262.

147. Moomjy, M., Cholst, I., Mangieri, R. and Rosenwaks, Z. (1999) Oocyte donation: insights into implantation. Fertil. Steril., 71, 15-21.

148. Morange, M., Diu, A., Bensaude, O., Babinet, C. Altered expression of heat shock proteins in embryonal carcinoma and mouse early embryonic cells. Mol. Cell Biol., 1984, 4: 730-735.

149. Mori, C., Allen, J.W., Dix, D.J. et al. (1999) Completion of meiosis is not always required for acrosome formation in HSP70-2 null mice. Biol. Reprod., 61, 813-822.

150. Morimoto, RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Dev 12:3788-3796.

151. Nakamura S., Y. Tsuji, Y. Nakata, S. Komori, K. Koyama. Identification and characterization of a sperm peptide antigen recognized by a monoclonal

antisperm autoantibody derived from a vasectomized mouse. Bioch. Bioph. Res. Commun., 205, 1994, 1503 – 1509.

152. Nakata Y., Y. Tsuji, D.K. Dimitrova-Dikanarova, K. Sakata, Sh. Komori, K. Koyama. Analysis of a gene coding anti-murine sperm monoclonal antibody 4A11 derived from vasectomized mice. In: Proceedings of the Japanese Society for Immunology, vol.25, 1995, 3P10-24, p. 389.
153. Nakov L. S. The role of anti - sperm and anti - zona pellucida antibodies in immunologically - mediated infertility. Centr. Eur. J. Immunol., 21, 1996, 93 - 100.
154. Narberhaus, F (1999) Negative regulation of bacterial heat shock genes. Mol Microbiol 31:1-8.
155. Naz R. K., C. Morte, V. Garcia – Framis. Characterization of a sperm – specific monoclonal antibody and isolation of 95 – kilodalton fertilization antigen – 2 from human sperm. Biol. Reprod., 49, 1993, 1236 – 1244.
156. Naz R. K., A. C. Menge. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility. Fertil. Steril., 61, 1994, 1001 – 1013.
157. Naz R. K., A. Sacco, O. Singh, R. Pal, G. P. Talvar. Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): Current status. Hum. Reprod. Update, 1, 1995, 1 – 18.
158. Naz R. K. Fertilization – related sperm antigens and their immunocontraceptive potentials. Am. J. Reprod. Immunol., 44, 2000, 41 – 46.
159. Neuer, A., Lam, K.-N., Tiller, F.-W. et al. (1997) Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of human 60 kD heat shock protein in follicular fluid of IVF patients. Hum. Reprod., 12, 925-929.
160. Neuer A., S. D. Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks, S.S. Witkin. (2000). The role of heat shock proteins in repoduction. Human Reproduction Update, Vol.6, No.2 pp.149-159.
161. Neuer, A., Ruck, P., Marzusch, K. et al. (1996) Human heat shock proteins in the first trimester human decidua. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., 3, 188-189.
162. Novais Jde, S., C. L. Benetti-Pinto, H. M. Garmes, R. M. Jales, C. R. Juliato. Polycystic ovary syndrome and chronic autoimmune thyroiditis. Gynecol. Endocrinol., 31, 1, 2015, 48-51.

163. Ott, J., S. Aust, C. Kurz, K. Nouri, S. Wirth, J. C. Huber, K. Mayerhofer. Elevated antithyroid peroxidase antibodies indicating Hashimoto's thyroiditis are associated with the treatment response in infertile women with polycystic ovary syndrome. Fertil. Steril., 94, 7, 2010, 2895-2897.
164. Papuc, E, E. Kurys-Denis, W Krupski, K. Rejdak Humoral response against Small Heat Shock Proteins in Parkinson's Disease, 2015, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone0115480
165. Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet 27:437-496.
166. Peknicova J., Capkova J., G. Geussova, M. Ivanova, M. Mollova. Monoclonal antibodies to intra – acrosomal proteins inhibit gamete binding in vitro. Theriogenology, 56, 2001, 211 – 223.
167. Peknicova J., I. Lazurova, I. Dravecka, J. Vrbikova, D. Kozakova, J. Figurova, Z. Vaczy, J. Rosocha. The prevalence of non organ specific and thyroid autoimmunity in patients with polycystic ovary syndrome. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., 159, 2, 2015, 302-306.
168. Pratt WB, Morishima Y, Murphy M, Harrell M (2006). "Chaperoning of glucocorticoid receptors". Handb Exp Pharmacol **172** (172): 111–38.
169. Primakoff P., W. Lathrop, L. Woolman, Cowan, D. Miles. Fully effective contracep0tion in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH - 20. Nature, 335, 1988, 543-546.
170. Prumell MF, Y.Van Pareren, O. Bakker, WM Wiersinga. Anti-heat shock protein (hsp)72 antibodies are present in patients with Graves' disease (GD) and in smoking control group, Clin Exp Immunol 1977; 110:292–295.
171. Quax-Jeuken Y, Quax W, van Rens G, Khan PM, Bloemendal H (1985) Complete structure of the alpha B-crystallin gene: conservation of the exon-intron distribution in the two nonlinkd alpha-crystallin genes. Proc Natl Acad Sci U S A 82:5819-5823.
172. Rojansky, N., D. Roll, D. Meirow. Polycystic ovary syndrome. An autoimmune disease? J. Reprod. Med., 42, 6, 1997, 325-328.
173. Rothbard J.B. X. Zhao, O. Sharpe, M.J. Strohman, M. Kurnellas, ED Mellins, WH Robinson and L. Steinman. Chaperone activity of aB-Crystallin is Responsible for Its Incorrect Assigment as an Autoantigen in Multiple Sclerosis.

The Journal of Immunology, 2017, www immunol. org/cgi/doi/10.4049/ J. Immunol. 1003934.

174. Rumke P., G. Hellinga. Auto-antibodies against spermatozoa in sterile men. Am. J. Clin. Pathol., 1959, 32, 357 - 363.
175. Rumke P., N. van Amstel, E. N. Messa et al. Prognosis of fertility in men with sperm agglutinins in the semen. Fertil. Steril., 25, 1974, 393 - 398.
176. Sabuer K., G.N.Cherr, A.I.Yudin, P. Primakoff, M.W.Li, J.W.Overstreet. The PH 20 Protein in human spermatozoa. J. Androl., 18, 1977, 151-158.
177. Samsami, D. A., P. Razmjoei, M. E. Parsanezhad. Serum Levels of Anti-histone and Anti-double-Strand DNA Antibodies Before and After Laparoscopic Ovarian Drilling in Women with Polycystic Ovarian Syndrome. J. Obstet. Gynaecol. India, 64, 1, 2014, 47-52.
178. Seaton G.L., L. Hall, R. Jones. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motive for attachment of a glycosyl phosphatidilimositol anchor. Effect of endoproteolytic cleavage on hyaloromidase activity. Biol. Reprod., 62, 2000, 1667-1676.
179. Shulman S. and J. F. Shulman. Immunologic factors as a cause of infertility. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America, 2, 1991, 351 - 369.
180. Soltys, J.B. and Gupta, R.S. (1996) Immunoelectron microscopic lacalization of the 60kDa heat shock shaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Exp.Cell Res., 222: 16-27.
181. Spandorfer, S.D., Neuer, A., LaVerda, D. et al. (1999a) Previously undetected Chlamydia trachomatis infection, immunity to heat shock proteins and tubal occlusion in women undergoing in-vitro fertilization. Hum. Reprod., 14, 60-64.
182. Spandorfer, S.D., Liu, H.-C., Neuer, A. et al. (1999b) The embryo toxicity of hydrosalpinx fluid is only apparent at high concentrations: an in vitro model that simulates in vivo events. Fertil. Steril., 71, 619-626.
183. Tabibzadeh, S., Kong, Q.F., Satyaswaroop, P.G. and bakaknia, A. (1996) Heat shock proteins in endometrium throughout the menstrual cycle. Hum. Reprod., 11: 633-640.
184. Tiserr, A.,Mitchell,H.K., and Tracy, U. (1974). Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster:relation to chromosomal puffs. J.Mol.Biol., 84:389-398.

185. Trifonova N., S. Kalaydjiev, M. Stamenova, R. Trifonova, W. Breipohl. Porcine eye lens crystallins: antigenic similarity with human crystallins, and tool for the detection of anti-lens crystallin antibodies. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2002, 240:777-781.
186. Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ (1993). Vascular heat shock protein ekspression in response to stress. Endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. J.Clin Invest 91:465-473.
187. Van Gelderen, C. J., M. L. Gomes dos Santos. Polycystic ovarian syndrome. Evidence for an autoimmune mechanism in some cases. J. Reprod. Med., 38, 5, 1993, 381-386.
188. Vigh, L., Literati, P.N., Horvath, I. et al. (1997) Biomoclomol : A novel, nontoxic, hydroxylamine derivate with stress protein inducing activity and wide cytoprotective effects. Nature Med., 3: 1150-1154.
189. Voellmy R (2005) Dominant –positive and dominant-negative heat shock factors. Methods, 35: 199-207.
190. Voisin G. A., F. Toullet, M. Almeida. Characterization of spermatozoal auto-, iso- and allo- antigens. In: Immunological Approaches to Fertility Control, Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, E Diczfalusy, ed., Stockholm 1974, 173-201
191. Voss, AK., Thomas T., Gruss, P., 2000, Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. Development, 127, 2000 : 1-11
192. Vulchanov, V.H. Immunological and immunopathological significance of the species-, cell- and isogroup-specifity of human spermatozoa. In: Immunology of Reproduction, K. Bratanov, ed., Bulg. Acad. Sci., S., 1979, 85-93.
193. Welch, WJ. (1992) Mammalian stress response : cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol. Rev. , 72: 1063-108.
194. Werner, A., Meinhardt A., Seitz, J. and Bergmann, M. (1997) Distribution of heat-shock protein immunoreactivity in testes of infertile men. Cell Tissue Res., 288, 539-544.
195. Westwood, J.T., Clos, J. and Wu, C. (1991) Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat shock factor. Nature 353: 822-827.

196. White, B.G., Williams, S.J., Highmore, K and MacPhee, D.J. (2005) Small heat shock protein 27 (Hsp27) expression is highly induced in rat myometrium during late pregnancy and labour. Reproduction, 129: 115-126.
197. Whitham M, MA Febbraio. HSP and diabetes. In: Alexander A.A. Asea, Benete K. Pederson (Editors), Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology, 2010; vol. 5, Chapter 1:3–18.
198. Witkin, S.S., Neuer, A., Giraldo, P. et al. (1997) Chlamydia trachomatis infection, immunity, and pregnancy outcome. Infect. Dis. Obstet.Gynecol., 5, 128-132.
199. Witkin S.S. and I.M. Linhares. Heat shock proteins and fertility. In: Alexander A.A. Asea, Benete K. Pederson (Editors), Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology, 2010, Vol. 5, Chapter 9; 151–162
200. Witkin S.S. and I.M. Linhares Spandorfer, P. Giraldo, S. Dieterle, Z. Rosenwaks, S.S. Witkin.The role of heat shock proteins in repoduction. Human Reproduction Update, 2000; Vol.6, No.2:149–159
201. Wittig, S., Hensse, S., Keitel, C. et al. (1983) Heat shock gene expression is regulated during teratocarcinoma cell differentiation and early embryo development. Dev. Biol., 96, 507-514.
202. Wu Shou-Shan, R. Koleva, R. Doncheva, N. Trifonova. Regional reaction to the water-soluble proteins of the lens crystallina after alloimmunisation of rats. Comp rend Bulg Acad Sc., 53, 2000; 3: 99-102.
203. Zapryanova S., P. Rashev, K. Todorova-Hayrabedyan, Y. Martinova, M. Mollova. Expression and localization of alphaB-crystallin in normal and heat-treated mouse testes. IVth National Congress of Immunology, 2-5 October 2014, Golden Sands, Varna, Bulgaria, P33
204. Zhong, G. and Brunham, R.C. (1992) Antibody response to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 are H-2 linked. Infect. Immunol., 60, 143-149.
205. Zhu X, R. K. Naz. Fertilization antigen – 1: cDNA cloning, testis – specific expression, and immunocontraceptive effects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 944, 1997, 704 – 709.
206. Zimmerman, J.L., Petri, W. and Meleson, M. (1983) Accumulation of a specific subset of D.melanogaster heat shock mRNAs in normal development without heat shock. Cell, 32, 1161-1170.

IX. НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИЯТА

9.1 . Списък на публикациите

1. Iliana Buteva-Hristova, **Vladislav Lazarov**, Valentin Lozanov, Antoaneta Gateva, Blagovest Bechev, Katerina Kavaldzieva, Nikola Mladenov, Nedka Trifonova, Dimitrina Dimitrova-Dikanarova &

Zdravko Kamenov (2017). Serum anti-α-crystallin antibodies in womenwith endocrine disorders, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31:3, 574-580, DOI:10.1080/13102818.2017.1308232 **(ИФ за 2016 – 1,059**).

2. Dimitrina K. Dimitrova-Dikanarova, Vladislav **V. Lazarov**, Radka TafradjiiskaHadjiolova, Ivanka I. Dimova, Nina U. Petkova & Zahariy A. Krastev (2017). Association between Helicobacter pylori infection and the presence of anti-sperm antibodies, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31:1, 1-8, DOI: 10.1080/13102818.2016.1258330 **(ИФ за 2016 – 1,059**).

3. **Лазаров В**. В., Н. Л. Трифонова, Д. К. Димитрова-Диканарова (2016). Антитела срещу имунологично изолирани антигени при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници – PCOS. Акушерство и гинекология, 55,6:35-39 (**SJR за 2015 – 0,119**)

9.2. Участия в научни прояви

1. Илиана Бътева-Христова, Зафер Сабит, **Владислав Лазаров**, Недка Трифонова, Илия Ватев. Експресия на нискомолекулни стресови протеини в тъкани на репродуктивна система на мишка. IX Национална конференция по медицинска биология, 21-23.10. 2011г., гр. Плевен.

2. **Лазаров В**., И. Бътева-Христова, П. Рашев, В. Лозанов, Ил. Ватев, Д. Димитрова, Н. Трифонова. Нискомолекулни стресови протеини Алфа-В Crystallin и HSP27 в репродуктивни органи и гамети на мишка. **X Национална конференция по медицинска биология, Плевен,** 25-27 Октомври, **2013**, Резюмета на научните съобщения, **2013**, стр. 38 - 39.

3. **Lazarov V**., D. Dimitrova, A. Gateva, Z. Kamenov, Il. Vatev. Antisperm antibodies and infertility in patients with obesity. XI National Conference of Medical Biology. 15-17 May, 2015, Plovdiv, Bulgaria, In: ***Folia medica***, Vol. 57 (Suppl.1/2015), **2015**, p.189.