

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ

Катерина Каменова Кавалджиева

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ИМУНОГЕННОСТ
НА HSP27 ПРИ ПАЦИЕНТИ
С ИМУНОЛОГИЧНО ОБУСЛОВЕНО БЕЗПЛОДИЕ**

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 Димитрова-Диканарова, дм
Доц. Майя Дянкова Маркова, дб

СОФИЯ
2025

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на използваните съкращения	3
Въведение	5
1. Литературен обзор	7
1.1. Стресови протеини	7
1.2. Безплодие при човека	24
2. Цел и задачи	43
3. Материали и методи	44
4. Резултати	57
4.1. Проследяване на честотата на антиспермални антитела у пациенти с репродуктивни проблеми	57
4.2. Резултати от цитогенетичните изследвания на пациенти с репродуктивни проблеми	70
4.3. Локализация на нискомолекулярния стресов протеин Hsp27 в ембрионални тъкани чрез имунохистохимични методи	74
4.4. Проследяване на честотата на анти-Hsp27 антитела у пациенти с репродуктивни проблеми	78
4.5. Изследване на серуми от пациенти с инфертилитет за реакция със сперматозоиди чрез имунофлуоресценция	82
4.6. Изследване на отделянето на свободни кислородни радикали от неутрофили от пациенти с плеврален излив	84
5. Обсъждане	85
6. Изводи и приноси	103
7. Библиография на използваната литература	105

Списък на използваните съкращения

ACD	алфа-кристалинов домен
ASA	anti-sperm antibodies (антиспермални антитела)
AUC	Area Under the Curve – площ под кривата
BSA	bovine serum albumin (говежди серумен албумин)
EPF	early pregnancy factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (ензимно-свързан имуносорбентен метод)
ESC	ембрионални стволови клетки
DAB	3,3'-diaminobenzidine (3,3'- диаминобензидин)
DMPK	Dystrophia myotonica protein kinase
F-актин	фибриларен актин
FITC	флуоресцеин-изотиоцианат
FSH	follicle-stimulating hormone (фоликуло-стимулиращ хормон)
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa, G-бендинг след трипсинизиране
Hsc	heat shock cognate (конститутивно експресиращ се стресов протеин)
Hsp	heat shock protein (стресов протеин)
ICSI	intra-cytoplasmic sperm injection (интрацитоплазмено спермално инжектиране)
Ig	имуноглобулин
IL	interleukin (интерлевкин)
IVF	in vitro fertilization (оплождане ин витро)
MHC	major histocompatibility complex (главен комплекс за тъканна съвместимост)
OD	optical density (оптична плътност)
ODF	outer dense fibers – външни плътни нишки
OPD	orthophenylene diamine (ортофенилен-диамин)
PCOS	polycystic ovary syndrome (синдром на поликистозните яйчници)
PBS	phosphate-buffered saline (физиологичен разтвор, буфериран с фосфат)
pHsp	фосфорилиран Heat shock protein

PMN	полиморфонуклеарен неутрофил
POI	premature ovarian insufficiency, преждевременна яйчникова недостатъчност
PVC	polyvinyl chloride (поливинил хлорид)
ROS	reactive oxygen species (свободни кислородни радикали)
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	standart deviation (стандартно отклонение)
sHsp	small heat shock protein (нискомолекулен стресов протеин)
SIT	sperm immobilization test (спермоимобилизационен тест на Изожима)
SIV	sperm immobilization value (спермоимобилизационно ниво)
TAT	tray agglutination test (микроспермоаглутинационен тест на Фриберг)
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
АТФ	аденозинтрифосфат
БАН	Българска Академия на науките
г.с.	гестационна седмица
ИБИР	Институт по биология и имунология на размножаването
КТБ	кръвно-тестисна бариера
Кат. №	каталожен номер
МУ	Медицински университет
Об.	Оборот
СЗО	Световна здравна организация
СОА	сперматозоидо-обличащи антигени

Въведение

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

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

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

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

Възниква въпросът дали при неизяснено безплодие се образуват антитела срещу стресови белтъци и как са свързани с антителата срещу сперматозоидни антигени – има ли обща етиология, корелация и евентуално припокриване на антигенни детерминанти, или двата имунологични процеса протичат успоредно и независимо, без да си взаимодействат.

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

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

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

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

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

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1. Стресови протеини

Стресовите протеини са известни още като протеини на топлинния шок (heat shock proteins) и се изписват съкратено Hsp (от heat shock protein). Като стресови отначало са били определяни белтъци, кодирани от гени, които се индуцират от температурен стрес (Lindquist and Craig, 1988). За първи път италианския генетик Ritossa през 1962 г. съобщава, че след въздействие с висока температура и с 2,4-динитрофенол върху клетки от слюнчени жлези на плодовата мушица *Drosophila melanogaster* се наблюдават необичайни пуфи в гигантските хромозоми. Образуването на пуфите се дължи на транскрипция на гени в резултат на топлинния стрес. По-късно синтезираните при този процес белтъци са наречени Heat Shock Proteins (Hsp), или ”протеини на топлинния шок” (Tissières et al., 1974), а гените им – Hsp гени (гени на топлинния шок). Възприетият впоследствие термин „стресови белтъци” отразява факта, че експресията им се предизвиква не само от топлинен шок, а и от оксидативен стрес и други стресови фактори (Szyller and Bil-Lula, 2021).

Към семейството на Hsp спадат не само стресови белтъци, но и белтъци с конститутивна експресия (Kampinga et al., 2009). Концентрацията на последните в клетките обичайно е ниска, но нараства при стрес, например при повишаване на температурата (Neuer et al. 2000). Поради това някои автори въвеждат термина Hsc (Heat shock cognate), за да означат постоянно експресиращите се стресови протеини (Neuer, 2000). Все още обаче Hsp се използва широко и за двата вида белтъци.

Стресовите белтъци с конститутивен синтез имат особено важна роля в редица физиологични процеси в живите клетки като: посттранслационно нагъване на новосинтезираните белтъци и формиране на третичната им структура, транспортиране на белтъците през ендоплазмената мрежа и комплекса на Голджи, сглобяване на полипептиди в надмолекулни комплекси, белтъчна секреция и деградация, апоптоза, както и в регулацията на растежа и диференциацията на клетките (Jakob et al., 1993; Andley et al., 2011; Shashidharamurthy et al., 2005; Glover and Lindquist, 1998)

Hsp с индуцируем синтез се експресират в отговор на различни стресови фактори: висока и ниска температура, свободни кислородни радикали (ROS), вирусни и бактериални инфекции, соли на тежки метали, етанол, радиация, циркулаторен и исхемичен шок. Функцията им е да се справят с последствията от стреса, като ренатурират денатурирани белтъци (Ellis 1987; Hu et al. 2022).

Умерен стрес върху клетките, достатъчен да индуцира експресията на Hsps, води до предпазване им от увреждания при последващи въздействия на стресови фактори. Тази способност на клетката или организма да реагират на стрес след предишно нелетално излагане на стресов фактор се нарича „стресова толерантност” (Kregel, 2002; Shashidharamurthy et al., 2005).

1.1.2. Класификация и кратка характеристика на Hsps

Първата класификация на Hsps ги групира в семейства въз основа на молекулната им маса – означават се с Hsp и число, отговарящо на масата им в килодалтони (от 7 до 110 kDa) (Tavaria et al., 1996). По-късно класификацията на Hsps се разраства и модифицира на базата на детайлната им първична и пространствена структура, включваща домени и мотиви със специфична роля. Днес протеините на топлинния шок се подразделят съгласно генетичните обозначения, приети от HUGO Gene Nomenclature Committee и Entrez Gene and Ensemble (Wheeler et al, 2008; MacPhee, 2017). При бозайниците се различават следните семейства: HspA (Hsp70), HspB (нискомолекулни – small Hsps) HspC (Hsp90), HspH (Hsp110), DNAJ (Hsp40) и семейството на човешките шаперонини (Hsp60 и CCT) (Kampinga et al., 2009; MacPhee, 2017).

HspA (Hsp70) са първите открити стресови протеини. Наблюдаваните от Ritossa в отговор на топлинен стрес пуфи в гигантските хромозоми на плодовата мушица са в резултат от активиране на гените на Hsp70. Те са най-консервативната група Hsps (Hunt and Morimoto, 1985). Откриват се в цитозола и в ядрото. Те са с конститутивен синтез и имат основно шаперонова и цитопротективна функция. (Christians et al., 2003). При стресови фактори като повишена температура и химични въздействия (тежки метали)

концентрацията на HspsA (Hsps70) в клетките нараства значително. Доказана е защитната им функция при сперматогенезата (Запрянова, 2017).

DNAJ (Hsp40) – най-многобройно семейство стресови протеини, се характеризира с консервативен J-домен. Експресират се в огромен брой организми – от бактериите до човека (Qiu et al., 2006; Caplan et al., 1993). Функцията им се изразява в предпаване на белтъците с нарушена структура от агрегация, като чрез J домена си се свързват с разгънатите участъци от полипептидната верига. Hsp40 (DNAJ) спомагат за привличането на Hsp70 молекули в специфични клетъчни компартменти (Christians et al., 2003).

HspD (Hsp60, GroEL) и HspE (Hsp10, GroES) са т.нар. шаперонини, които функционират във вид на пръстенни комплекси от по 7-9 субединици. Основната им локализация е в митохондриите, но се откриват и в други компартменти, включително по клетъчната повърхност (Soltys and Gupta, 1997). Hsp60 участва в нагъването на полипептидни вериги, както и в техния транспорт от цитозола към митохондриалния матрикс.

HspC (Hsp 90) се експресират в големи количества в про- и еукариотни клетки в отговор на топлинен стрес и на дехидратация, които водят до денатурация на белтъците (Prodromu, 2000). Имат основно шаперонова функция, но участват и в други процеси (Christians et al., 2003; Pratt et al., 2006; Grad et al., 2007).

HspH (Hsp110) са хомоложни на HspA и подпомагат нуклеотидния им обмен. Откриват се в цитозола, а един от членовете е в ендоплазмения ретикулум (Dragovic et al., 2006; Raviol et al., 2006). Свързани с определени туморни антигени като gp100, те стават силно имуногенни, индуцират производство на гама интерферон и активират T-клетъчния имуноен отговор, поради което са обект на проучвания за създаване на противотуморна ваксина (Wang et al., 2003).

HspB (small Hsp, sHsp – нискомолекулни стресови белтъци) – ще бъдат подробно разгледани по-долу.

1.1.3. Нискомолекулни стресови протеини (sHsp, HspB) – класификация

Според Kampinga et al. (2009), семейството на нискомолекулните стресови белтъци (sHsp от small Hsp, или HspB) се състои от следните 11 белтъка: HspB1, HspB2, HspB3, HspB4, HspB5, HspB6, HspB7, HspB8, HspB9, HspB10, HspB11. Преди въвеждането на новата номенклатура, за всички тях са използвани различни други имена, които са дадени по-долу, тъй като все още се използват от производители на пречистени белтъци и антитела срещу тях, както и от някои автори. Разделят се в два класа. Клас I включва: HspB1 (Hsp27), HspB5 (alphaB-crystalline), HspB6 (Hsp20), а клас II: HspB2 (МКВР), HspB3, HspB4 (alpha-A crystalline), HspB6, HspB7, HspB9, HspB10 (Таблица 1).

Таблица 1. Стари и нови имена на стресовите протеини и кратки данни за тяхната функция и разпространение (По Bakthisaran et al., 2015).

Име и клас на протеина	Стари наименования	Молекулярна маса (kDa)	Разпространение	Функции
HSPB1 клас I	CMT2F, HMN2B, HSP27, HSP28, HSP25, HS.76067, DKFZp586P1322	22,8	Сърдечна, гладка и напречно набраздена мускулатура	Шаперонова активност, стабилизира цитоскелета, антиапоптозна, антиоксидативна
HSPB2 клас II	МКВР, HSP27, Hs.798846, LOH11CR1K, MGC133245	20,2	Сърце, скелетна и гладка мускулатура	Шаперонова за DMPK и увеличава киназната му активност, интегритет на миофибрилите, митохондриално-енергетична, антиапоптозна
HSPB3 клас II	HSP27	17,0	Сърце, главен мозък, скелетна и гладка мускулатура	Прицелна протеин-зависима шаперонова активност, поддържа активността на миофибрилите
HSPB4 клас II	crystallin alpha A, CRYAA, CRYA1	19,9	Очна леща, скелетна мускулатура, черен дроб, мастна тъкан (малко количество)	Шаперонова активност, геномна стабилност, индекс на пречупване на очна леща

HSPB5 клас I	crystallin alpha B, CRYAB, CRYA2	20,2	Повсеместна, в очна леща. Големи количества в сърцето и мускулите	Шаперонова, стабилизира цитоскелета и нуклеоскелета, клетъчен цикъл, кардиопротективна, индекс на пречупване на очна леща, регулира мускулната диференциация, антиапоптозна
HSPB6 клас I	HSP20, FLJ32389	16,8	Повсеместна, в мускулите	Релаксира гладката мускулатура, кардиопротективна, шаперонова активност, антиапоптозна
HSPB7 клас II	CvHSP (Cardiovas- cular HSP), FLJ32733, DKFZp779D0968	18,6	Сърце, скелетна мускулатура, мастна тъкан (малко количество)	Шаперонова активност, поддържа активността на миофибрилите
HSPB8 клас I	H11, HMN2, CMT2L, DHMN2, E2IG1, HMN2A, HSP22	21,6	Повсеместна	Шаперонова, индуцира автофагия
HSPB9 клас II	FLJ27437C12992 9	17,5	Тестис	Антиген, специфичен за тестиса, туморен антиген
HSPB10 клас II	ODF1, ODF, RT7, ODFP, SODF, ODFPG, ODF27, ODFPGA, ODFPGB, MG, MGC129928	28,3	Тестис	Изгражда външните плътни нишки на сперматозоидната опашка

Броят на sHsp гените в еукариотния геном се движи в широки граници: 2 при дрожди, 12 при *Drosophila melanogaster* (Michaud et al., 2002), 16 при *Caenorhabditis elegans* (Candido, 2002), 19 при *Arabidopsis thaliana* (Scharf et al., 2001). Човекът има 9 гена, отнасящи се към sHsps (Karré et al., 2001), наречени HspB1–HspB9, съобразно HUGO Gene Nomenclature Committee (Wain et al., 2002). Karré et al. (2003), базирайки се на публикуваните данни на Celera Discovery System (CDS) и National Center for Biotechnology Information (NCBI) public database, разглеждат 10 sHsps. Те включват и “outer dense fiber protein 1” (ODF1) (Gastmann et al., 1993), който дотогава не е бил причисляван към семейството на sHsp. Според анализа на данните от човешкия геном,

вероятно няма други членове на нискомолекулулните стресови протеини, защото няма повече от 10 активни гена за тях (Karré et al., 2003). Десетте гена са локализиранни в следните човешки хромозоми (дадени са номерът на хромозомата, рамото, ивицата и областта):

HspB1 (Hsp27)	- 7p12.3 и Xp11.23
HspB2 (МКВР)	- 11q22-q23
HspB3	- 5q13-9q21
HspB4 (α A crystallin)	- 1q22.23
HspB5 (α B crystallin)	- 11q22.23-q23.1
HspB6 (Hsp20)	- 19q13.13
HspB7 (cvHsp)	- 1p36.2-p34.3
HspB8 (H11, Hsp22)	- 11q22.3-q23.1
HspB9	- 17q21.2
HspB10 (ODF1)	- 8q22

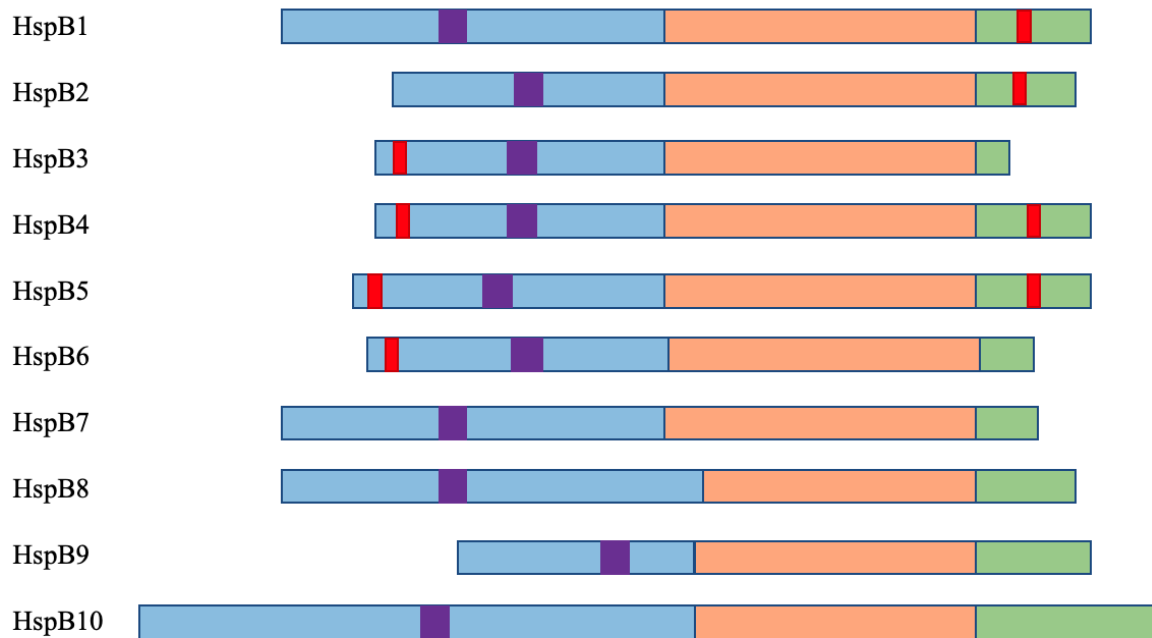
Човешките sHsp се различават помежду си по свойства и локализация, макар че повечето от тях са свързани с мускулните клетки. Някои от тях се откриват само в напречноабраздена и сърдечна мускулатура, а други се експресират и в други тъкани.

1.1.4. Структура на нискомолекулулните стресови протеини

Членовете на протеиновото семейство HspB имат гъвкава триизмерна структура. Те се срещат като хомомерни или хетеромерни комплекси, включващи от 2 до 40 субединици. Тези глобуларни комплекси са много динамични, могат да обменят субединици и така да променят структурата и активността си (Haslbeck and Vierling, 2015).

Субединиците на този клас белтъци са с молекулна маса между 12 и 43 kDa. Характеризират се с консервативна последователност от 80-100 аминокиселинни остатъка, която образува свойствения за това семейство алфа-кристалинов домен – α -crystallin domain (ACD). Той е заграден от не

толкова силно консервативни последователности (Karré G. et al., 2003; Haslbeck et al., 2005; Kriehuber et al., 2010; Cristofani et al., 2021) (**Фигура 1**).



Фигура 1. Структура на човешките sHsp (HspB1-B10). Синьо – N-терминален домен, оранжево – алфа-кристалинов домен, зелено – C-терминален домен. Червено – консервативен I/V-X-I/V мотив, лилаво – RLFDQxFG консервативна последователност. (опростено по Cristofani 2021).

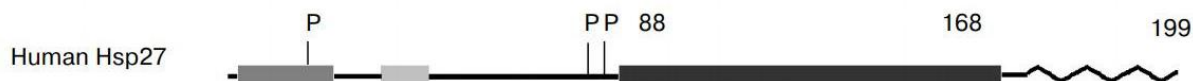
Алфа-кристалиновият домен се състои от два β -листа, разположени антипаралелно във вид на β -сандвич. Домените от два мономера се свързват и образуват димерните градивни блокове на sHsp олигомерите. N-терминалната област е с вариабилна първична структура, която формира алфа-спирални компоненти (van Montfort et al., 2001; Karré et al., 2003). В C-края на полипептидната верига има вариабилна опашка, която може свободно да се огъва (Carver, 1999).

Вторият, по-малко консервативен регион на всички sHsp е доменът WDPF в N-края. Той съдържа консервативната последователност триптофан-аспартат-пролин-фенилаланин. WDPF доменът подлежи на фосфорилиране и този процес е тясно свързан с олигомеризацията на Hsp27 (Chiu et al. 2019).

1.1.6. Hsp27

1.1.6.1. Структура и функции

При бозайниците Hsp27 е с молекулна маса 22.8 kDa. Подобно на другите sHsp, той е изграден от консервативен алфа-кристалинов домен, ограден от по-слабо консервативните N-терминален домен и гъвкава вариабилна C-терминална опашка. (Фигура 2)



Фигура 2. Структура на Hsp27 с посочени места за фосфорилиране. Тъмносиво – N-терминален WDPF домен (сравнително неконсервативен), светлосиво – консервативна N-терминална последователност, черно – алфа-кристалинов домен, зигзаг – C-терминална опашка, P – места за фосфорилиране (опростено по Gusev et al., 2002).

Фосфорилирането на Hsp27 влияе върху олигомерната структура и шапероновата функция и модулира действието му в процеси като апоптоза и клетъчна диференциация. При човека под влияние на стресови фактори Hsp27 се фосфорилира при серин (S) на следните места: S15, S78, и S82 (Landry et al., 1992; Kostenko and Moens, 2009). Фосфорилирането на S19 е свързано с възрастта, на S45 се засилва по време на клетъчното делене, а S59-фосфорилирането е свързано със стресови условия (Bakthisaran et al., 2015). Фосфорилирането на серина повлиява функционирането на sHsp при бозайниците, както като шаперони за възстановяване на пространствената структура на белтъците, така и при други процеси в клетката (Gaestel, 2002; Kato et al, 2002). sHsp имат важна роля и при цитоскелетното ремоделиране (Wieske et al, 2001; Quinlan, 2002), при апоптозата на клетките и др. (Charette and Landry, 2000; Arrigo et al., 2002b).

Hsp27 притежава структурни елементи, които позволяват свързването му с белтъци, склонни да образуват агрегати. Разпознаването и свързването на “субстрата” (променящия се белтък) се модулира от различни въздействия – температура и фосфорилиране. Фосфорилирането е една от най-важните пост-

транслационни модификации на sHsp и е ключово за регулацията на структурата и функцията им. Това е едно от първите събития, индуцирани от стресови фактори (топлинен шок, оксидативен стрес, цитокини и др). Взаимодействието с белтъчния субстрат се регулира чрез обмен на субединици, което води до образуване на приспособена за свързване конформация (Koteiche and Mchaourab, 2003; Giese et al., 2002; Koteiche et al., 1998; Vova et al., 1998; Mchaourab et al., 2002). При преустановяване на действието на стресовия фактор субстратът се освобождава от sHsp, вероятно с участието на АТФ-зависими стресови протеини като Hsp70/Hsp40 (Sun et al., 2005; Lee et al., 1997; Lee and Vierling, 2000). Като свързват белтъци с нарушена структура и ги предпазват от необратима агрегация, sHsp действат като буферна система за поддържане на белтъчната хомеостаза.

Шапероновата функция на Hsp27 осигурява протекция на клетъчните белтъци срещу различни стресови фактори (Latchman, 2002; Arrigo et al., 2002a,b). Hsp27 е АТФ-независим шаперон (Garrido, 2002) и образува олигомери с уникална структура, които са с доказана шаперонова активност. (Bakthisaran et al., 2015; Haslbeck et al. 2018).

В условия *in vitro* е доказано, че Hsp27 предпазва разгънатите в резултат на стресово въздействие клетъчни белтъци (наричани „субстрати“ на Hsp) от необратима агрегация. Hsp27 съвместно с АТФ-зависими шаперони като Hsp70 възстановяват пространствената структура на субстратите (Haslbeck and Buchner, 2002). Малките sHsp не могат сами да осъществят ренатурацията, тъй като не притежават АТФ-азна активност (Carra et al., 2017).

Hsp27 взаимодейства с различни молекули от апоптозните пътища и може да блокира апоптозата на различни нива. Тази му способност зависи от състоянието на олигомеризация и фосфорилиране, които настъпват в зависимост от състоянието и нуждите на клетката. Така например модификации на Hsp27 с метилглиоксал засилват антиапоптозното му действие (Oya-Ito et al., 2006), а фосфорилираната му форма в малки олигомери може да се свързва с F-актина и предпазва от невротоксични

фактори. Мишият Hsp25 предотвратява агрегацията на денатуриран актин (Panassenko et al., 2003).

Връзката на Hsp27 с функциите на актина е причина за интензивната му експресия във всички типове мускулни и разнообразни немускулни тъкани, като допринася за устойчивостта на клетките към стрес и ги предпазва от апоптоза (Singh et al., 2017). Експресията на Hsp27 е най-интензивна в миоцитите на сърцето, където е доказан за пръв път (Taylor and Benjamin, 2005) в и напречноабраздената скелетна мускулатура. (Bakthisaran, 2015). Присъствието му е силно изразено и в гладката мускулатура, където заедно с α B-кристалин и Hsp20 функционира като модулатор на контракциите, клетъчната миграция и преживяемост (Salinthonne et al. 2008). В условия на стрес се наблюдава повишаване на експресията на Hsp27 и транслокацията му към цитоскелета (Taylor and Benjamin, 2005). Hsp27 играе роля в полимеризацията на актина и образуването и ремоделирането на напречни мостчета в гладките мускули (Mounier and Arrigo, 2002).

Някои от функциите на Hsp27 са свързани с експресията му в специфични клетки и тъкани.

1.1.6.3. Експресия на Hsp27 в репродуктивни тъкани на бозайници

Поради ролята си да предават генетичната информация в следващото поколение мъжките и женските гамети са предпазени чрез редица сложни механизми от увреждащи влияния, а в случаите, когато настъпи увреждане, се инициира програмирана клетъчна смърт – апоптоза. Тъй като Hsp участват както в протективните механизми, така и в програмираната клетъчна смърт, тяхната експресия е необходима при гаметогенезата.

Мъжката репродуктивна система при бозайниците е изключително чувствителна на хипертермия и други стресови фактори, които могат да доведат до двойноверижни скъсвания на ДНК в сперматогенните клетки (Aitken and Lewis, 2023) и да предизвикат масивна апоптоза (Paul et al., 2009; Shahat et al., 2020). Ето защо не са изненадващи и по-специфични изисквания за Hsp в тестиса, тъй като това е единственият орган, намиращ се извън тялото

с цел поддържане на по-ниска температура. Добре известно е, че всяко, дори минимално повишаване на температурата, нарушава сперматогенезата. По-слабо проучено е въздействието на топлинния стрес върху зрели сперматозоиди. Според Hendricks and Hansen (2009) излагане на еякулатни говежди и конски сперматозоиди на температура до 41°C за 4-24 часа не предизвиква нито ДНК-фрагментация, нито апоптоза. Други автори обаче наблюдават ДНК-фрагментация и белези на апоптоза при еякулатни сперматозоиди от човек (Mann et al., 2002) и други бозайници (Doty et al., 2007), подложени на температури в обхвата 40-45°C.

Смята се, че антиапоптотичната активност на Hsp27 в тестисите предлага известна степен на защита срещу вредното влияние на стреса и стареенето (Purandhar et al. 2014). Този ефект вероятно е причинен от понижаване на регулацията на апоптотичните фактори в цитоплазмата на Сертолиевите клетки, сперматогониите и зреещите сперматозоиди. В зависимост от конкретната си модификация, Hsp27 потиска апоптозата в клетките, като понижава активността на каспаза 3 чрез свързване на каспаза 9. (Wang et al. 2023). Hsp27 се свързва с освободения от митохондриите цитохром С и предотвратява цитохром-С-медирано взаимодействие на Araf-1 с прокаспаза-9 и образуването на апоптозома (Zeng et al., 2013).

Основните фактори на апоптозата, като каспаза 9 и активиращ фактор-1 (Araf-1), са необходими за успешното узряване на сперматозоидите. Нокаутираните мъжки мишки са безплодни, с намален брой сперматогонии и силно ограничена скорост на съзряване (Honarpour et al. 2000).

Hsp27 е локализиран в Сертолиевите клетки на миши тестис, сперматогонии, сперматоцити и сперматиди, като експресията му се усилва при топлинен шок (Biggiogera et al., 1996; Martinova et al., 2009). Adly et al. (2008) изследват стадийно- и клетъчно-специфичната експресия на Hsp27 по време на сперматогенезата при човек. Те наблюдават в нормален тестис силна експресия на белтъка в Сертолиевите, Лайдигови клетки и сперматогонии и постепенното ѝ отслабване в сперматоцити и сперматиди до пълна липса в сперматозоидите. При дефекти на зреещото откриват силна експресия само в

Сертолиевите клетки, слаба в сперматогонии и сперматоцити и липса в Лайдигови клетки и сперматиди. При синдром с наличие само на Сертолиеве клетки в тях се наблюдава силна експресия, а Лайдиговите клетки са отрицателни. Намалената експресия на белтъка вероятно е свързана с развитието на инфертилитета. Двата тестис-специфични нискомолекулни стресови белтъка – HspB9 и HspB10, се откриват в сперматогенните клетки: HspB9 – в сперматогонии, сперматоцити и кръгли сперматиди, а HspB10 (ODF1) – в удължени сперматиди и сперматозоиди (Xun et al., 2015).

Женската репродуктивна система също е чувствителна на хипертермия и други стресови фактори. Hsp се експресират по време на овогенезата при редица животни: насекоми (Zimmerman et al., 1983; Ambrosio and Schedl, 1984), риби и земноводни (Heikkila et al., 1985) и бозайници (Heikkila et al., 1986).

Консервативната експресия на Hsp у еволюционно дивергирани организми показва фундаменталната роля на тези белтъци за герминативните клетки. При миши овоцити способността за синтез на индуцируеми Hsp и топлинно-шоковият отговор са максимални по време на растежа на овоцита и намаляват с достигане на крайните му размери (Curci et al., 1987, 1991). Това обяснява атипичната морфология при овоцити, изложени на топлинен стрес, и е интересно с оглед на факта, че овоцитите на бозайниците са силно чувствителни към хипертермия (Baumgartner and Chrisman, 1981). За отбелязване е обаче, че Hsp25 (Hsp27) се експресира през цялото овоцитно зреене, присъства в зрелия овоцит и количеството му нараства при топлинен шок (Kim et al., 2001). Cai et al. (2013) установяват, че свръхекспресия на Hsp27 понижава скоростта на узряване на овоцити, получени от жени с PCOS.

1.1.6.4. Извънклетъчна експресия на Hsp27

Въпреки, че Hsp27 традиционно се смята за вътреклетъчен протеин, той се открива и в междуклетъчното пространство. Обсъждат се три възможни начина на излизане от клетката – ендолизозомен път, екзозомен път и директен транспорт (Batulan et al., 2016). Hsp27 в значителни количества е открит в екзозоми, изолирани от пациентки с рак на яйчниците, а при пациентки с рак

на ендометриума и ендометриоза е регистрирано повишение на неговото количество (Wyciszkiewicz et al. 2019).

1.1.6.5. Hsp и ембрионално развитие

Повечето стресови гени се активират непосредствено след възобновяване на транскрипцията, като за някои още преди това в зиготата са присъствали наследени от овоцита транскрипти. Експресията на Hsp по време на предимплантационния период е логична, доколкото предимплантационният ембрион се нуждае от определени стресови протеини за развитието си (Witkin and Linhares, 2009). В модел миши ембриони, първо се наблюдава спонтанна конститутивна експресия на Hsc70, още в самото начало на зиготната геномна активност и ранния етап на 2 клетки. Конститутивната форма Hsc70 е доминиращият стресов протеин, експресиран до стадий бластоцист (Morange et al., 1984). Освен това Hsp25 и Hsp90 нормално се експресират в значително повишени нива в предимплантационни ембриони, като Hsp25 (Hsp27) е важен за ранното ембрионално развитие (Kim et al., 2002). Значението на стресовите белтъци за ембриогенезата се потвърждава от опити, при които третирането с моноклонални антитела срещу Hsp блокира ин витро развитието на ембриони от мишки и морски свинчета (Witkin and Linhares, 2009). При намалена експресия на Hsp27 в овчи ембриони се наблюдава увеличена честота на програмирана клетъчна смърт (Choi et al., 2007).

След имплантацията на бластоциста експресията на Hsp е различна в различните клетки и тъкани (Loones et al., 1997). Установено е, че експресията на алфа-кристалините в различните органи на гръбначните животни, включително човека, се индуцира в определени стадии на диференциация (Трифенова and Bours, 2000). За последващите етапи от феталното развитие има по-подробни данни относно експресията на различни видове стресови белтъци в тъкани и органи на плода (Leonardi et al., 2004; Brown et al., 2007; Jantschitsch et al., 1998).

Hsp27 се смята за важен маркер за предстояща диференциация на клетки, тъй като неговата индукция се осъществява рано по време на диференциацията

и се съпътства със спад в клетъчната пролиферация (Mehlen et al., 1997; Shakoory et al., 1992; Spector et al., 1993; Spector et al., 1994; Garrido et al., 1997).

Точната роля на Hsp в човешкото ембрионално развитие не е напълно изучена. Поради технически трудности и етични съображения при човека, повечето проучвания са от стадий зигота до формиран трофобласт. Все още няма достатъчно информация на експресията и ролята на Hsp27 в по-напреднали стадии на ембрионално развитие и органогенеза. За разлика от нормалните клетки, в клетки и тъкани от редица видове тумори са установени необикновено високи нива на Hsp27, което отново се свързва с антиапоптозните му функции. Освен това Hsp27 е от жизненоважно значение в специфични етапи от онтогенезата, свързани с пролиферация, диференциация и смърт на клетките (Leonardi, 2004).

Hsp27, заедно с Hsp60, 70 и 90 са установени в децидуални стромални клетки през всеки триместър на бременността, като експресия на Hsp27 е наблюдавана основно в цитоплазмата и не е променяла интензитета си по време на различните триместри (Shah et al., 1998).

Наблюдавана е различна експресия на Hsps във фалопиевите тръби на жени със и без ектопична бременност (Neuer et al., 2000). В цилиите на тубарния епител Бътева-Христова (2014) наблюдава положителна реакция за фосфорилиран Hsp27 при нормална бременност и негативна реакция при тубарна бременност. Допуска се, че понижената експресия на sHsp нарушава транспорта на ембриона към матката и води до ектопичната му имплантация.

1.1.6.6. Експресия на Hsp27 в стволови клетки

В ембрионалните стволови клетки (ESC) е регистрирана експресия на Hsp70 (HspA4), Hsp27 (HspB1) и Hsp90 β (HspCb). Тези данни показват, че високите нива на експресия на шаперони и ко-шаперони в ESCs могат да упражнят буферен ефект срещу външни и вътрешни стресови фактори, като по този начин поддържат способността им да се възпроизвеждат (Fan, 2012).

Свърхекспресия на Hsp27 е установена в миши ембрионални стволови клетки, което корелира с резистентността им към токсичността на кадмиев

хлорид, живачен хлорид, цис-платинов (II)-диамин дихлорид и натриев арсенит, както и в Hsp27-трансфектирани хипокампадни прогениторни клетки срещу предизвикана от глюкокортикоиди апоптотична клетъчна смърт (Wu, W., and M. Welsh. 1996; Son et al. 2005).

Антиапоптотичната активност на Hsp27 го прави важен за оцеляването на мезенхимни стволови клетки от мастна тъкан. (Suryawan et al. 2024).

1.1.7. Роля на Hsp при имунологично обусловено безплодие

Оплождането, имплантацията и ембрионалното развитие се отличават с интензивно клетъчно делене, диференциация и реорганизация – процеси, при които е доказана ролята на нискомолекулните стресови протеини. По-задълбочени изследвания на участието им в тези процеси биха били полезни при уточняване на етиологията и лечението на безплодието.

Съществуват данни, според които някои Hsp могат да доведат до автоимунитет. Определени Hsp 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 (Neuer et al., 1997; Witkin, 1997). Това означава, че тези микроорганизми се разпознават от имунната система чрез представяне най-вече на Hsp епитопи, срещу които се индуцира имунен отговор. Тъй като Hsp са филогенетично консервативни, то антигелата срещу тях биха могли да реагират кръстосано с нормално експресиращите се в собствените тъкани Hsp със сходни или еднакви епитопи, както и с някои органоспецифични антигени и това да доведе до отключване на автоимунен процес (Lamb et al., 1989; Jones et al., 1993). По правило автоимунитет срещу Hsp не е присъщ на здрави жени в репродуктивна възраст. След продължително излагане на имунната система на микробен Hsp60 (например инфекция с *Chlamydia trachomatis*) обаче се появяват автоантигелата срещу него (Witkin, 1999). Така този стресов белтък осъществява връзка между инфекциозните и автоимунните заболявания, доколкото много безплодни двойки след прекарани инфекциозни заболявания може да са сенсibiliзирани

към негови епитопи и да произвеждат съответни автоантитела. Хламидиалният Hsp10 е хомолог на човешкия EPF (early pregnancy factor) и антитела срещу EPF, индуцирани при хламидиални инфекции, са доказани при пациентки с безплодие (Betsou et al., 2003).

При асистираната репродукция се извършват редица манипулации, които са стресови за ембрионите – преместване, оксидативен стрес, вариация в температурата и напълно променена заобикаляща клетъчна среда. По всяка вероятност стресовите условия в *in vitro* култура усилват експресията на Hsp в ембрионите. Christians et al. (1995) установяват силно повишена експресия на Hsp70 в култивирани миши ембриони. Индуцираната 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 или имунен отговор срещу Hsp могат да доведат до фатални последици за развиващия се ембрион.

Инфекцията с *C. trachomatis* при жените е една от най-честите причини за безплодие. Освен до запушване на фалопиевите тръби, инфекцията води и до наличие на персистиращи антихламидиални антитела, реагиращи кръстосано със собствени Hsp, което може да води до негативни последствия и след оплождането, нарушения в имплантацията и протичането на ранната бременност (Witkin et al., 1997; Димитрова и сътр., 2001).

Поради интензивното проследяване на пациентките, подложени на IVF, те са идеални за изучаване на ефектите от предшестващо сенсibiliзиране към стресови белтъци върху предимплантационното развитие на ембриона и имплантацията. Пациентки, подложени на IVF, които не съобщават за хламидиална инфекция, но са позитивни за цервикални антихламидиални IgA антитела, са с по-ниска честота на забременяване в сравнение с жени, отрицателни за тези антитела (Neuer et al., 1997). Има данни, че способността на човешкия Hsp60 да предизвиква лимфоцитна пролиферация (клетъчен имунитет) корелира с анамнеза за инфертилитет и ранни спонтанни аборти.

Според авторите автоимунни реакции срещу Hsp60 вероятно повишават риска от ранна загуба на бременността (Kligman et al., 1998).

Обобщените резултати от тези проучвания показват, че предхождаща инфекция с *Chlamydia trachomatis* и последваща имунна сенсibiliзация към епитопи на хламидиалните стресови протеини се свързва с лоша репродуктивна прогноза и по-лош резултат от ин витро оплождането.

Доказана е ролята на антитела срещу Hsp10 и Hsp60, възникнали в резултат на хламидиална инфекция, в етиологията на тубарния стерилитет и настъпването на тубарната бременност (Lyons et al., 2006). Sziller (1998) проучва антитела срещу различни епитопи на *Chlamydia trachomatis* при пациентки с тубарна бременност и установява, че предишна или хронична инфекция с *Chlamydia trachomatis* предразполага към възникване на свързана с Hsp60 тубарна патология. Макар че това не е единствена причина за възникване на тубарна бременност, циркулиращи антитела срещу hsp60 (вкл. срещу собствени белтъци) се свързват с фагоцити, Т-лимфоцити и децидуални клетки (Mincheva-Nilsson et al., 1994) с всички последствия, произтичащи от тези взаимодействия.

Засега няма данни за роля на нискомолекулните стресови протеини при хламидийни и други бактериални инфекции, макар че гени за членове на семейството присъстват в много бактериални геноми (Obuchowski et al., 2021). Buteva-Hristova et al. (2009) при изследване на жени с репродуктивни проблеми (безплодие с неизяснени причини, аборти и неуспешно IVF), установяват повишени нива на серумни антитела срещу нискомолекулните стресови белтъци алфа-кристалини. Доколкото ни е известно обаче, на този етап няма публикувани данни за антитела срещу Hsp27 при инфертилитет.

Независимо от големия интерес към нискомолекулните стресови протеини, тяхната експресия и роля в репродуктивните процеси е все още недостатъчно изяснена. Необходими са проучвания, които да проследят участието на нискомолекулните стресови протеини в различни етапи от ембрионалното развитие при бозайниците и човека, както и ролята на имунния отговор срещу тях за безплодието. Ако такава роля бъде установена, логично

възниква въпросът дали има причинна връзка или най-малкото корелация между антителата срещу стресови протеини и много по-добре изучените спермоантитела при пациенти с инфертилитет.

1.2. Безплодие при човека

1.2.1. Причини за безплодие при човека

Световната здравна организация определя безплодието (стерилитета) като заболяване, което включва неспособност да се постигне клинична бременност след 12 месеца или повече, при редовен сексуален контакт без използване на контрацептиви. Безплодието се смята за едно от най-честите хронични здравни нарушения, независимо от възрастта (Rowe et. al, 1993).

Стерилитетът при жените може да се дължи на заболявания или дисфункции на репродуктивната, невроендокринната или имунната система – липса на овулация поради преждевременна яйчникова недостатъчност (POI); синдром на поликистозните яйчници – PCOS. Други чести причини за безплодие са тубарна непроходимост; ендометриоза, цервикални фактори, синдром на Asherman, инфекция с *Chlamydia trachomatis*, и идиопатично, обикновено квалифицирано като т.нар “необяснено безплодие”. Повечето пациентки с безплодие поради тубарна непроходимост са били изложени на хронична хламидиална инфекция (Spandorfer, 1999). Хламидиите са свързани и с други аспекти на безплодието, които ще бъдат разгледани по-долу.

Безплодието при мъжете може да има различна етиопатогенеза. Най-честите причини са патологичните отклонения в сперматогенезата – астенозооспермия (намалено количество подвижни сперматозоиди); олигозооспермия (намален брой сперматозоиди – под 20 млн на мл); тератозооспермия (неколкократно завишен брой сперматозоиди с нарушена морфология); некрозооспермия (висок дял нежизнеспособни сперматозоиди); аспермия (липса на сперматозоиди и незрели клетки, има само течност от простатната жлеза и семенните мехурчета; дължи се на запушени след инфекция или липсващи по рождение семепроводи); азооспермия (липсват сперматозоиди, но се откриват незрели предшественици.)

При около 15% от мъжете с азооспермия се установява синдром на Клайнфелтер (кариотип 47,XXY), което предполага те да бъдат насочвани за цитогенетични изследвания (Chowdhury and Chowdhury, 2009).

При мъже с идиопатична азооспермия или тежка олигозооспермия се откриват също и делеции в Yq11. Областта, засегната от тези делеции, е променлива. Те могат да бъдат големи и следователно видими под микроскоп или малки, които не се виждат под микроскоп и включват един или повече ДНК локуси по протежение на Yq11 хромозомния регион. Резултатите от 20 мащабни програми за скрининг на микроделеции са показали често заличаване на три неприпокриващи се ДНК области съответно в проксималната, средната и дисталната част на Yq11, определени по-рано като AZFa, AZFb и AZFc. Докладвани са и делеции на отделни ДНК локуси, но като възникнали *de novo* и като полиморфни мутации (Vogt, 1998).

Най-честата причина за мъжко безплодие е варикоцеле – абнормна дилатация на венозната мрежа около тестиса (plexus pampiniformis), която води до повишаване на скроталната температура. Среща се при 15% от всички мъже, 19% – 41% от мъжете с първично безплодие и 45% – 81% от мъжете с вторично безплодие (Pastuszak and Wang, 2015). Вредните последствия от варикоцеле се приписват на два факта: (1) забавеният венозен дренаж повишава температурата на тестисите, което нарушава сперматогенезата и функцията на Лайдиговите клетки; и (2) повишено вътрешно налягане на тестисите и тестикулна хипоксия поради намаляване на кръвния поток, повишени нива на свободни кислородни радикали (ROS) и образуване на спермоантитела. На клетъчно и молекулно ниво, варикоцеле повишава честотата на апоптозата в клетките на тестиса, увеличава ROS, променя функцията на Сертолиевите клетки и намалява секрецията на тестостерон от Лайдиговите клетки (Kantartzi et al., 2007; Pastuszak and Wang, 2015). Варикоцеле е пример за въздействието върху тестиса на вредни фактори като хипертермия, хипоксия, възпаление и ROS, обобщено наричано „стрес“ (Wang et al., 2022).

Sheynkin et al. (2005). сравняват температурата на скротума на мъже, седящи с работещ лаптоп в скута си, и на контролна група, чиито участници седят в същите пози, но без компютър. Оказва се, че работещият лаптоп предизвиква значително повишение на скроталната температура – 2.6°C до 2.8°C. Продължителната скротална хипертермия може да има отрицателно влияние върху сперматогенезата, особено при юноши и млади мъже.

В около 30% от безплодните двойки причината за репродуктивните неуспехи е в мъжа, в същото толкова двойки причината е в жената, а в около 25-30% от случаите причината за безплодието е едновременно у двамата партньори. Остават 10 до 15% двойки с неизяснени причини за стерилитет (Chowdhury and Chowdhury, 2009). Сходни като разпределение данни дават и Chiva et al., 2013 (Таблица 2).

Таблица 2. Приблизителен процентен дял на различните причини за човешко безплодие по Chiva et al. (2013).

Причина за безплодието	Процентен дял
Безплодие при мъжа	30 %
Безплодие при жената	30 %
Безплодие при двамата партньори	25%
Безплодие по неизяснени причини	15%
Причини за безплодие при жената	
Нарушена овулация	40%
Тубарна непроходимост или/и ендометриоза	40%
Други патологии	10 %
Неизяснени причини	10 %
Причини за безплодие при мъжа	
Нарушения на хипоталамо-хипофизната ос	1%
Първични гонадни нарушения	40%
Нарушения на транспорта на сперматозоидите	20%
Неизяснени причини	30-40 %

Безплодие, дължащо се на неизяснени фактори, се диагностицира, когато стандартните изследвания, включващи анализ на еякулата/спермата, тест за овулацията и проходимостта на фалопиевите тръби, не дават конкретни резултати или не откриват аномалии (Gleicher et al., 2006; Brazdova A., 2014).

1.2.2. Имунологично обусловено безплодие

Терминът „имунологично обусловено безплодие“ се използва, когато се наблюдават антитела, свързващи се с антигени върху гаметите и нарушаващи взаимодействието между сперматозоидите и овоцитите. При пасивно пренасяне върху гамети от друг индивид (експериментално животно или човек) тези антитела индуцират същите нарушения (Bohring and Krause, 2003).

Основна функция на имунната система е да разпознаването на „своє“ и „чуждо“. Толерантност към собствените молекули се създава по време на диференцирането на В- и Т-лимфоцитите в централните лимфоидни органи и се поддържа от регулаторни Т-лимфоцити в периферията. Механизмите за създаване и поддържане на имунна толерантност обаче не са напълно ефективни във всички случаи. Възможно е нормални за организма белтъци, наречени автоантигени, да предизвикат имунен отговор в организма, на който принадлежат. Това явление се нарича автоимунитет. Когато автоимунният процес участва в патогенезата на определено заболяване, това заболяване се определя като автоимунно. Най-често автоимунни реакции се наблюдават спрямо антигени, които дълго време са липсвали в организма или са в имунологична изолация, т.е. отделени са с бариера от имунната система. При контакт с нея впоследствие те се разпознават като чужди и срещу тях се произвеждат антитела. Сперматозоидите притежават антигени, непознати за имунната система, тъй като до пубертета те не са присъствали в организма, а след пубертета са отделени с кръвно-тестисна бариера (Narakal et al., 2022).

Когато попаднат в женския организъм, сперматозоидите внасят в него своите тъканно-специфични антигени, както и изоантигени (алоантигени). Следователно наличието на „прицелни“ автоантигени и изоантигени в сперматозоидите прави възможна продукцията на спермоантитела (ASA –

antisperm antibodies) и активирани Т-клетки както при мъжете, така и при жените. Имунологичните фактори могат да окажат влияние на всеки етап на оплодителния процес.

За по-задълбочено изясняване на молекулните механизми, свързани с авто- и изо- имунния отговор, редица съвременни изследвания засягат сперматозоидната протеомика. Те осъществяват имунологична и молекулно-биологична характеристика на сперматозоидни гликопротеини, белтъци или пептиди, които са идентифицирани чрез ASA у безплодни пациенти или чрез експериментално получени поликлонални или моноклонални антитела (Nowicka-Bauer et al., 2016).

1.2.2.1. Антиовариални антитела

Освен срещу сперматозоиди, антитела могат да се образуват и срещу яйцеклетките, макар че тези антитела са много по-редки от спермоантителата. По-голямата част от антиовариалните автоантитела са насочени срещу β -субединицата на фоликуло-стимулиращия хормон (анти-FSH). Анти-FSH могат да възникнат по естествен път, особено при обща склонност на организма към автоимунни реакции, или да бъдат индуцирани от предишно IVF. При част от пациентките, подложени на IVF процедури, се доказват анти-FSH антитела от класовете IgA, IgM и IgG. Серумните нива на IgG и IgA анти-FSH антитела, измерени в деня на извличане на яйцеклетките, заедно с възрастта и други клинични параметри, характеризиращи овариалния резерв, до голяма степен предсказват резултата от овариалната стимулация. Освен това анти-FSH IgG, IgA и ниски концентрации от IgM антитела се откриват във фоликулната течност. При безплодни пациентки, положителни за анти-FSH антитела, може да се приложи имunosупресивно лечение за повишаване на процента на успешните бременности (Haller-Kikkatalo et al., 2012).

Yeganeh et al. (2017) изследват влиянието на анти-овариални, анти-овоцитни и анти-зона пелуцида (anti-ZP) антитела при пациентки, подложени на контролирана овариална стимулация преди прилагане на ICSI. Установява се връзка между нивата на съответните антитела и броя на извлечените

яйцеклетки. Наличието на антиовариални антитела би могло да обясни част от случаите на неуспех при асистираната репродукция.

Pires et al. (2007) откриват антиовариални антитела у пациентки с преждевременна овариална недостатъчност (POI) и разработват неинвазивен тест за диагностика, така че след съответна имуномодулираща терапия да се възстанови нормалната функция на яйчниците.

Вангелов (2016) установява във фоликулната течност на жени с овариален стерилитет наличие на антитела срещу гранулозни клетки и повишени нива на провъзпалителните цитокини TNF- α и интерферон- γ . Те корелират със слаб отговор на овариалната стимулация и нисък процент на успех при IVF.

Възможността автоимунен процес, насочен срещу яйчника, да доведе до преждевременна овариална недостатъчност е доказана при животински модели (Markova et al., 2018).

1.2.2.2. Антиспермални антитела (спермоантитела)

1.2.2.2.1. История на откриването и първи проучвания

Ландщайнер пръв изследва антигенните свойства на спермата. През 1899 г. той съобщава за имобилизиращи антитела, образувани от морско свинче след интраперитонеално инжектиране със сперма от бик (Ashitaka et al., 1964).

През 1900 г. Металников установява, че семенната течност може да има антигенни свойства и в рамките на същия биологичен вид. Той наблюдава, че инжектирани със сперма морски свинчета образуват „спермотоксин“, който имобилизира сперматозоиди. Baskin (1932) съобщава, че жена, инжектирана със семенна течност, не забременява в течение на една година. През 1959 г. Изожима и колектив инжектират женски морски свинчета с емулсия от тестис и адювант на Фройнд (Isojima et al., 1959) и установяват, че плодовитостта им спада до 24%, докато в контролната група е 84%. Wilson (1954) съобщава за двама пациенти, в чиито еякулати се наблюдава спонтанна аглутинация. В тяхната семенна плазма и кръвния им серум се установяват естествени спермоантитела (Li, 1974). Rumke and Hellinga (1959) публикуват изследвания на 2015 мъже с неизяснено безплодие. При 67 от тях (3,3%) се откриват

серумни титри на спермаглутинини 32 или по-високи, докато у 416 фертилни мъже, както и при 124 инфертилни жени няма такива титри ($p < 0,001$).

Franklin и Dukes (1964) установяват висока концентрация на естествени спермоаглутинини в серум от пациентка с безплодие с неизяснена етиология. След терапия с презервативи се постига успешна бременност (Li, 1974).

В България първите проучвания за ролята на ASA са направени в Катедрата по Биология на МУ – София под ръководството на акад. Радой Попиванов с участието на проф. Наков, доц. Живков, доц. Буланов, проф. Еврев, проф. Ватев и в сътрудничество с акад. Кирил Братанов (ИБИР, БАН). Въз основа 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. Това направление продължава да се развива в Катедрата по биология в трудовете на Д. Димитрова, Р. Фичорова, И. Гатева, С. Калайджиев, В. Лазаров.

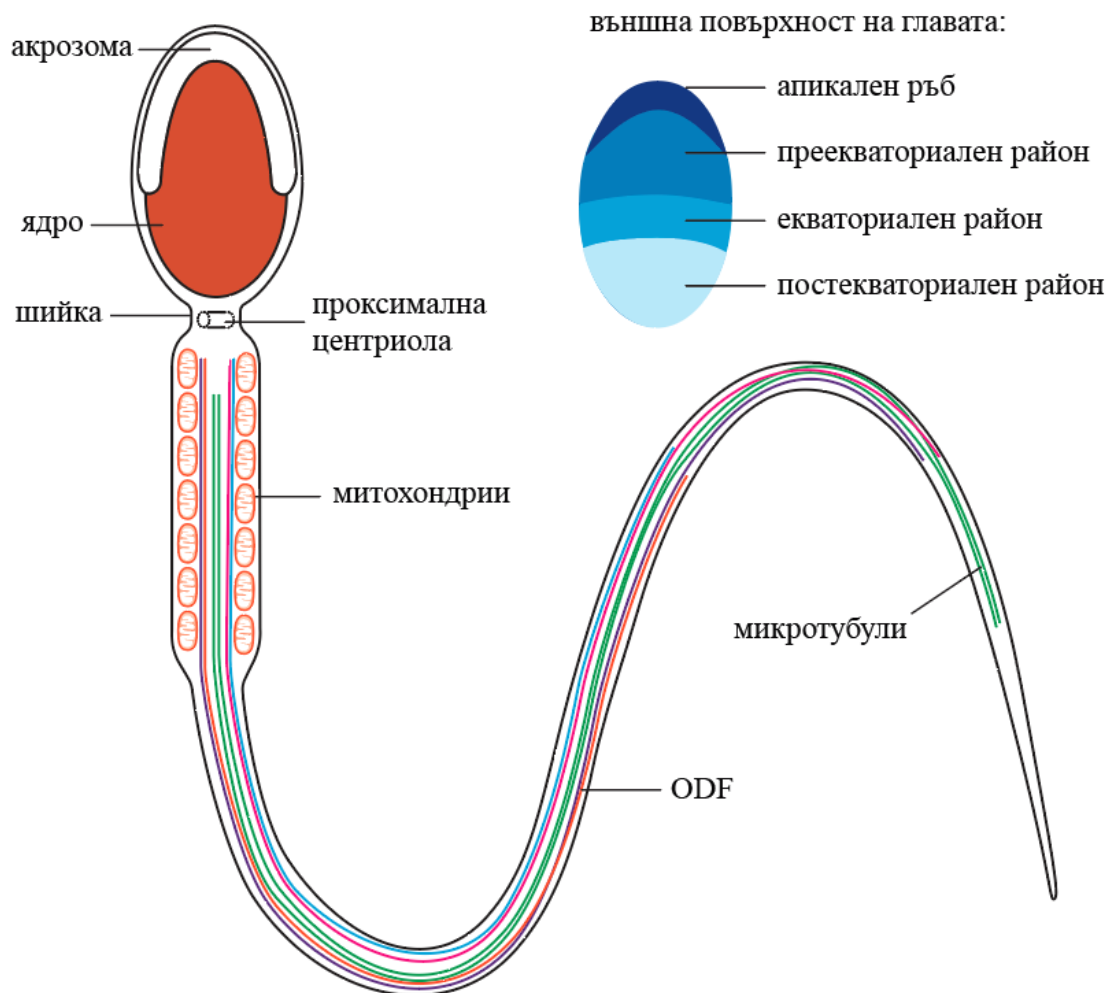
Първа статистика за безплодието у нас е направена в периода 1980 – 1982 г. Проучени са 27 024 двойки от цялата страна и е отчетен стерилитет при 7,55% от тях. През 2005 г. данните показват, че 6,1% от жените във фертилна възраст са засегнати от стерилитет, а около 15% имат затруднения с настъпването на бременност и износването на жизнеспособно дете (Ингилизова-Пенчева, 2016).

1.2.2.2.2. Особенности на мъжката репродуктивна система, създаващи предпоставки за образуване на антиспермални антитела

Сперматозоидни антигени

Сперматозоидът е клетка с минимално количество цитоплазма и органели. Състои се от глава и опашка. Основните органели в главата са ядрото, съдържащо хаплоиден геном, силно кондензиран с помощта на протамини, и акрозомата – голяма секреторна вакуола в предната част. Опашката (флагелумът) се дели на шийка, съдържаща центриолите, междинна част, в която митохондрии се разполагат около микротубулите на аксонемата (осевия апарат), основна част, в която фиброзна обвивка обгражда аксонемата, и крайна част, в която аксонемата завършва под клетъчната мембрана.

Главните цитоскелетни структури в опашката са аксонемата, външните плътни нишки (outer dense fibers - ODF) – девет фибрили, всяка свързана с периферна двойка микротубули по протежение на междинната част и проксималната основна част, и споменатата фиброзна обвивка (**Фигура 3**).



Фигура 3. Устройство на сперматозоид – схема на надлъжен срез и външна повърхност на главата (модифицирано по Gadella et al., 2008) .

Мембранните протеини на сперматозоидите се подлагат на сложни посттранслационни модификации, увеличаващи трайността им (Baker, 2016). Клетъчната повърхност е хетерогенна: главата е разграничена от опашката, а в самата глава се различават четири области – апикален ръб, преекваториална част, екваториален сегмент и пост-екваториална или постакрозомна част. Запазените органели и цитоскелетните елементи имат характерна подредба, отговаряща на организацията на повърхностните домени (Gadella et al., 2008).

Областите на главата имат конкретни функции в отделните етапи на оплождането. Апикалният ръб разпознава и свързва zona pellucida и индуцира акрозомна реакция, в която се включва цялата преекваториална част (Gadella, 2017). Акрозомната реакция е екзоцитоза, освобождаваща ензими за локално лизиране на зоната. Протича чрез множество сливания между преекваториалната плазмена мембрана и подлежащата външна акрозомна мембрана, при което те се откъсват и образуват смесени везикули. Екваториалният сегмент остава непокътнат и е специфичната област, която разпознава и свързва плазмената мембрана на овоцита (оолемата), за да настъпи фузията на двете гамети. Опашката също има хетерогенна структура с разграничени повърхностни области, за които се смята, че имат значение за подвижността на сперматозоида (Brewis and Gadella, 2017).

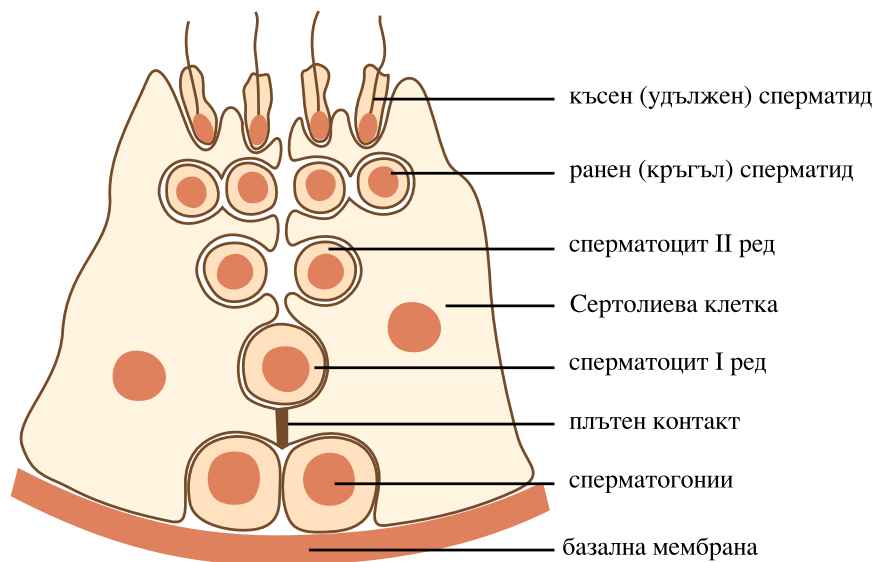
Съществува връзка между локализацията на сперматозоидните антигени, имащи значение за оплождането, и тяхната имуногенност. Откриването на антигени на сперматозоидите, участващи в оплождането, изисква цялостно разбиране на състава на плазмената мембрана на сперматозоидите, както и на взаимодействието ѝ с обвивките на ооцита (corona radiata и zona pellucida) и с оолемата. Редица важни за оплождането сперматозоидни протеини и гликопротеини са идентифицирани най-напред чрез хиперимунни ксеногенни антисеруми, серуми от инфертилни пациенти (мъже и жени) и моноклонални антитела срещу сперматозоидни компоненти (Димитрова, 1989).

Сперматогенеза и кръвно-тестисна бариера

Сперматогенезата е процес на клетъчна пролиферация и диференциация, водещ до образуване на мъжките гамети – сперматозоидите. Протича в извитите семенни каналчета на тестиса. Те са постлани със сперматогенен епител, изграден от незрели сперматозоидни предшественици и Сертолиевите клетки. Сертолиевите клетки секретират растежни фактори за паракринна регулация на сперматогенезата, изхранват развиващите се сперматоцити и сперматиди, дават им опора, фагоцитират дегенерирани клетки и накрая освобождават сперматидите. Плътни контакти между Сертолиевите клетки образуват кръвно-тестисна бариера. Тя осигурява

подходяща паракринна среда за мейозата и спермиогенезата и предотвратява имунен отговор срещу сперматозоидните антигени, които са потенциални автоантигени (Johnson et al., 2008).

Кръвно-тестисната бариера (КТБ) е една от най-непроницаемите прегради в тялото на бозайниците. Тя разделя сперматогенния епител на базална и апикална (адлуминална) част. В апикалната част протичат мейозата и спермиогенезата, изолирани от бариерата в специализирана микросреда. В базалната част, преди бариерата, сперматогониите се делят и диференцират до прелептотенен стадий. КТБ е динамична и търпи промени, за да пропусне прелептотенните сперматоцити. Тя обаче не трябва да се нарушава дори временно, защото това би създавало опасност от имунен отговор срещу мейотични и постмейотични сперматогенни клетки. Има данни, че сложни протеинови комплекси и стероиди заедно изграждат плътни контакти под влияние на цитокини (TGF- β , TNF, IL-1), за да осъществят трудната задача – преминаване на сперматоцитите и същевременно запазване на бариерата. Зад преминаващите сперматоцити се създава нова бариера, а старата дегенерира (Cheng and Mruk, 2012) (Фигура 4).



Фигура 4. Схема на етапите на сперматогенезата и кръвно-тестисната бариера.

Основната функция на КТБ е да бъде имунологична преграда, за да се избегне имунен отговор срещу сперматозоидите, който би могъл да доведе до

мъжко безплодие (Cheng and Mruk, 2012). Доколкото през епитела на семенните каналчета не преминават кръвоносни и лимфни съдове, нито нерви (те се намират в интерстициума между семенните каналчета), кръвно-тестисната бариера регулира потока от йони, хранителни вещества, хормони и паракринни фактори от базалната към апикалната част. Тази селективност създава уникална микросреда за развитието на сперматозоидите.

Някои токсични вещества (кадмий, бисфенол А) увреждат тестисите чрез нарушение на кръвно-тестисната бариера. Това води до загуба на сперматогенни клетки, намален брой сперматозоиди и мъжко безплодие или субфертилност. КТБ може да се наруши от възпалителни процеси в мъжката полова система (орхити и орхиепидидимити), вродени аномалии (крипторхизъм), травми, обструкции на гениталния път, вазектомия, варикоцеле, инфекции (например *Chlamydia trachomatis*) (Dimitrova et al., 2004). Следователно увреждането на КТБ е още един механизъм, по който стресовите фактори могат да окажат вредно въздействие на сперматогенезата.

Клетки на имунната система в тестиса

В тестисите на бозайници се откриват левкоцити, по-специално макрофаги, лимфоцити и мастоцити, а при определени условия – и полиморфонуклеарни левкоцити (PMN, главно неутрофили). Макрофагите в тестиса имат специфични трофични ефекти върху Лайдиговите клетки и стероидогенезата. В същото време развитието и функциите на популацията тестикулни левкоцити явно се влияят от вътрешната среда в тестиса и особено от Лайдиговите и Сертолиевите клетки. Клетките на имунната система обаче имат потенциал за увреждане на тестикулната функция и нормалната среда на тестисите в случай на активиране.

Лимфните съдове на тестисите са широки, ефективни и се вливат директно в локалните лимфни възли. Интерстициалната тъкан на човешките тестиси се състои от слабо населена хлабава съединителна тъкан, с големи, ясно определени лимфни съдове и значителен брой "резидентни" левкоцити, главно макрофаги (El-Demiry et al., 1987; Pöllänen and Niemi, 1987). При всички изследвани видове, МНС молекули нормално не присъстват в семенния

епител, но и двата им класа се експресират в тестисната интерстициална тъкан (Pöllänen and Niemi, 1987; Tung et al., 1987; Pöllänen and Maddocks, 1988).

Зародишните клетки не експресират HLA-A, -B, and -C антигени поради метилиране на гените (Fischer & Kurpisz, 1998). Липсата им предотвратява разпознаване от страна на CD8+ Т клетки (Khambata et al., 2021). Сертолиевите клетки експресират МНС клас I в малко количество (Tokuda et al., 1990). HLA-G/F се експресира слабо в предшествениците на сперматозоидите. (Fischer & Kurpisz, 1998). МНС клас II не се експресира от зародишните клетки или нетретирани соматични клетки. (Khambata et al., 2021).

Макрофагите също са ограничени в интерстициума при нормални условия. Лимфоцити са наблюдавани в епитела на семенните тубули, които са най-близо до rete testis – структурата, в която се отвеждат семенните тубули преди епидидимиса (Dym and Romrell, 1975). Там е и най-изявена експресията на МНС II (Tung et al., 1987). Има данни за по-висока концентрация на Т-клетки в капсулата на тестисите (Pöllänen and Niemi, 1987). В съответствие с тези наблюдения автоимунните реакции в тестиса показват склонност да се появяват в близост до rete testis и тестикулната капсула (Tung et al., 1987).

Мастоцити нормално се съдържат в интерстициалната тъкан на тестиса, а при редица видове бозайници там присъстват и еозинофили. Преобладаващият тип PMN – неутрофилите, нормално липсват в семенника, но се появяват при възпаление или увреждане (Hedger, 2010). След експериментално предизвикана тестикулна исхемия при плъх те се откриват не само в засегнатия тестис, а и в срещуположния и навлизането им там бива последвано от повишена апоптоза на герминативните клетки (Sukhotnik et al., 2008). Според някои данни при варикоцеле също се наблюдава присъствие и активност на неутрофили в тестиса (Hassanin et al., 2018).

Освен в тестисите, макрофаги и лимфоцити често се откриват в епитела на еферентните пътища – епидидимис, *vas deferens* и добавъчни жлези, т.е. по протежение на мъжкия генитален тракт (Ritchie et al., 1984). При инфекция и възпаление епидидимисът се инфилтрира от полиморфонуклеарни неутрофили, които при липса на адекватно лечение могат заедно със самата

инфекция да се разпространят към тестиса (Michel et al., 2015). В еякулатни проби от инфертилни мъже рядко се наблюдава повишено съдържание на PMN, което е свързано с влошена морфология на сперматозоидите (Thomas et al., 1997) и с наличие на активни форми на кислорода (Oborna et al., 2009).

1.2.2.2.3. Пътища и механизми за възникване на автоимунен отговор

Автоимунният отговор срещу сперматозоидни антигени води до нарушения в сперматогенезата – олиго- и астено-зооспермия чрез действието на цитотоксични антитела и клетъчен имунитет, аглутинация и нарушена подвижност на сперматозоидите чрез свързване на ASA с повърхността им. ASA са спермоцитотоксични, тъй като активират комплемента, както и NK-клетките и макрофагите. Този феномен се усилва при локални инфекции.

Има няколко възможни механизма за формиране на ASA при мъжете. КТБ може да бъде нарушена механично, което дава на имунната система достъп до сперматозоидните антигени. Това може да доведе до имунен отговор, в резултат на който се образуват ASA и настъпва възпалителна реакция. Освен това в пост-тестикулния генитален тракт може да се появи механична обструкция в резултат на вродена аномалия, вазектомия или травма (Alexander, 1979; Mandelbaum, 1987).

Рисков фактор за развитието на антиспермални антитела при мъжете е и нарушаването на структурата на *vas deferens* (семепровода), което настъпва при вазектомия с цел хирургическа стерилизация. При „отмяна” на вазектомията чрез вазостомия в част от случаите фертилитетът не се възстановява. Това се обяснява с поява на антиспермални антитела след вазектомията (Marmar 1991; Boursier et al., 2022).

Циркулиращи спермоаглутиниращи антитела са установени при 62% от мъже с вазектомия до 2 години след процедурата. Те се откриват на 7-11 ден след двустранна лигатура на *vas deferens*. Спермоаглутиниращата активност на серума достига максимален титър 18 месеца след интервенцията. Спермоимобилизиращи антитела се откриват у 30% от мъжете 12 месеца след вазектомия, но се наблюдава спад на честотата до 9,5% след 18 месеца и на

титъра след 24 месеца (Ansbacher, 1973). Кръвоизливите са чести при мъже след вазектомия. Установено е, че между 50% и 70% от тези мъже впоследствие са положителни за ASA в серума (Li, 1974; Linnet, 1983). Серуми от мъже с вазектомия могат да бъдат полезни реагенти за идентифициране на спермоантитела, свързани с фертилността (Naaby-Hansen, 1990; Primakoff et al., 1990).

Подобни резултати са получени при експериментална вазектомия на опитни животни. Петнадесет дни по-късни настъпва дегенерация на извитите каналчета на тестиса, редуциране на сперматогенезата и асперматогенен автоимунен орхит. В проксималната част на епидидимиса навлизат макрофаги и разрушават сперматозоидите (Alexander and Anderson, 1979).

Друга причина за образуване на спермоантитела са инфекции на мъжката репродуктивна система. Инфекциите се причиняват от патогени, предавани по полов път или попаднали през пикочните пътища. Най-честите причинители са *E. coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, а за европейското население – *Chlamydia trachomatis* (Wolff et al. 1994). Важен фактор, който влияе върху плодовитостта, са инфекциите на добавъчните жлези на мъжката полова система. Установено е, че след излекуване на инфекцията с антибиотици оплодителната функция се възстановява само при някои от пациентите (Comhaire et al., 1988; Branigan et Muler, 1994). Също така много от функционалните аномалии, причинени от инфекции, не се проявяват при основен анализ на спермата, което обяснява защо някои автори не могат да свържат инфекциите с безплодието (Comhaire et al., 1999).

Продуциране на ASA може да се иницира не само от инфекции на мъжкия генитален тракт, а и от други бактериални инфекции. Dimitrova et al. (2016) откриват корелация между наличието на ASA и антитела срещу *Helicobacter pylori* и предполагат, че инфекцията с *H. pylori* повлиява образуването на ASA. Един възможен механизъм за образуване на спермоантитела при инфекция е кръстосана реактивност между компоненти на сперматозоидите и антигени на патогени, срещу които се е развил имунен отговор (Eggert-Kruse et al., 2015).

1.2.2.2.4. Пътища и механизми за възникване на изоимунен отговор

Компонентите на сперматозоидите, които индуцират имунен отговор у жената, се определят като изоантигени (Voisin et al., 1975).

Тъканите на женските полови пътища и секретите им (вагинални секрети и цервикална слуз) осигуряват защита, която е част от вродения имунитет и се осъществява при първоначална среща с антигена. Семенната течност, представляваща сложен комплекс от сперматозоиди, други клетки и разтворими компоненти, може да сенсibiliзира женския генитален тракт.

Хуморалната защита в женския генитален тракт се осигурява чрез антитела от класове IgG, IgA и IgM. Те зависят от менструалния цикъл и хормоналните нива. IgA и IgG достигат максимална концентрация преди овулацията, което се дължи на повишеното ниво на IL-1 β . Естрогенът причинява повишена експресия на секреторния IgA (S-IgA) (Kutteh et al., 1996).

По-голямата част от сперматозоидните антигени се разрушават от извънклетъчни ензими, отделяни главно в утеруса. Женските полови пътища, най-вече матката и маточната шийка, притежават и макрофаги, които фагоцитират сперматозоиди и преработват антигените им за имунно разпознаване. Въпреки това жените по правило не развиват изоимунитет спрямо сперматозоидите. Спермалната плазма има имуносупресивни свойства, дължащи се на наличието в нея на простагландини и TGF- β . Освен това тя съдържа инхибитори на комплемента и белтъци, свързващи константната област на IgG (Kelly, 1995). Фоликулната течност също има имуносупресивни свойства (Dirnfeld et al., 2002), а женският полов път е богат на регулаторни T-лимфоцити със супресорно действие (Jiang and Kelly, 2011).

Имунното отхвърляне на мъжката семенна течност в женските полови пътища се обяснява като нарушаване на естествената толерантност, което води до локален и/или системен имунен отговор. Този имунен отговор може да предизвика високи нива на антитела срещу компоненти на семенната течност и/или сперматозоидите. Доказано е, че изоимунизацията е свързана с повишена вероятност за безплодие (Brazdova et al., 2016). ASA при жените понижават фертилността чрез различни процеси преди или след оплождането

като аглутинация или имобилизация на сперматозоидите, нарушаване на придвижването през цервикалния мукус, потискане на капацитацията, предизвикване на преждевременна акрозомна реакция, инхибиране на сперматозоидните ензими, свързване на zona pellucida (ZP), свързване на оолемата, което може да наруши нормалното сливане на мембраните на сперматозоида и яйцеклетката и/или имплантиране на ембриона (Bohring and Krause, 2003; Brazdova et al., 2012; Brazdova et al., 2013).

Антиспермалните антитела в цервикалния мукус са главно аглутинини, макар че при наличие на комплемент имат и имобилизиращ ефект. Тяхното съдържание се променя по време на менструалния цикъл: най-високи нива на ASA от класове IgA и IgG се достигат преди овулацията, което се обяснява с повишената концентрация на β -компонента на IL-1 (Brazdova et al., 2016).

Появата на ASA при жените може да се дължи на различни фактори. Механичното или химично увреждане на целостта на мукозата на женските полови пътища може да доведе до контакт на имунната система със сперматозоидните антигени и образуване на антитела срещу тях. ASA могат да се образуват и след инфекции на женския генитален тракт. Cunningham et al. (1991) доказват ASA при група пациентки на фертилна възраст, които не успяват да забременеят. 46% от изследваните пациентки с инфекции на гениталния тракт показват положителен резултат за ASA, което е значително по-често, отколкото при здрави жени.

Инфекциите на мъжкия генитален тракт могат да причинят безплодие не само чрез пряко влияние върху оплодителните качества на сперматозоидите, но и чрез влияние върху партньорката, сенсibiliзирайки имунната ѝ система и предизвиквайки образуване на антитела, които реагират кръстосано със сперматозоидни антигени (Eggert-Kruse et al., 1997; Rowe et al., 2000).

Наличието на спермоантитела у мъжа в някои случаи води до поява на спермоантитела у партньорката му. Обяснението е, че покритите с ASA сперматозоиди са по-имуногенни (Witkin and Chaudhry, 1989a).

Спермоантитела се откриват и в серуми на девствени момичета (Al-Fahham, 2018). Честотата на ASA в клинично значим титър за изследваната

група е 2,2%. В кръвната картина на момичетата е установен леко завишен брой левкоцити. При микробиологично изследване на урината са открити бактериите *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Proteus mirabilis*. Наличието на ASA в случая се обяснява с кръстосана реактивност между сперматозоидни и бактериални антигени.

1.2.2.2.5. Локализация и значение на антиспермалните антитела

Антиспермалните антитела (ASA) се откриват на много места, включително серум (при мъже и жени), семенна течност, яйчникова фоликулна течност, вагинален или цервикален секрет, или като свързани с антигенни епитопи директно върху клетъчната мембрана на сперматозоидите (Mazumdar and Levine, 1998). Имуноглобулин G (IgG) преобладава в серума, докато IgA преобладава в мукозата и в секрети като семенна течност и цервикална слуз. И двата класа имуноглобулини могат да бъдат открити свързани с антигени на повърхността на сперматозоидите. Някои проучвания предполагат, че IgA може да има по-голямо клинично значение за безплодието в сравнение с IgG, въпреки че има висока (> 95%) корелация между наличието на двата класа. (Kremer & Jager, 1980; Leathersich and Hart, 2022)

Концентрацията на антиспермалните антитела при отделните индивиди варира. Антителата се трансудират през стените на кръвоносните съдове, или се секретират локално от субмукозните плазматични клетки (Bronson, 2000).

Независимо от това, че отдавна е установена корелация между фертилния статус, изотипа и титъра на тези ASA (Rumke et al., 1974) и че аглутинирани сперматозоиди често се наблюдават в спермалните проби или в цервикалния мукус при пациенти с неизяснено безплодие, не всички ASA имат отношение към инфертилитета. Само ограничен брой сперматозоидни антигени са свързани с имунологично обусловено безплодие при човека (Kyurkchiev et al., 1985; Nakov, 1996; Aitken, 2002).

ASA могат да повлияят на различни етапи от оплодителния процес (Wakimoto et al., 2024).

Cui et al. (2015) установяват значителна разлика в броя и подвижността на сперматозоидите между ASA-позитивната група пациенти и ASA-

отрицателната група. Проучването не показва значителна разлика между други параметри на спермата, като морфология и обем на еякулацията.

ASA повлияват оплодителната способност най-вече като се свързват с повърхността на сперматозоидите. Имобиализиращите антитела директно блокират оплождането чрез намеса в капацитацията и акрозомната реакция (Francavilla et al., 1997; Vickram et al., 2019). ASA влияят и върху подвижността на сперматозоидите, плътността на сперматозоидите, вискозитета на спермата и свързването към zona pellucida (Fenichel et al., 1989; Schwarzingler et al., 2009; Bohring et al., 2001; Esteves et al., 2007)

Много автори смятат, че повечето имунологични реакции се случват в долната част на женския репродуктивен тракт. Изолирани от цервикалния мукус ASA имобилизират сперматозоидите, като IgA се прикрепват предимно към главата на сперматозоида, а IgG и IgM – предимно към междинната част и опашката, като последните активират и системата на комплемента (Wang et al., 1985; Menge et al., 1989; Vickram et al., 2019). Висок титър на спермоимобиализиращите антитела (над SI50) нарушава подвижността на сперматозоидите през цервикалния мукус. Този титър е индикация и за ефекта на спермоимобиализиращите антитела върху миграцията на сперматозоидите към фалопиевите тръби. (Shibahara et al., 2007; Wakimoto et al., 2024)

В литературата има известно противоречие относно евентуалното влияние на спермоантителата върху оплождането и съдбата на зародиша. Според някои автори нивата на ASA не са свързани с успеха на оплождането и забременяването след IVF и ICSI (Zini et al., 2011), което позволява чрез тези методи на асистирана репродукция да се заобикалят проблемите, породени от спермоантителата. От друга страна обаче, опити с животни показват, че спермоантителата могат да попречат на оплождането и дори да предизвикат смърт на ранните ембриони (Ahmad & Naz, 1992; Esmailnejad et al., 2020).

Спермоимобиализиращите антитела оказват отрицателно влияние върху развитието на ембриона *in vitro*, водейки до подчертано несъответствие в качеството на ембриона. За подобряване на резултатите от IVF е нужно прецизно боравене с гаметите и ембрионите и най-вече да се избягва замърсяване на хранителната среда със серум и фоликулна течност в случаите, когато има спермоимобиализиращи антитела (Taneichi et al., 2002).

Според някои автори ASA могат да нанесат вреда и на по-късни етапи от пренаталното развитие. Witkin и Chaudhry (1989b) установяват статистически значима връзка между наличието на IgG антитела срещу антигени от опашката на сперматозоида и анамнестични данни за повтарящи се аборти без друга установена причина. Авторите предполагат, че антиспермалните антитела са маркер за нарушена регулация на имунитета при жени с повтарящи се спонтанни аборти. Ако бременни жени, сенсibiliзирани към сперматозоидни антигени, се излагат на контакт със сперматозоиди, майчината имунна система може да се активира срещу бащините антигени, присъстващи върху ембриона.

Още от откриването на антигенните свойства на спермата се зараждат идеи за възможно използване на ASA като контрацептивна ваксина. Предимствата на метода са липса на хормонални намеси в организма и обратимост на действието.

На базата на моноклонални антитела срещу CD52g се разработва контрацептив за жени (Anderson et al. 2020; Baldeon-Vaca et al, 2021).

Сперматозоидният мембранен протеин Izumo е целеви антиген за разработване на имуноконтрацептивна ваксина за жени, тъй като протеинът е важен за разпознаването между гаметите. (Ellerman et al., 2009) Анти-Izumo поликлонални антитела в миши модел възпрепятстват взаимодействията сперматозоид-яйцеклетка и оплождане не настъпва (Inoue et al., 2005).

Анализът на идентифицираните чрез ASA антигени с отношение към оплождането е важен, тъй като ще допринесе както за диагностицирането на имунологично обусловеното безплодие при човека, така и за избора на имуногенни протеини – кандидати за имунна контрацепция. Имунологични проблеми могат да възникнат на всички етапи от репродуктивния процес.

Спермоантитела се образуват и при двата пола и са една от причините за субфертилитет и инфертилитет в човешките популации. При диагностиката на имунологично обусловеното безплодие е необходим комплексен подход и сътрудничество между лабораториите по диагностика на ASA и клиниката. Навременната и точна диагностика може да допринесе за правилното и успешно лечение на инфертилитета. Предвид биологичното и социално значение на безплодието, беше избрана целта на настоящия дисертационен труд, както и експерименталните подходи и методите за нейното постигане.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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

За постигане на поставената цел бяха разработени следните основни задачи:

1. Формиране на групи от серуми на безплодни двойки по предварително зададени критерии и скриниране на серумите за наличие на спермоантитела чрез класически методи: спермоаглутинационен, спермоимобилизационен, ELISA.

2. Цитогенетични изследвания на лимфоцити от подбрани пациенти за наличие на хромозомни аберации.

3. Проследяване на експресията и локализацията на нискомолекулният топлинно-шоков протеин Hsp27 в ембрионални тъкани чрез имунохистохимични методи.

4. Скриниране на серумите за антитела срещу нискомолекулният топлинно-шоков протеин Hsp27 чрез ELISA и анализ на получените резултати от популационно-статистическа гледна точка.

5. Имунофлуоресцентна визуализация на реакцията на серуми от инфертилни пациенти със сперматозоиди.

6. Интерпретация на резултатите от гледна точка на патогенезата на инфертилитета и съставяне на модели за предполагаемия ѝ механизъм.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

3.1.1. Серуми от пациенти

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

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

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

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

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

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

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

Според диагнозите разпределихме серумите в три групи:

1. От пациенти с първично безплодие

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

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

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

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

3.1.2. Сперматозоиди от здрави донори

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

3.1.3. Ембрионални тъкани

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

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

3.1.4. Неутрофили от пациенти с плеврален излив

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

3.1.5. Антигени и антитела

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

3.2. Методи

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

Проба от донор с нормоспермия (предварително тестван за ASA с негативен резултат) се втечняваше, като се инкубираше 30 min на 37°C. След центрофугиране при 3000 об/min за 10 min (на стайна температура) с центрофуга Hettich Rotofix 32 отделяхме надутайката. Към утайката добавяхме

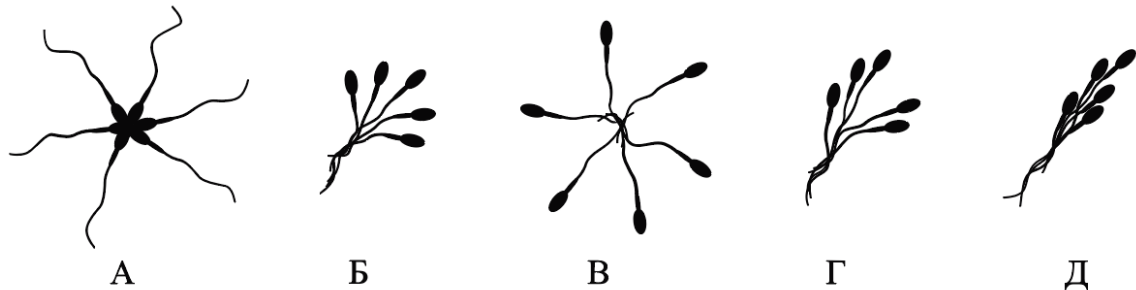
хранителна среда TC Medium 199 10x (работно разреждане 1x), обогатена с 0,3% BSA (говежди серумен албумин), и центрофугирахме 10 min на 3000 об/min. Изхвърляхме надутайката, надсложвахме нова хранителна среда и оставяхме да престои 30 min на 37°C под наклон 45°, за да изплуват най-жизнените и подвижни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

От пациентските серуми се изготвяше серия падащи разреждания. В първата ямка на микротитърна плака на Terasaki се накапваха по 5 µl от изследвания серум. Добавяхме 5 µl буфер на Бейкър (3% глюкоза, 0,46% Na₂HPO₄·7H₂O, 0,2% NaCl, 0,01% KH₂PO₄, pH 8,1), за да разредем 1:2. Правехме серия от падащи разреждания. Освен изследваните серуми, залагахме положителна и отрицателна контрола. Отрицателната контрола беше серум от предварително изследван пациент с негативни резултати за ASA, разреден с буфер на Бейкър 1:100. За положителна контрола служеше заешки антисерум срещу човешки сперматозоидни антигени, получен в нашата лаборатория, разреден 1:10 и 1:100, както и серуми от безплодни пациенти с предварително доказан висок титър на ASA.

След накапване на изследваните серуми, повърхността на плаката внимателно се надсложваше с 10 ml течен парафин. Накапваше се по 1 µl от сперматозоидната суспензия, плаката се покриваше и беше инкубирана на 37°C в термостат за 1 час. Резултатите се отчитаха с наблюдение на плаката под инвертен микроскоп.

При наличие на ASA срещу повърхностни антигени се образуваха комплекси – аглутинати, със запазена подвижност на сперматозоидите. Според спецификата на антителата и локализацията на аглутиногените се наблюдаваха няколко основни типа аглутинация, показани на **Фигура 5**

(опростен вариант на фигура, разработена от експерти на СЗО – Rose et al., 1976). След отчитане на наличие и тип на аглутинацията се определяше титърът на спермоаглутиниращите антитела в тестирувания серум, като за клинично значими се приемаха титри, равни или по-високи от 32.



Фигура 5. Типове аглутинация:

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

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

В. Връх на опашка с връх на опашка (*tail tip to tail tip, tt-tt*).

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

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

3.2.2. Спермо-имобилизиращ тест на Изожима (SIT)

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

Във всяка ямка на микротитърна плака Terasaki накапвахме по 10 μ l буфер на Бейкър. Добавяхме по 10 μ l от изследвания серум. След ресуспендиране 10 μ l се прехвърляха в следващата ямка, и внимателно надсложвахме плаката с 10 ml течен парафин. Във всяка ямка накапвахме по 1 μ l сперматозоидна суспензия, обработена по методиката swim up, както е описано по-горе за спермоаглутинационния метод на Friberg. За всеки пациент използвахме по 4 ямки, като в 2 от тях накапвахме по 2 μ l комплемент от морско свинче (Национален център по заразни и паразитни болести, София), а другите 2 ямки оставяхме без комплемент. За отрицателна контрола служеше предварително изследван серум, негативен за ASA, разреден с буфер на

Бейкър 1:100. За положителна контрола се използваше заешки антисерум срещу сперматозоидни антигени, разреден 1:10 и 1:100, и серуми от безплодни пациенти с доказан спермо-имобилизиращ ефект.

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

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

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

3.2.3. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA)

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

3.2.3.1. ELISA за отчитане на ASA

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

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

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

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

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

За проявяването във всяка ямка се добавяхме по 50 μ л (12 μ л цитратен буфер и 6 μ л 30% H_2O_2 + 5 mg OPD), за 4-7 min. Точното време за престой определихме по цвета на отрицателната контрола, която съдържа PBS вместо изследвания серум. В момента, в който наблюдавахме съвсем леко оцветяване на ямката с PBS, стопирахме реакцията с 10% H_2SO_4 , по 50 μ л/ямка. Резултатите отчетохме с ELISA reader DW-SM600 при дължина на вълната 492 nm.

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

3.2.3.2. ELISA за доказване на антитела срещу Hsp27

За натоварване на плаките използвахме рекомбинантен човешки Hsp27 протеин на Elabsience, каталожен номер PKSH031656. Работната концентрация на антигена бе определена чрез предварителното му титриране в разреждане от 1,25 μ g до 0,0093 μ g/ямка в coating буфер. Натоварените плаки с падащи разреждания на антигена инкубирахме 2 часа на стайна температура и 16 часа при 4°C. Като първо антитяло използвахме заешки поликлонален серум анти-Hsp27 на Elabsience, каталожен номер E-AB-31748, в разреждане 1:10 000 и плаката инкубирахме 1 час на стайна температура. Като второ антитяло използвахме кози антизаешки серум Sigma Aldrich Goat anti-rabbit IgG - Peroxidase кат. номер A0545, разреден 1:1000. Реакцията визуализирахме

с OPD, а стойностите отчетохме на ELISA reader DW-SM600 при дължина на вълната 492 nm. Анализът на резултатите показва, че подходящото разреждане за натоварване на плаките е 0,45 µg/ямка.

Антигенът (рекомбинантен човешки Hsp27 протеин на Elabsience, каталожен номер PKSН031656) накапахме върху 96-ямкова PVC плака (U-bottom, Costar, Cambridge, USA) по 50 µl/ямка антиген, разтворен в 0,05 M карбонатен буфер (NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9,6) и плаките инкубирахме на стайна температура 1 час и на 4°C за 16-18 часа.

След трикратно измиване с миещ буфер (PBS pH 7,2, съдържащ 0,05% Tween-20) на покритите с антиген плаки, свободните протеин-свързващи места бяха блокирани чрез накапване на 100 µl/ямка блокиращ буфер (0,2% Tween 20 /PBS) за 60 мин.

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

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

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

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

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

3.2.4. Имунохистохимична оцветяваща техника

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

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

1. Фиксиране и включване на материала – той беше поставян последователно в 10% неутрален формалин (Merck), стандартни редици от алкохол и ксилол и парафиново блокче.
2. Приготвяне на хистологични срези с дебелина 4 μm и монтиране на адхезивно предметно стъкло; изсушаване и залепване на материала – 2 часа на 60°C и след това 12 часа на 37°C.
3. Депарафиниране чрез трикратно потапяне на препарата в ксилол за по 10 min.
4. Рехидратиране чрез последователно прекарване на препаратите през етанол – 100 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 % по 5 min, подсушаване с филтърна хартия и промиване с дестилирана H₂O.
5. Антигенно възстановяване по протокол на производителя: предварително загряване до 65°C, след което покачване на температурата до 95°C, 20 min на 95°C и охлаждане до 65°C; двукратно промиване с миеш буфер (от производителя).
6. Накапване и инкубиране на срезите с първото антитяло за 20 min, двукратно промиване.

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

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

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

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

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

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

Отчитането и документирането на имунохистохимичните реакции е извършено в Катедрата по биология на МУ – София с използването на светлинни микроскопи Carl Zeiss Axioskop 20 и Olympus BX 53.

3.2.5. Конвенционален цитогенетичен анализ

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

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

2. Обработка на културите: Между 68 и 72 час към културата добавяхме 0,05 ml колцемид. След инкубация за 25 min на 37°C културата се прехвърляше в центрофужна епруетка. Центрофугираше се за 10 min на 1200 оборота/min, отпипетирахме надутайката, а утайката беше разбивана. Добавяхме 5 ml

предварително темперирани на 37°C хипотоничен (0,75 M) разтвор на KCl. Инкубирахме 10 min при 37°C. Центрофугирахме за 10 min на 1200 оборота/min, отпипетирахме надутайката, а утайката беше разбивана. Добавяхме 5 ml пресен студен фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина в обемно съотношение 3:1, охладен на -20°C). Горните стъпки повтаряхме още два пъти. Накрая ресуспендирахме утайката в малко количество пресен фиксатор и я съхранявахме на -20°C.

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

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

5. Микроскопски анализ: Избираха се подходящи метафазни пластинки с добре разпръснати, неприпокриващи се хромозоми и отчетлив бендинг. При увеличение 1000X всяка метафазна пластинка се анализираше за бройни и структурни хромозомни аберации. При некомплицирани случаи се анализираха 12-15 пластинки, а при съмнение за мозаицизъм броят на анализирани пластинки можеше да се увеличи до 100.

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

3.2.6. Индиректна имунофлуоресценция

Еякулатни проби бяха получавани от здрави нормозооспермични донори. Оставяха се да се втечнат при 37°C за 30 min. След това сперматозоидите се промиваха с PBS (рН 7,2). Бяха нанасяни на предметни стъкла, изсушавани на

въздух на стайна температура и фиксирани със студен етанол за 10 min и студен ацетон за 2 min. След фиксацията пробите се рехидратираха за 10 min в PBS (pH 7,2) с 1% BSA. Същият буфер (PBS с 1% BSA) се използваше за разреждане на антителата и промиване на препаратите след инкубациите с разтворите на антителата.

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

3.2.7. Хемилуминесцентен анализ на неутрофили

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

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

Хемилуминесцентният анализ се извършваше в Катедрата по медицинска физика и биофизика на МУ- София с тяхното любезно съдействие.

3.2.8. Статистически методи

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

значими, а при $P \geq 0,05$ приемахме, че няма статистически значима разлика между двете групи.

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

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

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

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

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

4. РЕЗУЛТАТИ

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

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

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

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

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

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

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

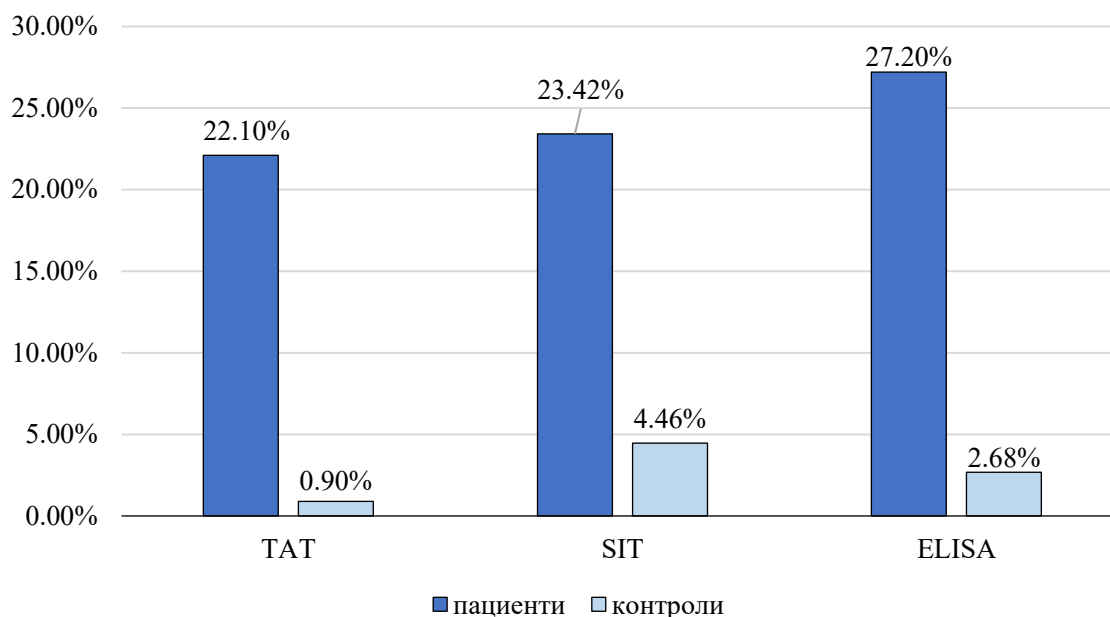
При изследването на контролната група (112 фертилни лица от същата възрастова група и разпределение по пол) за наличие на спермоантитела с трите метода бяха получени следните резултати: TAT – 1 положителен (0,90%), SIT – 5 положителни (4,46%) и ELISA – 3 положителни (2,68%).

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

Получените резултати са представени в **Таблица 3** и **Фигура 6**.

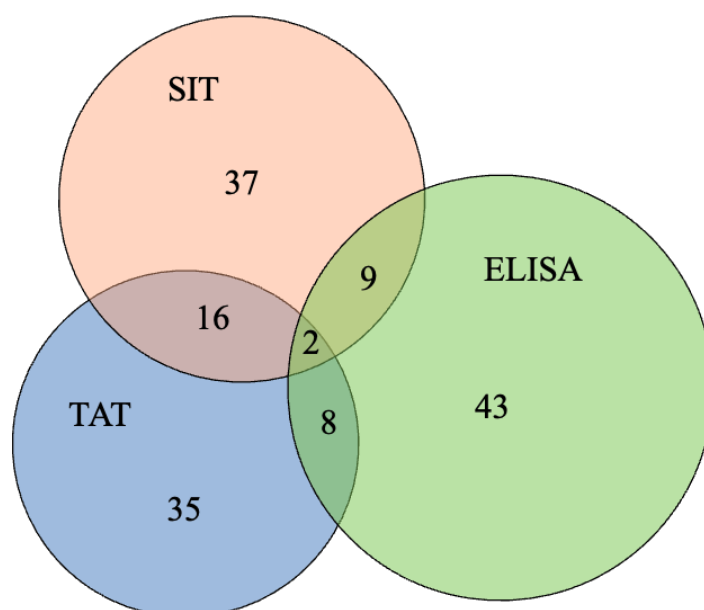
Таблица 3. Относителна честота на положителните резултати – показани са процентните честоти на положителни резултати по трите метода за изследване на ASA у пациентите с безплодие, сравнени с контролната група.

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



Фигура 6. Относителна честота на положително реагиращите серуми от изследваните групи по отношение на клинично значимите стойности на спермоантителата – графично е представен процентният дял на положителните резултати по трите метода за изследване на ASA в серумите на пациентите с безплодие, сравнени с контролната група. (За статистически достоверни се приемат резултати при $P < 0,05$.)

Беше изследвано и евентуалното наличие на корелация между присъствието на спермоантитела в серума, установени чрез различните използвани методи – TAT, SIT и ELISA. Както се спомена по-горе, от 158 изследвани пациенти 35 (22,10%) показаха положителен резултат при TAT, 37 (23,42%) – при SIT и 43 (27,20%) – при ELISA. Положителна реакция едновременно по TAT и SIT беше регистрирана при 16 пациенти, по TAT и ELISA – при 8 пациенти и по SIT и ELISA – при 9 пациенти. Двама пациенти имаха положителни резултати и по трите използвани теста – мъж на 47 години, според анамнезата – преболедувал вирусен паротит, и жена на 36 год. с диагноза първично безплодие. Степента на припокриване на положителните стойности за спермоантитела, получени при изследване на един и същ серум по повече от един от използваните методи, е показана графично чрез диаграма на Вен на **Фигура 7**.



Фигура 7. Брой серуми от пациенти с безплодие, даващи положителна реакция при отчитане на ASA с трите различни метода. Сечението на кръговете отговаря на серуми, положителни по повече от един метод.

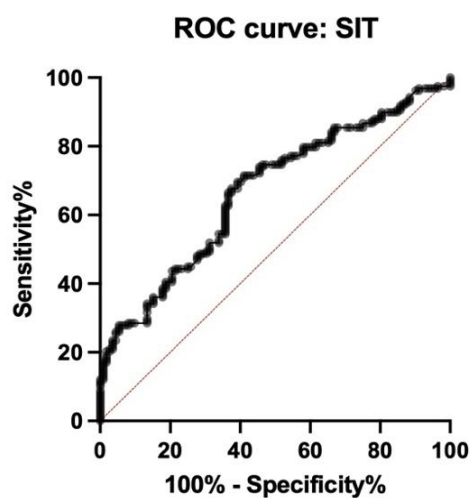
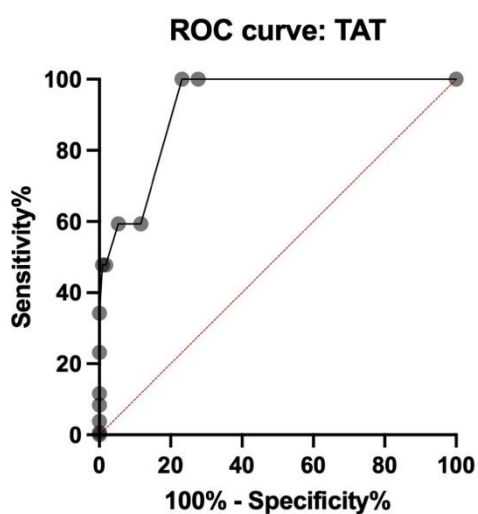
За да установим евентуални асоциации между наличието на спермоантитела, регистрирани чрез различни методи, приложихме корелационен анализ с използване на корелационен коефициент на Spearman. Установихме слаба ($r = 0.236$) корелация между резултатите от два от прилаганите методи – TAT и SIT, която беше значима ($p < 0,01$). Не беше установена значима асоциация между TAT и ELISA или между SIT и ELISA (Таблица 4).

Таблица 4. Резултати от корелационния анализ за наличие на ASA, регистрирани чрез различни методи, при пациенти с първичен стерилитет.

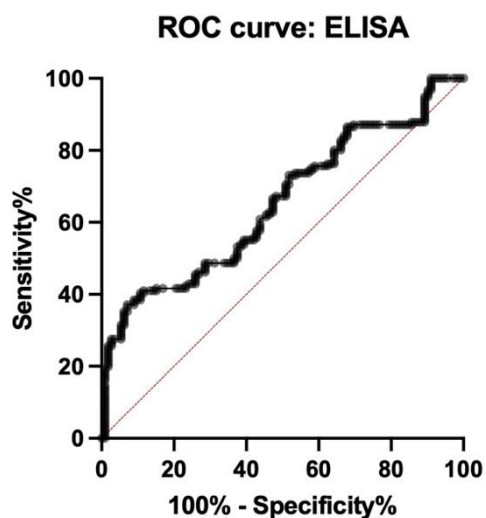
Методи	Корелационен коефициент (r)	Статистическа значимост (p)
TAT и SIT	0.23602	0,00283 < 0,01 (да)
TAT и ELISA	0.02584	0.74721 > 0,05 (не)
SIT и ELISA	0.02025	0.80064 > 0,05 (не)

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

Резултатите са представени на **Фигури 8, 9 и 10** и **Таблица 5**.



Фигура 8. ROC анализ на метода TAT. **Фигура 9.** ROC анализ на метода SIT.



Фигура 10. ROC анализ на метода ELISA.

Таблица 5. Резултати от ROC-анализа на методите TAT, SIT и ELISA.

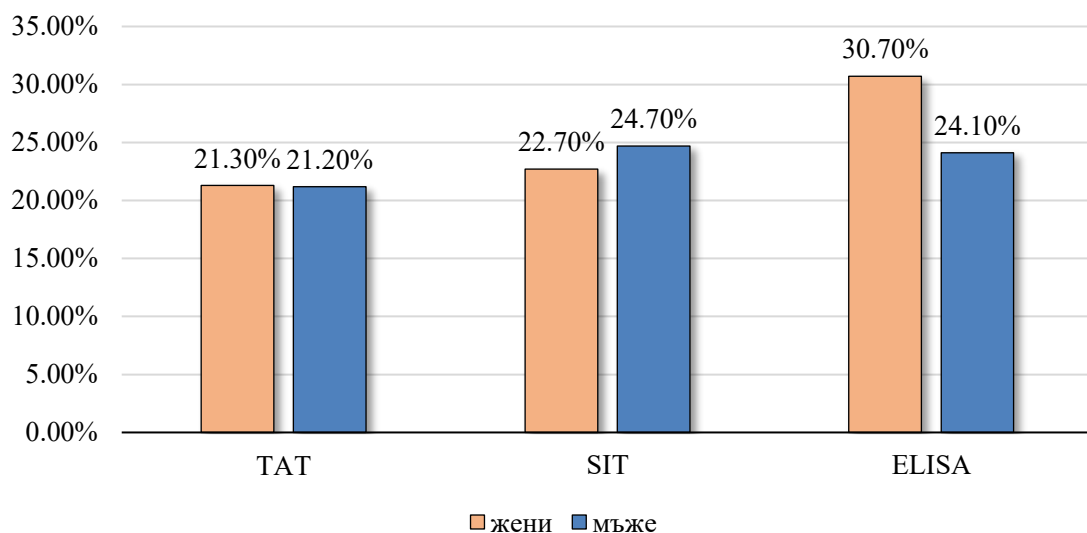
Величина	TAT	SIT	ELISA
Площ под кривата (AUC)	0,9245	0,6685	0,6527
Стандартна грешка	0,01631	0,03274	0,03307
P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Следва да се има предвид, че антиспермалните антитела при мъже и при жени спадат към различни категории (съответно автоантитела и изоантитела). С оглед на това съображение беше уместно да се намерят честотите им при двата пола поотделно. При изследване на честотата на положително реагиращите серуми от мъже и жени в пациентската група (без разделяне по диагнози) не беше установена статистически значима разлика в резултатите при двата пола ($P > 0,05$).

Получените резултати са представени в **Таблица 6** и **Фигура 11**.

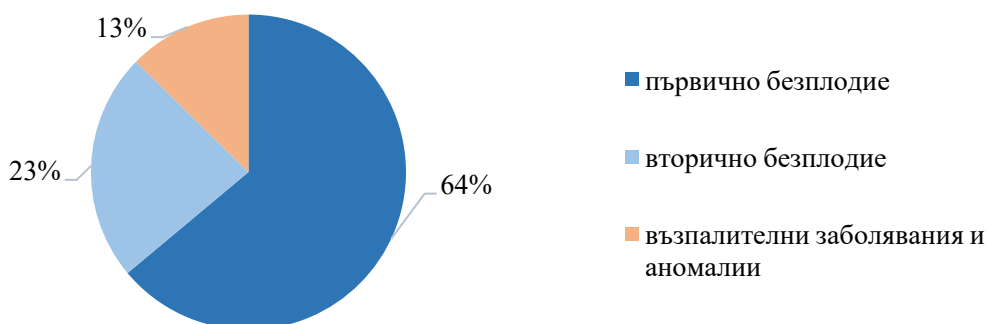
Таблица 6. Сравнение на относителната честота на положителни резултати по трите използвани метода според пола на пациентите.

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



Фигура 11. Относителна честота на положителните резултати според пола на пациентите. Графично е представена процентната честота на положителните резултати по трите метода за изследване на ASA в серума ($P > 0,05$).

С оглед на патогенезата на хуморалния имунен отговор срещу сперматозоидни антигени интерес представляваха други данни за пациентите като типът на стерилитета (първичен или вторичен) и евентуалното наличие на съпътстващи или минали заболявания. Серумите на пациентите бяха разпределени в три групи според диагнозата им: с първичен стерилитет (101 души), вторичен стерилитет (37 души) и пациенти с отклонения в спермограмата, възпалителни заболявания и аномалии, свързани с възпроизводствените функции (астенозооспермия, варикоцеле, простатит, паротит и крипторхизъм) – 20 души (**Фигура 12**). Сравнихме получените резултати според така обособените групи.



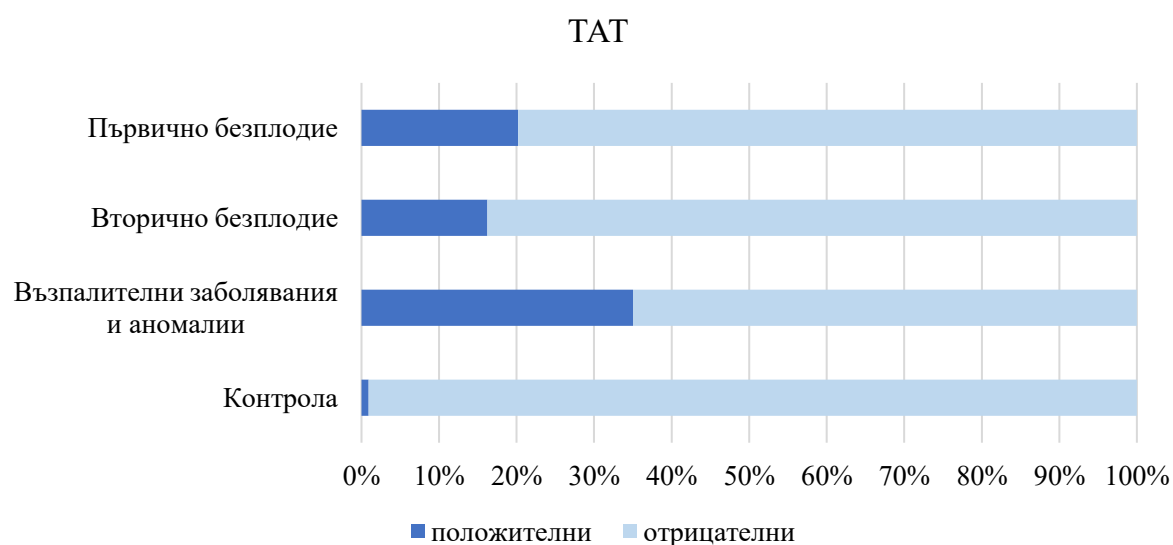
Фигура 12. Разпределение на пациентите по групи.

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

Резултатите са представени в **Таблица 7** и **Фигура 13**.

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

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



Фигура 13. Сравнение на относителната честота на положителни резултати при микроспермоаглутинационния тест на Friberg – TAT при трите групи пациенти ($P < 0,0001$).

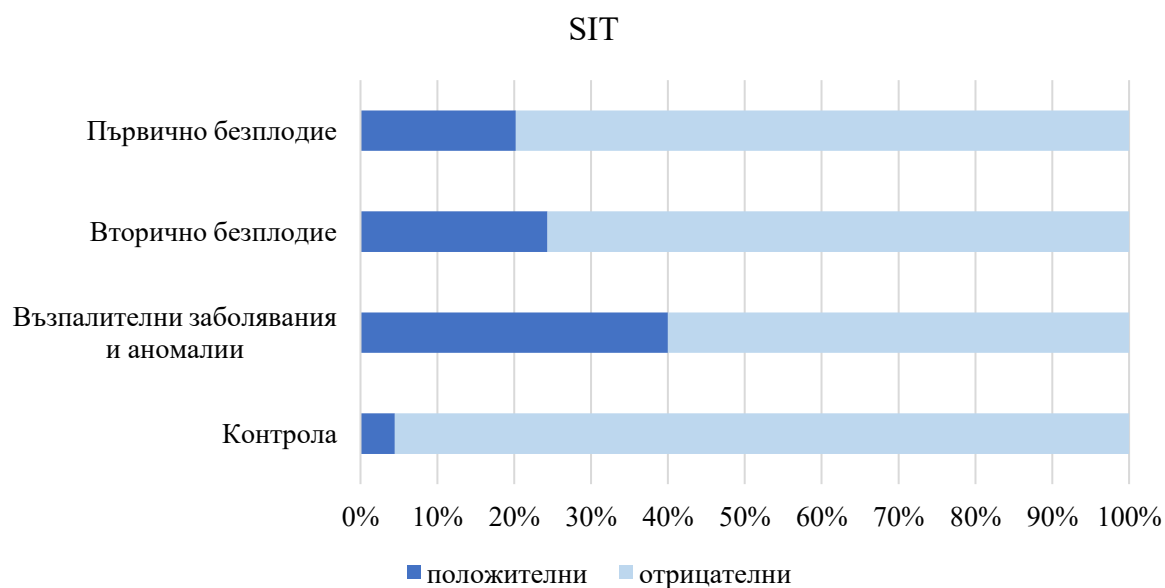
Резултатите показват по-висок процент на положително реагиращите серуми в третата група, т.е. пациентите с възпалителни заболявания и аномалии. Тестът на Фишер показва $P = 0,1203$, което означава, че при тази численост на изследваната популация пациенти разликата между третата група и всяка от другите две групи пациенти не е статистически значима.

При сравнение на честотата на положителните резултати при спермоимобилизационния метод на Isojima (SIT) беше установено, че и трите групи серуми дават статистически значима разлика с контролната група. Резултатите са представени в **Таблица 8** и **Фигура 14**.

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

Таблица 8. Сравнение на абсолютната и относителна честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода SIT

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



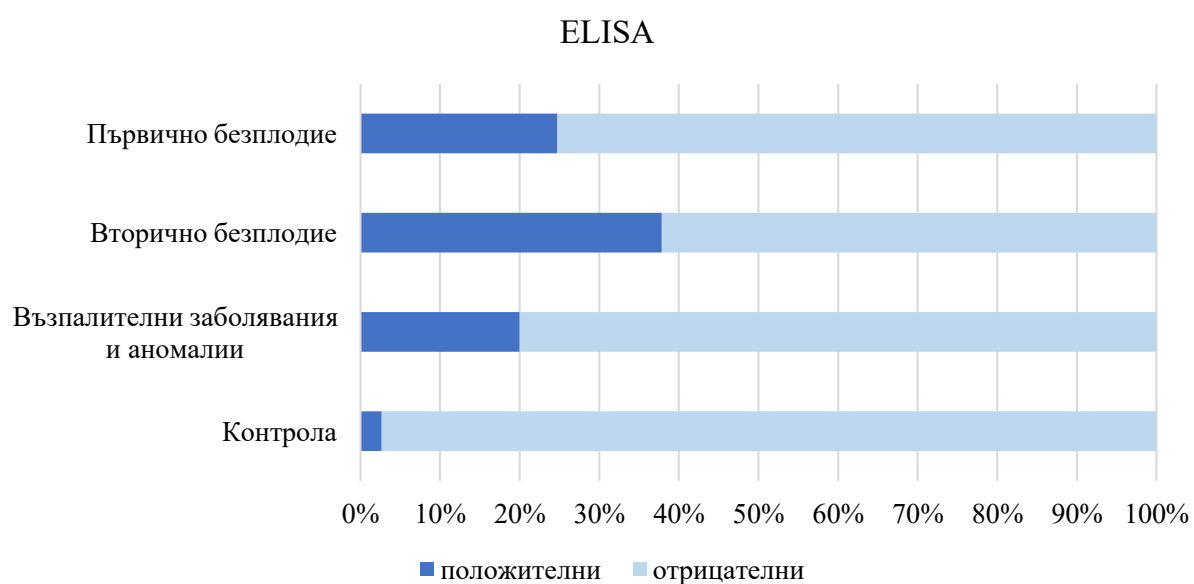
Фигура 14. Сравнение на относителната честота на положителни резултати при спермоимобилизационния тест на Isojima – SIT при трите групи пациенти ($P < 0,05$).

При сравнение на честотата на положителните резултати при използване на метода ELISA беше установено, че и трите групи серуми от пациенти, обособени според диагнозата им, дават статистически значима разлика с контролната група. Резултатите от това сравнение са представени в **Таблица 9** и **Фигура 15**.

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

Таблица 9. Сравнение на абсолютната и относителна честота на положителни резултати по групи според диагнозата на пациента при метода ELISA.

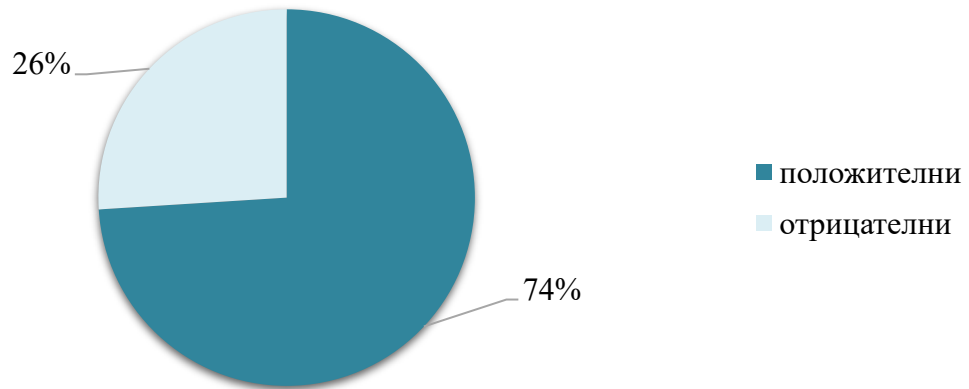
ELISA	Брой положителни	Процент положителни	Брой отрицателни	Процент отрицателни
Първично безплодие	24	24,74%	77	75,26 %
Вторично безплодие	14	37,84%	23	61,16%
Възпалителни заболявания и аномалии	8	40,00%	12	60,00%
Контролна група	3	2,68%	109	97,32%



Фигура 15. Сравнение на относителната честота на положителни резултати при трите групи според диагнозата на пациента при метода ELISA ($P < 0,05$).

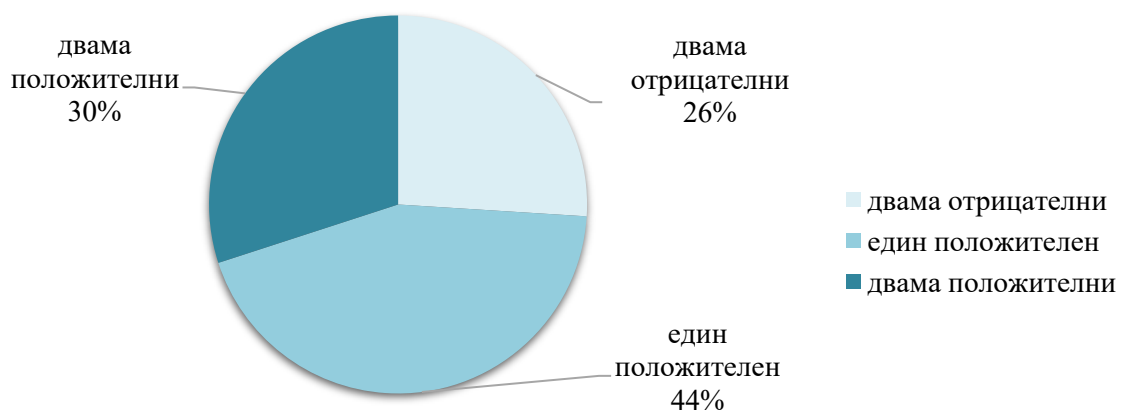
Изследваните 158 пациенти включват 73 семейни двойки и 12 души, които са се изследвали без партньорите си. Ако разгледаме резултатите от изследваните серуми, ще установим, че от общо 73 двойки, в 54 (74%) поне

единият партньор има клинично значими стойности на ASA по поне един от методите. Съотношението е представено на **Фигура 16**.



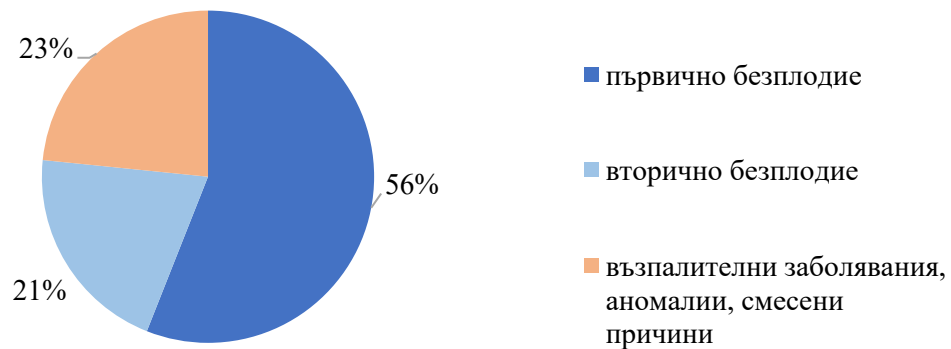
Фигура 16. Процентен дял на двойките, в които поне единият партньор показва резултати с клинично значими стойности на ASA.

Възникна въпросът в колко от двойките и двамата партньори показват положителни резултати по поне един от методите за изследване на ASA, и в колко положителен е само единият – в 32 (44%) от двойките положителни резултати има само единият партньор, а в 22 (30%) – и двамата партньори. Резултатите са отразени на **Фигура 17**.



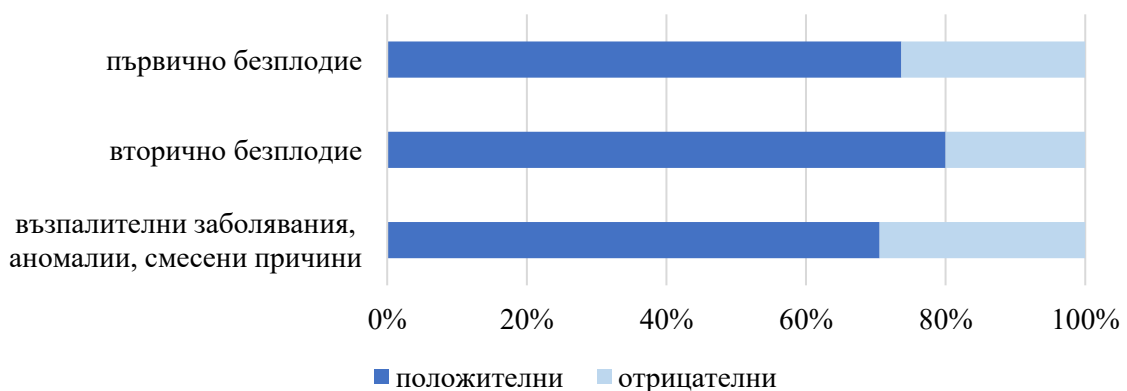
Фигура 17. Относителна честота на двойките, според това дали само при единият, или и при двамата партньори са регистрирани клинично значими стойности на ASA по поне един от използваните методи.

От 73 двойки, в 41 партньорите са с първичен стерилитет, в 15 двойки – с вторичен стерилитет и в 17 – със смесени причини за безплодие (възпалителни заболявания и аномалии у единия партньор или повече от една причина за репродуктивни неуспехи). Процентният дял на групите двойки е представен на **Фигура 18**.



Фигура 18. Процентен дял на двойките пациенти по групи според диагнозата.

При разделяне на двойките пациенти на групи според диагнозата се отчита, че при двойките с първичен стерилитет за 73,68% са регистрирани значими стойности на ASA по поне един от методите в единия партньор, а в някои двойки и в двамата. При пациентите с вторичен стерилитет процентният дял на двойките с положителни резултати за наличие на ASA достига 80%. В групата, в която единият от партньорите е прекарал възпалителни заболявания или има аномалии, свързани с репродуктивните функции, делът на двойките с клинично значими стойности на ASA е 70,56% (**Фигура 19**).



Фигура 19. Относителна честота на двойките, в които поне единият от двамата партньори показва положителни резултати при изследване на серум за ASA.

4.2. Резултати от цитогенетичните изследвания на пациенти с репродуктивни проблеми

Една от възможните причини за субфертилитет или стерилитет е присъствието на хромозомна мутация у един от партньорите. Например инверсии и транслокации могат да нарушат хода на мейозата и да доведат до повишаване на честотата на апоптоза на незрелите гамети, както и на образуване на анеуплоидни гамети, които при оплождане биха дали нежизнеспособни ембриони. Друга аномалия на кариотипа, която би могла да окаже негативно влияние върху фертилитета, е делецията на един или повече гени, важни за функциите на репродуктивната система и гаметогенезата, например определени локуси в Y-хромозомата.

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

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

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

Получените резултати са показани в **Таблица 10**.

Таблица 10. Резултати от цитогенетични изследвания на инфертилни пациенти. Положителните резултати за ASA са с тъмен шрифт и подчертани. Мъжете са означени с "m", жените – с "f". Диагнозите са поставени от лекуващите лекари, насочили пациентите за изследване.

Пациент	Години	Диагноза	TAT	SIT	ELISA	Кариотип
123, ж	40	Първично безплодие от 4 г.; PCOS	4 m	1,0000	0,8930	Нормален женски кариотип
124, м	32	Паротит (на 23 г.) 5% подвижни сперматозоиди	8 m	0,9873	0,9670	Нормален мъжки кариотип
125, ж	32	Вторично безплодие от 2 г.	16 m	1,8800	0,5865	Нормален женски кариотип
126, м	34	Вторично безплодие	2 m	<u>2,0400</u>	0,5335	Нормален мъжки кариотип
127, ж	43	Вторично безплодие от 3 г.	< 2	0,8571	0,83525	Нормален женски кариотип
128, м	34	Вторично безплодие	< 2	1,1027	<u>0,8873</u>	Нормален мъжки кариотип
129, ж	47	Първично безплодие от 21 г.	< 2	1,1807	0,7580	Нормален женски кариотип
130, м	49	Първично безплодие олигоспермия	< 2	1,1264	0,7425	Нормален мъжки кариотип
131, ж	42	Първично безплодие	< 2	1,2895	0,753	Нормален женски кариотип

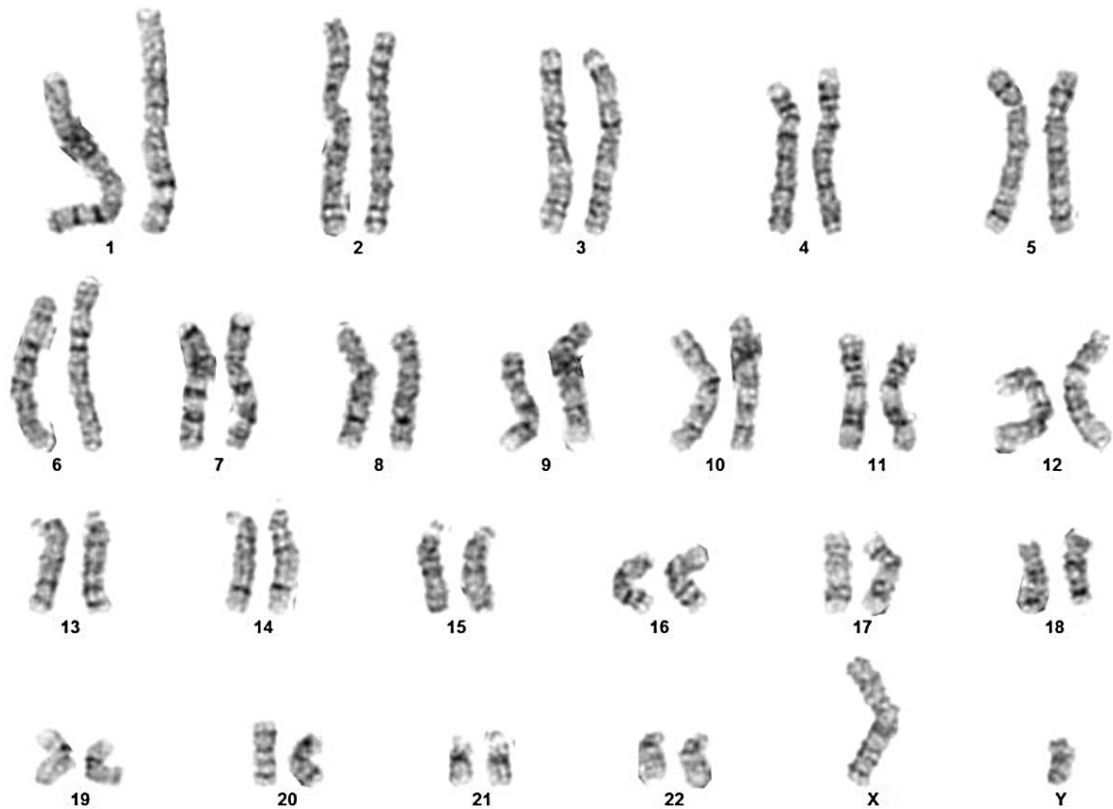
132, м	47	Първично безплодие нормозооспермия	< 2	1,1011	0,759	Нормален мъжки кариотип
133, ж	41	Вторично безплодие от 10 г., 4 спонтанни аборта	16 m	1,2100	0,8905	Нормален женски кариотип
134, м	48	Вторично безплодие нормозооспермия	8 m	1,5333	0,946	Нормален мъжки кариотип
135, ж	40	Вторично безплодие от 7 г.	8 m	<u>2,1818</u>	<u>0,968</u>	Нормален женски кариотип
136, м	38	Варикоцеле, един тестис	16 m	<u>2,0714</u>	0,9135	Нормален мъжки кариотип
137, ж	31	Първично безплодие от 6 г.; PCOS	32 m	<u>3,2917</u>	0,8925	Нормален женски кариотип
138, м	42	Първично безплодие нормозооспермия	64 m	1,0395	<u>0,945</u>	Нормален мъжки кариотип

От Таблица 10 се вижда, че според резултата от цитогенетичното изследване всички изследвани пациенти, независимо от резултата за наличие на ASA по трите основни метода, са с нормален кариотип. По анамнестични данни пациентите, на което не е направено кариотипиране, са изследвани цитогенетично в други лаборатории и резултатите също са показали нормален кариотип.

На **Фигури 20 и 21** са представени съответно метафазна пластинка и кариограма на пациент, показал положителни резултати при изследванията за ASA.



Фигура 20. Метафазна пластинка на един от пациентите с положителни резултати за ASA, избран на случаен принцип.



Фигура 21. Кариограма на пациент с висок титър на ASA, избран на случаен принцип. Цитогенетичното изследване показва нормален мъжки кариотип.

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

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

По отношение на нефосфорилираната форма на изследвания белтък (Hsp27) установихме силна експресия в миокарда (**Фигура 22А**) и скелетната мускулатура (**Фигура 22С**). Умерена до слаба цитоплазмена експресия на Hsp27 се наблюдаваше в центровете на осификация (**Фигура 22Е**), кожа – както епидермис, така и дерма (**Фигура 22G**), гладка мускулатура на чревната стена (**Фигура 22I**), чревен епител (**Фигура 22К**). Установихме слаба цитоплазмена експресия на Hsp27 в хепатоцитите (**Фигура 22М**), енцефалона (**Фигура 22О**) и медула спиналис.

По отношение на фосфорилираната форма на белтъка (pHsp27) регистрирахме силна експресия отново в миокарда (**Фигура 22В**) и скелетните мускули (**Фигура 22D**). Силна до умерена цитоплазмена експресия на pHsp27 се наблюдаваше в центровете на вкостяване (**Фигура 22F**). Слаба до умерена експресия се отчиташе в гладката чревна мускулатура (**Фигура 22J**). В същото време отрицателна имунохистохимична реакция за фосфорилираната форма на изследвания белтък се регистрираше в кожата (епидермис и дерма, **Фигура 21Н**), чревния епител (**Фигура 22L**), черния дроб (**Фигура 22N**) и енцефалона (**Фигура 22P**).

Ядрена експресия на Hsp27 и фосфорилиран Hsp27 беше регистрирана в единични клетки на центровете на вкостяване в развиващите се кости (**Фигура 22Е, F**).

В развиващите се гонади не беше установена цитоплазмена или ядрена експресия на Hsp27 (**Фигура 23 А**) и на фосфорилираната му форма (**Фигура 23 В**).

Резултатите са обобщени и представени в **Таблица 11**.

Таблица 11. Имунохистохимична оценка на цитоплазмената експресия на Hsp27 и фосфорилиран Hsp27 (pHsp27) в органи и тъкани на 8-седмичен човешки ембрион.

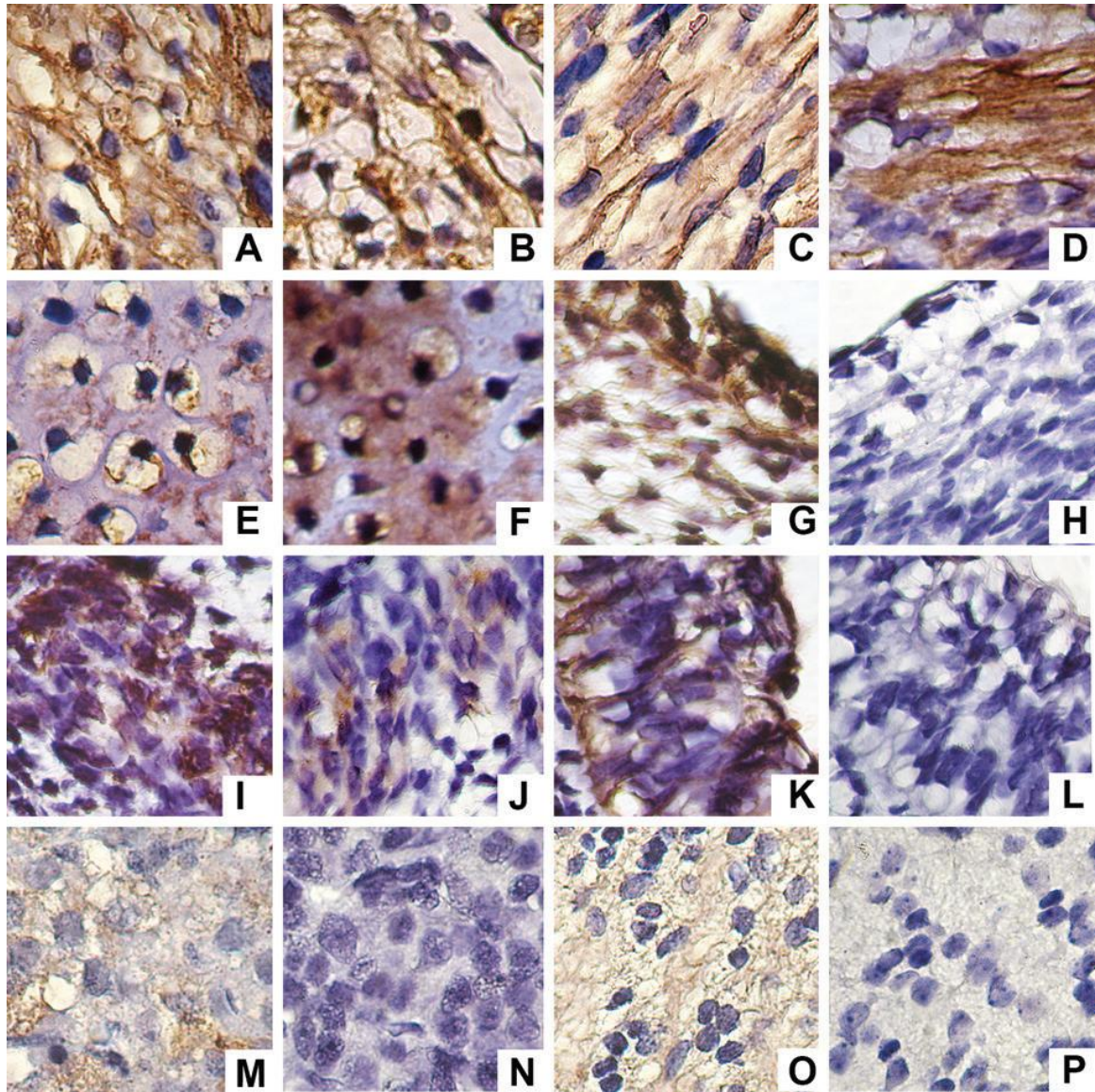
Тъкан	Hsp27	pHsp27
Скелетни мускули	+++	+++
Сърце – миокард	+++	+++
Кости / центрове на вкостяване	+	++
Гладка чревна мускулатура	+	+
Чревен епител	+	–
Мозък	+	–
Гръбначен мозък	+	–
Черен дроб	+	–
Кожа – епидермис и дерма	+	–
Хрущяли	–	–
Бял дроб	–	–
Бъбрек	–	–
Тимус	–	–
Назален епител	–	–
Надбъбречна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

+ слаба експресия

++ умерена експресия

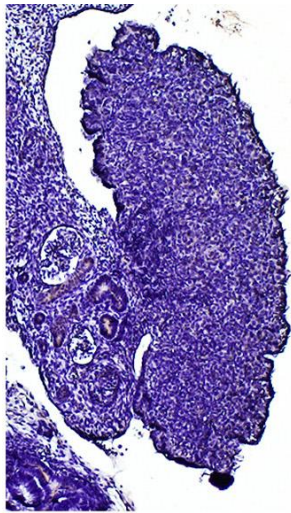
+++ силна експресия

– не се открива

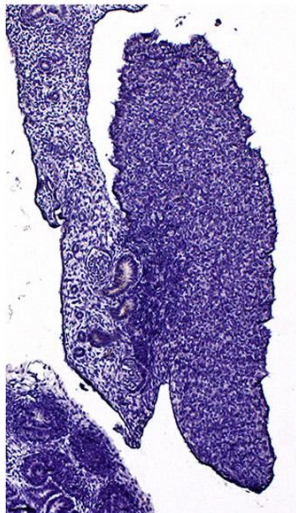
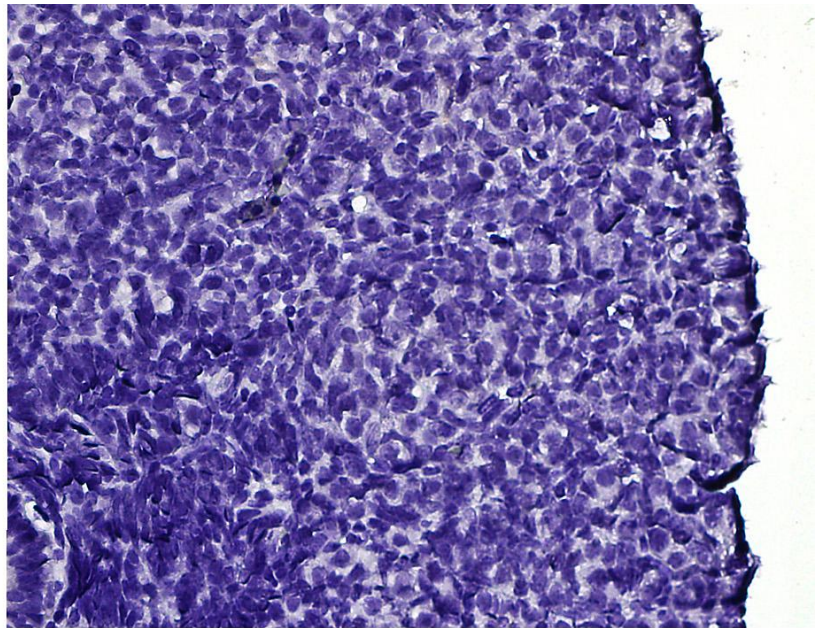


Фигура 22. Експресия на Hsp27 pHsp27 в ембрионални тъкани:

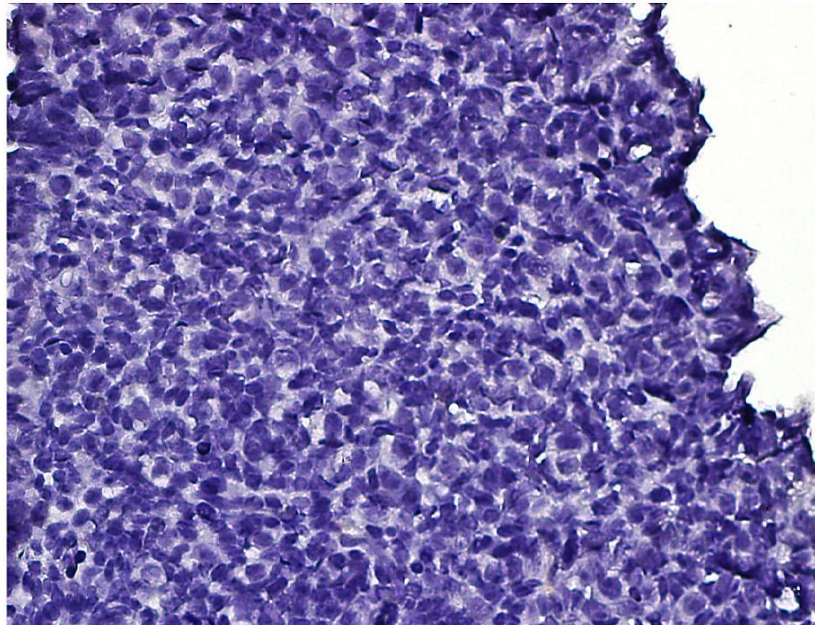
- A – силна експресия на Hsp27 в миокарда*
- B – силна експресия на pHsp27 в миокарда*
- C – силна експресия на Hsp27 в скелетни мускули*
- D – силна експресия на pHsp27 в скелетни мускули*
- E – умерена експресия на Hsp27 в центрове на вкостяване*
- F – умерена експресия на pHsp27 в центрове на вкостяване*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



A



B



Фигура 23. Реакция за нефосфорилираната и фосфорилираната форма на Hsp27 в срези от ембрионална гонада. Малките снимки показват целия срез панорамно на слабо увеличение, а основните снимки представят подробно хистологичната картина на органа при увеличение 640x, за да могат да се наблюдават особеностите на отделните клетки.

A. Отрицателна реакция за Hsp27 в гонада.

B. Отрицателна реакция за pHsp27 в гонада.

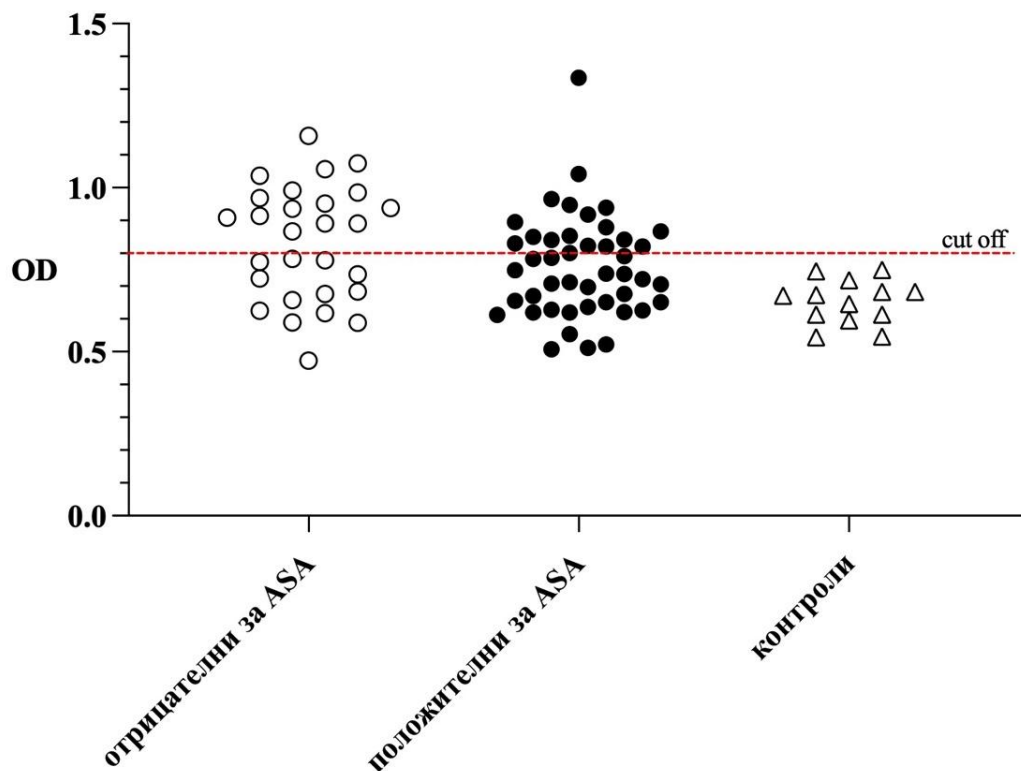
4.4. Проследяване на честотата на анти-Hsp27 антитела у пациенти с репродуктивни проблеми

Част от серумите от изследваната група пациенти с репродуктивни проблеми, които бяха тествани чрез гореописаните три метода за наличие на спермоантитела, бяха изследвани и за наличие на антитела срещу нискомолекулният стресов протеин Hsp27. Използваният метод за целта беше индиректна ELISA.

В това проучване бяха включени серуми на 73 пациенти с безплодие, от които 35 мъже и 38 жени във фертилна възраст. 48 от тях бяха партньорски двойки (24 двойки) и са изследвани заедно, а други 25 са изследвани без партньора си.

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

В контролната група бяха включени 13 здрави доброволци с доказана фертилност, с подобно съотношение между мъже и жени, и от същата възрастова група като изследваните пациенти. Всички лица от контролната група след изследването чрез ELISA показаха отрицателни резултати за наличие на анти-Hsp27 антитела, доколкото измерените за техните серуми стойности бяха групирани около средната и се отличаваха с ниска дисперсия. Конкретните резултати от теста са дадени на **Фигура 24**.



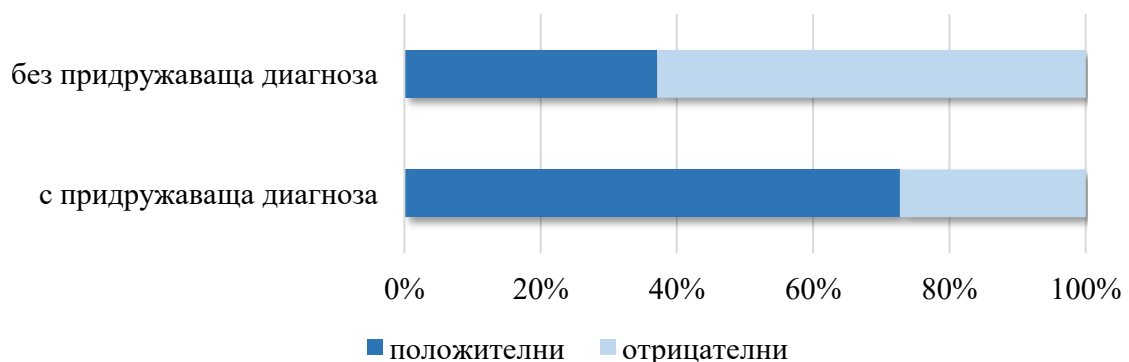
Фигура 24. Резултати от количественото определяне на анти-Hsp27 антитела в изследваните серуми. В бяло са означени пациентите, отрицателни за ASA, а в черно – пациентите, които имат положителни резултати при изследване на спермоантитела по поне един от трите метода (TAT, SIT или ELISA за ASA).

Следва да се отбележи, че от пациентите мъже с позитивен резултат за анти-Hsp27 антитела, петима имат придружаващи диагнози: 1 с варикоцеле, 1 с астенозооспермия и анамнеза за преболедуван вирусен паротит, 1 с олигоспермия, 1 с астенозооспермия, и 1 с варикоцеле, олигоспермия и анамнеза за преболедуван вирусен паротит едновременно. Двама от мъжете с негативен резултат са диагностицирани съответно с простатит (1) и с крипторхизъм (1). От жените-пациентки, положителни за анти-Hsp27 антитела, три имат съпътстващи диагнози: 2 са с PCOS и една е с ендометриоза. От пациентките, показали отрицателен резултат, една има ендометриоза. Данните са обобщени в **Таблица 12**.

Таблица 12. Възможна връзка между анти-Hsp27 антителата и придружаващите диагнози.

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

Обобщението на тези данни показва, че от пациентите без съпътстващи диагнози, положителни за анти-Hsp27 антитела, са 23 от общо 62 (37%), а от пациентите със съпътстващи диагнози – 8 от общо 11 (73%). Вижда се, че наличието на анти-Hsp27 антитела е по-вероятно при пациентите със съпътстващи диагнози, отколкото за тези без други диагнози (**Фигура 25**). Тази разлика е статистически значима ($p < 0,05$).



Фигура 25. Процентен дял на пациентите, показали позитивен резултат за анти-Hsp27 антитела, групирани според наличие на придружаваща диагноза.

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

Като се съпоставят резултатите от двете изследвания, се вижда, че от 73-та пациенти 14 (19%) са положителни за анти-Hsp27 антитела, 17 (23%) са положителни за двата вида антитела (ASA и анти-Hsp27) и съответно спадат и към двете групи, а у 13 (18%) не се откриват нито ASA, нито анти-Hsp27 антитела. Тези резултати са онагледени на **Фигура 26**.



Фигура 26. Процентен дял на пациентите, положителни за антиспермални и анти- Hsp27 антитела, и съпоставяне на резултатите от двете изследвания.

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

серума). След проведен корелационен анализ не беше установена значима корелация между наличието на ASA и на анти-Hsp27 антитела при изследваната група пациенти. Резултатите са обобщени в **Таблица 13**.

Таблица 13. Резултати от корелационен анализ за антиспермални и анти-Hsp27 антитела – корелационен коефициент на Spearman, показващ липса на корелация.

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

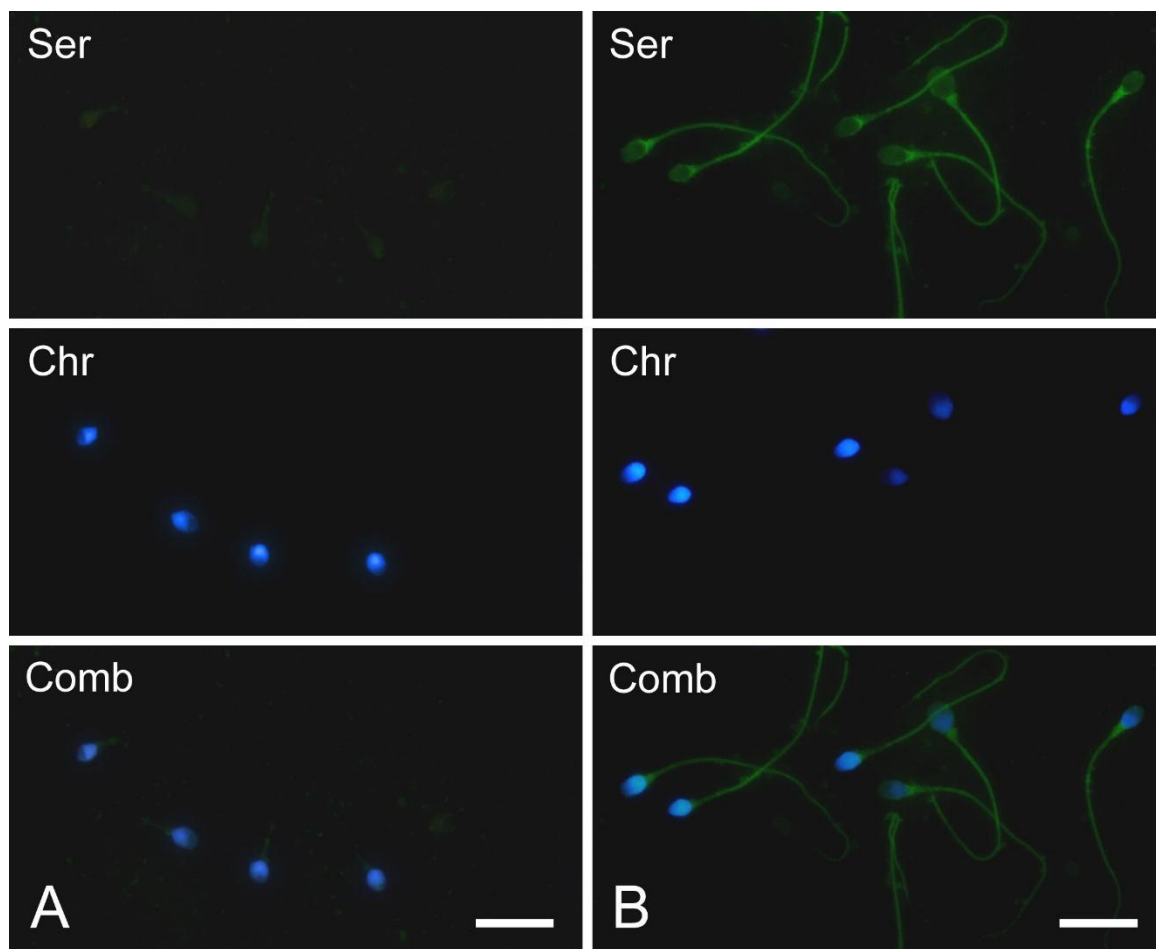
4.5. Изследване на серуми от пациенти с инфертилитет за реакция със сперматозоиди чрез имунофлуоресценция

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

Всички изследвани контролни серуми дадоха отрицателен резултат, пример за който е показан на **Фигура 27 А**. Серумите от пациенти, за които не бяха установени значими нива на антитела, както и серумите, оказали се положителни само за антитела срещу Hsp27, или не реагираха със сперматозоидите подобно на контролните серуми, или дадоха много слабо оцветяване.

Серумите от пациенти с безплодие, положителни за антиспермални антитела, независимо от съдържанието на анти-Hsp27 антитела, реагираха със сперматозоидната шийка, опашка или/и домен(и) от главата. Три от седемте

серума, положителни едновременно за двете категории антитела (ASA и анти-Hsp27), бяха използвани за имунофлуоресценция и всички те оцветиха шийката и опашката на сперматозоидите. Резултатът с един от тях е показан на **Фигура 27В**. Следва обаче да се отбележи, че и някои серуми от пациенти, положителни за ASA и отрицателни за анти-Hsp27, дадоха подобна реакция при имунофлуоресцентното изследване.



Фигура 27. Имунофлуоресцентна реакция на човешки сперматозоиди от здрав донор с човешки серуми като 1-во антитяло и FITC-белязано 2-ро антитяло (**Ser**), оцветяване на ядрата им с Hoechst 33342 (**Chr**) и съчетание от двата образа (**Comb**).

A. Отрицателен резултат, получен с контролен серум.

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

Отсечките са по 10 μm .

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

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

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

Разликата между двете групи пациенти не беше значима.

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Антиспермални антитела у пациенти с репродуктивни проблеми

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

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

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

В литературата данните за разлики между двата пола по отношение на образуването на спермоантитела са оскъдни и сравнението се затруднява допълнително от факта, че за отчитане на ASA при мъже и при жени обикновено се използват различни методи. Изглежда обаче, че ако съществуват разлики, те са минимални (Shibahara et al., 2022). В настоящата работа серумите от пациенти от двата пола бяха подложени на еднакви тестове за отчитане на спермоантитела. По отношение на TAT и SIT установените разлики бяха незначителни. При изследването чрез ELISA делът на положителните серуми при жените (30,70%) беше с близо 10% по-висок от

този при мъжете (24,10%). Но макар че този факт сам по себе си е интересен и очертава насоки за бъдещи проучвания, поради сравнително неголемия брой изследвани от нас пациенти (75 жени и 83 мъже) отчетената разлика не беше статистически значима.

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

Следва да се отбележи, че макар процентът положителни за ASA серуми, установени чрез всеки отделен метод, за всяка отделна група пациенти да беше под 50%, при разглеждане на пациентите по двойки процентът положителни серуми по поне един от трите метода при поне единия от двамата партньори надхвърляше 70%, а в групата с вторичен стерилитет достигаше 80%. Този резултат показва тясна връзка между проблемите със стерилитета и наличието

на спермоантитела в серума и позволява да се предположи причинна роля на спермоантителата поне при част от пациентите. При тълкуването на находките обаче е нужна предпазливост и следва да се има предвид възможността ASA в много случаи да са последица от някакво основно нарушение и да са не причина, а показател за нарушената оплодителна способност на сперматозоидите.

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

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

Следва да се очаква антителата срещу антигени с различна локализация в клетката да се различават по своя имунологичен подтекст и значимост. Само

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

От друга страна, хуморалният имунен отговор срещу вътреклетъчни сперматозоидни антигени най-вероятно е страничен резултат от смърт на голям брой сперматозоиди или (в мъжкия организъм) по-ранни сперматогенни клетки, дължаща се на други, в общия случай неизвестни фактори. Следователно спермоантителата срещу вътреклетъчни антигени, особено при липса (или по-точно подпрагово съдържание) на спермоантитела срещу повърхностни антигени, следва да се разглеждат не толкова като вреден фактор сами по себе си, а по-скоро като показател за наличие на друг патологичен процес, увреждащ мъжките гамети и освобождаващ вътреклетъчното им съдържимо.

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

5.2. Цитогенетична характеристика на изследваната група пациенти с репродуктивни проблеми

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

За да проверим тази хипотеза, предприехме цитогенетичен анализ на част от изследваните пациенти – 16 души (8 мъже и 8 жени). Получените кариограми обаче независимо от наличието и нивата на ASA показаха липса на видими аномалии на кариотипа. Следователно структурни хромозомни аномалии, достатъчно големи, за да бъдат установени чрез класическо кариотипиране, не са редовна находка при пациенти с инфертилитет и ASA. На теория би могло да се допусне, че при някои мъже хромозомни аномалии водят до повишени нива на клетъчна смърт в тестиса, в резултат на което да се образуват спермоантитела. Проверката на тази хипотеза обаче би изисквала различна експериментална постановка, а именно изследване за ASA на мъже с известни кариотипни вариации.

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

инфертилитета, а не само като отражение и показател на друг патологичен процес.

5.3. Експресия и локализация на Hsp27 в човешки ембрионални тъкани

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

Както беше изтъкнато по-горе, функциите на стресовите белтъци не са свързани само със защита от стресови фактори. Със своето участие в процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и миграция те играят в ембрионалното развитие на бозайниците важна роля, която позволява да бъдат разглеждани като модулатори на ембриогенезата. Това им участие обаче все още не е напълно изяснено (Christians et al., 2003). Разкриването на функциите им изисква уточняване на тяхната експресия в развиващия се ембрион по време и място. Конкретно за Hsp27 има данни, че чрез антиапоптозното си действие значително допринася за пролиферацията и диференциацията по време на ембрионалното развитие (Garrido et al., 2006).

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

мускулните влакна на този етап от ембрионалното развитие и подготовката им за осъществяване на двигателна активност.

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

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

Ако настоящото изследване беше посветено на имунния отговор срещу някой от специфичните за тестиса нискомолекулни стресови протеини (Hsp9 и Hsp10), твърде ниската или липсваща експресия в тестиса по време на зародишното и феталното развитие би могла да се разглежда като фактор,

който заедно с имунологичната изолация на тестиса пречи на имунната система да „опознае” антигена като собствен и допринася за нарушаването на имунната толерантност и възникването на автоимунен отговор срещу него. Hsp27 обаче за разлика от тези свои хомолози не е тестис-специфичен протеин – той се експресира в набор от тъкани и съдържанието му е най-високо в мускулните клетки. Следователно, дори да се появява в тестиса едва след настъпването на полова зрялост, спрямо него трябва да има изградена имунна толерантност, тъй като имунната система е имала други възможности да се запознае с него. Ако определена категория пациенти с инфертилитет образуват антитела срещу Hsp27, за тази автоимунна реакция следва да се търсят причини, различни от имунологичната изолация.

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

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

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

Доколкото ни е известно, преди настоящия труд анти-Hsp27 антителата при инфертилитет не са изследвани. Различни колективи обаче са установили такива антитела при редица други състояния. Малко количество „естествени“ анти-Hsp27 антитела се откриват в серуми на здрави хора. Повишаване на концентрацията им в серума, както и на съдържанието на самия Hsp27, е отчетено при пациенти с ракови заболявания. Авторите го обясняват с усиляване на експресията на този стресов белтък в туморните клетки поради предимството, което им осигурява анти-апоптозното му действие (Homaei-Shandiz et al., 2016). Неотдавна е установено повишено съдържание на анти-Hsp27 антитела при пациентки с тумори, засягащи отдели на женската репродуктивна система – ендометриума и цервикса (Bodzek et al., 2021). Подобно повишаване на серумните нива както на Hsp27, така и на антителата срещу него е установено при глаукома. Нещо повече, имунизацията на гризачи с Hsp27 води до промени в очите им, наподобяващи глаукома (Grotegut et al., 2020). Повишени титри на анти-Hsp27 антитела са измерени и при лица, страдащи от затлъстяване (Kargari et al., 2017). Освен това се съобщава, че тези антитела се повишават успоредно с възрастта и кръвното налягане (Shams et al., 2008) и са в увеличено количество при пациенти с остър коронарен синдром (Ghayour-Mobarhan et al., 2008). Други автори обаче парадоксално откриват по-ниски нива на Hsp27 и антитела срещу него при пациенти със сърдечно-съдови заболявания в сравнение със здравите контроли. Предложеното обяснение за това явление е, че анти-Hsp27 антителата имат

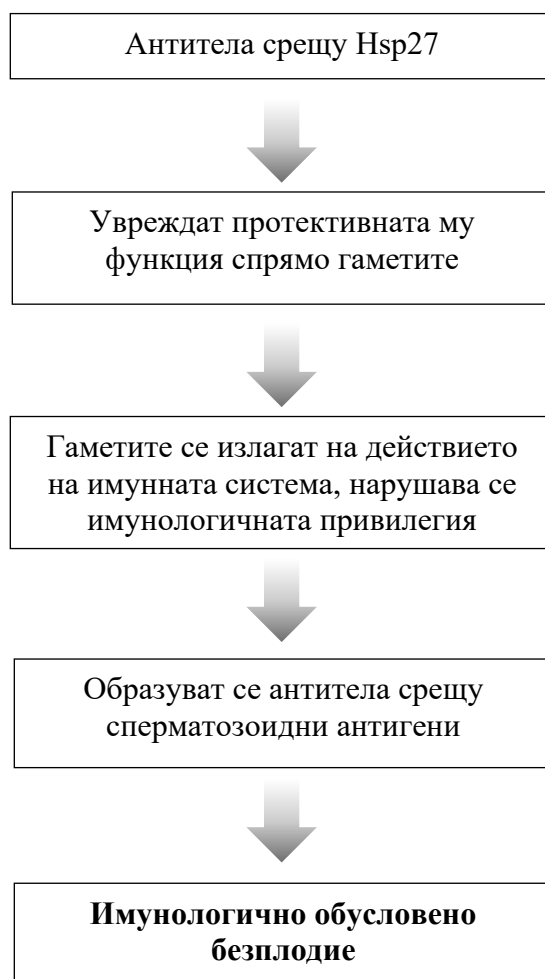
предпазващ ефект срещу възпаление и образуване на плаки. Тази своя хипотеза, основана на данни от изследвания на пациенти и здрави контроли, авторите проверяват експериментално в съответно разработен миши модел (Raizman et al., 2013; Shi et al., 2020).

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

Описаната работна хипотеза е представена схематично на **Фигура 28** като поредица от предполагаеми причинно-следствени връзки, чието осъществяване би могло да доведе до имунологично обусловено безплодие.

От друга страна, можем да предположим, че инфертилитетът е свързан с гонаден стрес, който води, първо, до повишена експресия на Hsp27 в незрелите гамети и соматичните клетки на гонадите, и второ, до повишени нива на клетъчна смърт на тези Hsp27-положителни клетки, което освобождава Hsp27

в телесните течности и води до производство на антитела срещу него. С оглед на тази възможност е интересно неотдавнашното съобщение на Henriques et al. (2023) за наличие на Hsp27 в сперматозоиди на пушачи. Възможно е също така инфертилитетът при голяма част от пациентите да е свързан със стресови фактори, които да не са ограничени в гонадите, а да засягат организма като цяло и съответно да повишават експресията на стресови белтъци в различни тъкани. Тези явления обаче излизат извън рамките на настоящия труд и тяхното изясняване следва да бъде предмет на по-обширни бъдещи изследвания.



Фигура 28. Работна хипотеза за ролята на анти-Hsp27 антителата в етиопатогенезата на имунологично обусловеното безплодие.

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

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

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

антителата срещу него не се очаква да навредят на сперматогенните клетки и следва да се разглеждат не като причина за инфертилитета, а по-скоро като негова последица – резултат от мащабна смърт на сперматиди или сперматозоиди, освободила антигените им.

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

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

Възможно е и друго обяснение за реакцията на серумите, положителни едновременно за ASA и анти-Hsp27, с тубулин-съдържащите домени на сперматозоида – шийката и опашката. Както беше споменато в литературния обзор, нискомолекулните стресови белтъци при други клетки имат функцията да се свързват с микротубулите и да предпазват тубулина от денатурация (Day et al., 2003). Това обяснение обаче ни се струва по-малко вероятно с оглед на постепенното намаляване на Hsp27 с напредване на сперматогенезата, така че в нормални зрели сперматозоиди наличието му не може да бъде установено с обичаните методи (Adly et al., 2008).

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

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

Повишените нива на антитела срещу Hsp27 биха могли да отразяват усилена експресия на белтъка в условия на стрес с последващото му освобождаване в извънклетъчна среда в резултат на смъртта на синтезиращите го клетки. Инфекциите и възпалителните реакции са стресови фактори, способни да задействат такава верига от събития. Очаква се при инфекция синтезът на Hsp27 в неутрофилите да се засили, тъй като той е нужен за активацията им, има антиапоптозно действие и регулира хемотаксиса и екзоцитозата им (Rane et al., 2003; Jog et al., 2007). В случай на инфекциозно заболяване възниква възпалителна реакция и се отделя IL-1, който активира неутрофилите и ги привлича към мястото на възпаление. Тъй като активирането им е свързано с експресия на Hsp27, вътреклетъчното му съдържание се повишава. Доколкото неутрофилите са крайно диференцирани клетки с къс живот, не след дълго те загиват и Hsp27 се освобождава. Повишеното му количество в извънклетъчните течности може да предизвика

образуване на антитела срещу него. По-горе бяха цитирани литературни данни, че при други състояния се наблюдава корелация между серумните нива на анти-Hsp27 антителата и на самия Hsp27 (Grotegut et al., 2020; Shi et al., 2020), което позволява да се предположи, че тези антитела корелират с достъпното за имунната система количество на самия антиген (т.е. Hsp27). Следователно значимите нива на анти-Hsp27 антителата в серума биха могли да бъдат показател за активирано състояние на неутрофилите, свързано с инфекция или/и възпаление.

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

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

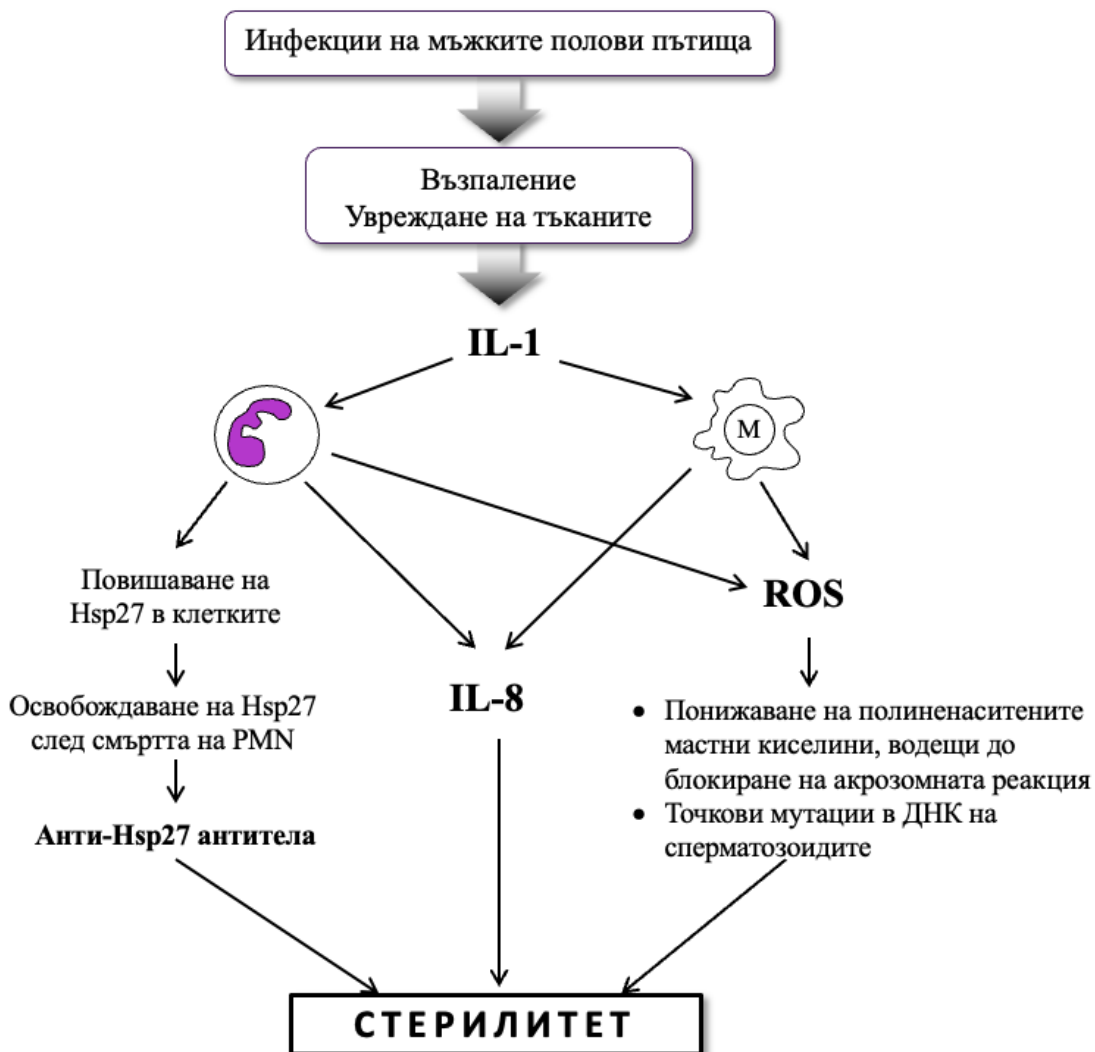
При нормални обстоятелства, съществува равновесие между генерираните свободни кислородни радикали и антиоксидантите. Сперматозоидите разполагат със сложна ензимна система за антиоксидантна защита, основана на пентозофосфатния път, глутатион-редуктазата и глутатион-пероксидазата (Williams et al., 2004). В случаите на инфекция и активиране на левкоцитите обаче количеството на ROS се увеличава до степен

повече да не може да бъде контролирано от антиоксидантите в секретираниите флуиди. Мембраната на сперматозоида е богата на полиненаситени мастни киселини. Това е необходимо за двигателната му способност, осъществяването на акрозомна реакция и сливането му с мембраната на яйцеклетката, но в същото време прави мембраната твърде уязвима за ROS. Като предизвикват промени в химичния състав на мембраните, свободните кислородни радикали възпрепятстват процесите на мембранна фузия при оплождането.

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

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

Фигура 29 показва как гореописаната предполагаема верига от събития може да доведе до увреждания на сперматогенните клетки и зрелите сперматозоиди в мъжкия индивид и така да доведе до стерилитет. В женския организъм по подобен начин биха могли да бъдат увредени овоцитите и ембрионите, както и сперматозоидите по време на придвижването им в женските полови пътища и капацитацията.



Фигура 29. Участие на неутрофилите в механизма на индуциране на инфертилитет при инфекции на мъжкия генитален тракт. PMN – полиморфонуклеарен неутрофил, M – макрофаг, ROS – свободни кислородни радикали, IL-1, IL-8 – интерлевкини. По Comhaire et al. (1999) с изменения.

За да проверим някои предпоставки за гореописания модел, ние изследвахме неутрофили от пациенти със заболявания, несвързани с инфертилитета, чрез хемилуминесценция, както е описано в Lazarov et al. (2016). Използваният метод оценява функционалното състояние на неутрофилите по количеството образувани в тях свободни кислородни радикали (ROS). Резултатите показаха активирано състояние на по-голямата част от неутрофилите при пациенти с инфекциозни и дори с неинфекциозни

(ракови) заболявания. Тези активирани неутрофили произвеждаха ROS и следователно имаха потенциал за увреждане на нормалните клетки. С оглед на тези резултати описаният хипотетичен модел, предполагащ ключова роля на неутрофилите за патогенезата на инфертилитета, особено при положителни за анти-Hsp27 пациенти, изглежда не само интересен, а и твърде вероятен.

6. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводи

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

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

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

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

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

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

Приноси

Принос с потвърдителен характер:

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

Приноси с научно-теоретичен характер:

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

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

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

7. БИБЛИОГРАФИЯ НА ИЗПОЛЗВАНАТА ЛИТЕРАТУРА

- Бътева-Христова, И.Н. (2014). Експресия и значение на нискомолекулни стресови протеини за репродукцията при експериментален модел мишка и човек, дисертационен труд, София, Медицински университет - София.
- Вангелов, И. (2016) Антиовариални антитела и инфертилитет, дисертационен труд, София, Институт по имунология и биология на размножаването.
- Димитрова-Диканарова, Д.К. (1989) Характеристика на сперматозоидо-обличащи антигени, идентифицирани чрез моноклонални антитела. Автореферат на канд. дисертация., София.
- Димитрова Д., Св. Калайджиев, Л. Наков (2001). Роля на спермоантителата в индуцирането на имунологично обусловено безплодие при човека. *Акушерство и гинекология*. 2:34-38.
- Димитрова Д., Л. Наков, (2002) Имунологично обусловено безплодие при човека, предизвикано от спермоантитела. *Репродуктивно здраве*, бр. 3, 16-20.
- Запрянова С, (2017). Роля на протеините на топлинния стрес в процесите на сперматогенеза и апоптоза, дисертация за присъждане на образователна и научна степен “доктор”, БАН, ИБИР, София
- Инглизова-Пенчева Г (2016). Биологични аспекти и прогностични критерии за оценка на овоцити и предимплантационни ембриони при пациентки с намален овариален резерв, дисертация за присъждане на образователна и научна степен “доктор”, МУ – Варна
- Трифонова, Н., J. Bours (2000). Онтогенеза на очната леща. Поява на кристалините през ембрионалния период на гръбначните животни. *Български офталмологичен преглед*, 1, 51-56.
- Adly, M. A., Assaf, H. A., & Hussein, M. R. A. (2008). Heat shock protein 27 expression in the human testis showing normal and abnormal spermatogenesis. *Cell Biology International*, 32(10), 1247–1255. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.009>
- Ahmad, K., & Naz, R. K. (1992). Effects of human antisperm antibodies on development of preimplantation embryos. *Archives of Andrology*, 29(1), 9–20. <https://doi.org/10.3109/01485019208987704>
- Aitken, R. J., & Lewis, S. E. M. (2023). DNA damage in testicular germ cells and spermatozoa. When and how is it induced? How should we measure it? What

- does it mean? *Andrology*, 11(8), 1545–1557.
<https://doi.org/10.1111/andr.13375>
- Alexander, N. J., & Anderson, D. J. (1979). Vasectomy: Consequences of autoimmunity to sperm antigens. *Fertility and Sterility*, 32(3), 253–260.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)44228-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)44228-7)
- Al-Fahham, A. A. (2018). Etiology of antisperm antibodies in the serum of virgins. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 08(03), 236–245.
<https://doi.org/10.4236/ojog.2018.83025>
- Ambrosio, L., & Schedl, P. (1984). Gene expression during *Drosophila melanogaster* oogenesis: Analysis by in situ hybridization to tissue sections. *Developmental Biology*, 105(1), 80–92. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(84\)90263-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90263-x)
- Anderson, D. J., Politch, J. A., Cone, R. A., Zeitlin, L., Lai, S. K., Santangelo, P. J., Moench, T. R., & Whaley, K. J. (2020). Engineering monoclonal antibody-based contraception and multipurpose prevention technologies†. *Biology of Reproduction*, 103(2), 275–285. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa096>
- Andley, U., Song, Z., Wawrousek, E., Brady, J., Bassnett, S., & Fleming, T. (2001). Lens epithelial cells derived from α B-crystallin knockout mice demonstrate hyperproliferation and genomic instability. *The FASEB Journal*, 15(1), 221–229. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0296com>
- Ansbacher, R. (1973). Vasectomy: sperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 24(10), 788–792. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)39974-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)39974-5)
- Arrigo, A., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Viot, S., Javouhey, E., Mounier, N., & Diaz-Latoud, C. (2002). Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced independently of reactive oxygen species. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 185–204. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_10
- Arrigo, A., Paul, C., Ducasse, C., Sauvageot, O., & Kretz-Remy, C. (2002). Small stress proteins: modulation of intracellular redox state and protection against oxidative stress. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 171–184. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_9
- Arrigo, A., Simon, S., Gibert, B., Kretz-Remy, C., Nivon, M., Czekalla, A., Guillet, D., Moulin, M., Diaz-Latoud, C., & Vicart, P. (2007). Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters*, 581(19), 3665–3674. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.033>
- Ashitaka, Y., Isojima, S., & Ukita, H. (1964). Mechanism of experimental sterility induced in guinea pigs by injection of homologous testis and sperm. *Fertility and Sterility*, 15(2), 213–221. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)35170-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)35170-6)

- Baker, M. A. (2015). Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell and Tissue Research*, 363(1), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2249-x>
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., & Rao, C. M. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>
- Baldeon-Vaca, G., Marathe, J. G., Politch, J. A., Mausser, E., Pudney, J., Doud, J., Nador, E., Zeitlin, L., Pauly, M., Moench, T. R., Brennan, M., Whaley, K. J., & Anderson, D. J. (2021). Production and Characterization of a Human Antisperm Monoclonal Antibody Against CD52g for Topical Contraception in Women. *EBioMedicine*, 69, 103478. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103478>
- Baskin, M. (1932). Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa. A preliminary report. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 24(6), 892–897. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(32\)91129-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(32)91129-6)
- Batulan, Z., Venu, V. K. P., Li, Y., Koumbadinga, G., Alvarez-Olmedo, D. G., Shi, C., & O'Brien, E. R. (2016). Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27: Role in Modifying Vascular Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00285>
- Baumgartner, A. P., & Chrisman, C. L. (1981). Ovum morphology after hyperthermic stress during meiotic maturation and ovulation in the mouse. *Reproduction*, 61(1), 91–96. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0610091>
- Bausero, M. A., Page, D. T., Osinaga, E., & Asea, A. (2004). Surface expression of HSP25 and HSP72 differentially regulates tumor growth and metastasis. *Tumor Biology*, 25(5–6), 243–251. <https://doi.org/10.1159/000081387>
- Betsou, F., Borrego, M. J., Guillaume, N., Catry, M. A., RomãO, S., Machado-Caetano, J. A., Sueur, J. M., Mention, J., Faille, N., & Orfila, J. (2003). Cross-Reactivity between Chlamydia trachomatis Heat Shock Protein 10 and Early Pregnancy Factor. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(3), 446–450. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.3.446-450.2003>
- Biggiogera, M., Tanguay, R. M., Marin, R., Wu, Y., Martin, T. E., & Fakan, S. (1996). Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Experimental Cell Research*, 229(1), 77–85. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0345>
- Bodzek, P., Szymala, B., Damasiewicz-Bodzek, A., Janosz, I., Witek, L., & Olejek, A. (2021). Are IgG antibodies to heat shock proteins HSP27 and HSP60 useful markers in endometrial cancer and cervical cancer? *Ginekologia Polska*, 92(11), 760–766. <https://doi.org/10.5603/gp.a2021.0060>

- Bohring, C., & Krause, W. (2003). Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity: The value of proteomic analysis. *Human Reproduction*, 18(5), 915–924. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg207>
- Bohring, C., Skrzypek, J., & Krause, W. (2001). Influence of antisperm antibodies on the acrosome reaction as determined by flow cytometry. *Fertility and Sterility*, 76(2), 275–280. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)01924-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)01924-0)
- Boursier, A., Dumont, A., Boitrelle, F., Prasivoravong, J., Lefebvre-Khalil, V., Robin, G., & Barbotin, A. (2022). Necrozoospermia: The tree that hides the forest. *Andrology*, 10(4), 642–659. <https://doi.org/10.1111/andr.13172>
- Bova, M. P., Mchaourab, H. S., Han, Y., & Fung, B. K. (2000). Subunit exchange of small heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1035–1042. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1035>
- Branigan, E. F., & Muller, C. H. (1994). Efficacy of treatment and recurrence rate of leukocytospermia in infertile men with prostatitis. *Fertil Steril*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7520396/>
- Brazdova, A. (2014). *Study of immunological properties of sperm and seminal plasma antigens : anti-seminal and anti-sperm antibodies in female immune infertility : characterization of targeted proteins*. <https://theses.hal.science/tel-01037941>
- Brazdova, A., Senechal, H., Peltre, G., & Poncet, P. (2016). Immune aspects of female infertility. *PubMed*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4762>
- Brazdova, A., Vermachova, M., Zidkova, J., Ulcova-Gallova, Z., & Peltre, G. (2013). Immunodominant semen proteins I: New patterns of sperm proteins related to female immune infertility. *Open Life Sciences*, 8(9), 813–818. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0214-9>
- Brázdová, A., Zídková, J., Peltre, G., & Ulčová-Gallová, Z. (2012). IgG, IgA and IgE Reactivities to Sperm Antigens in Infertile Women. *Jordan J Biol Sci*, 5(2), 85–89. <https://jjbs.hu.edu.jo/files/v5n2/Paper%20Number%201-mod.pdf>
- Brewis, I. A., & Gadella, B. M. (2009). Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Molecular Human Reproduction*, 16(2), 68–79. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap077>
- Bronson, R. A. (2000). Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *Journal of Reproductive Immunology*, 45(2), 159–183. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(99\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(99)00044-3)
- Bronson, R. A., Cooper, G. W., & Rosenfeld, D. L. (1982). Sperm-specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human sperm to the

- human zona pellucida. *Fertility and Sterility*, 38(6), 724–729. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46701-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46701-4)
- Brown, D. D., Christine, K. S., Showell, C., & Conlon, F. L. (2007). Small heat shock protein Hsp27 is required for proper heart tube formation. *Genesis*, 45(11), 667–678. <https://doi.org/10.1002/dvg.20340>
- 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), 285–292.
- Cai, L., Ma, X., Liu, S., Liu, J., Wang, W., Cui, Y., Ding, W., Mao, Y., Chen, H., Huang, J., Zhou, Z., & Liu, J. (2013). Effects of Upregulation of Hsp27 Expression on Oocyte Development and Maturation Derived From Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS ONE*, 8(12), e83402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083402>
- Candido, E. P. M. (2002). The Small Heat Shock Proteins of the Nematode *Caenorhabditis elegans*: Structure, Regulation and Biology. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 61–78. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_4
- Caplan, A. J., Cyr, D. M., & Douglas, M. G. (1993). Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 4(6), 555–563. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.6.555>
- Carra, S., Alberti, S., Arrigo, P. A., Benesch, J. L., Benjamin, I. J., Boelens, W., Bartelt-Kirbach, B., Brundel, B. J., Buchner, J., Bukau, B., Carver, J. A., Ecroyd, H., Emanuelsson, C., Finet, S., Golenhofen, N., Goloubinoff, P., Gusev, N., Haslbeck, M., Hightower, L. E., . . . Tanguay, R. M. (2017). The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell Stress and Chaperones*, 22(4), 601–611. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>
- Carver, J. (1999). Probing the structure and interactions of crystallin proteins by NMR spectroscopy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(4), 431–462. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(98\)00027-5](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(98)00027-5)
- Charette, S. J., & Landry, J. (2000). The Interaction of HSP27 with Daxx Identifies a Potential Regulatory Role of HSP27 in Fas-Induced Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926(1), 126–131. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05606.x>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). The Blood-Testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Chiu, M. H., Shi, C., Rosin, M., Batulan, Z., & O'Brien, E. R. (2019). Biophysical Analyses and Functional Implications of the Interaction Between Heat Shock

- Protein 27 and Antibodies to HSP27. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(10), 1536–1546. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.05.016>
- Choi, I., Lee, J., Fisher, P., & Campbell, K. H. (2010). Caffeine treatment of ovine cytoplasts regulates gene expression and foetal development of embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 77(10), 876–887. <https://doi.org/10.1002/mrd.21230>
- Chowdhury, T. A., & Chowdhury, T. S. (2009). An overview of infertility. *The ORION Medical Journal*, 32(1), 610–611.
- Christians, E., Campion, E., Thompson, E. M., & Renard, J. (1995). Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development*, 121(1), 113–122. <https://doi.org/10.1242/dev.121.1.113>
- Christians, E. S., Zhou, Q., Renard, J., & Benjamin, I. J. (2003). Heat shock proteins in mammalian development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 14(5), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2003.09.021>
- Comhaire, F. (1999). Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Human Reproduction Update*, 5(5), 393–398. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.5.393>
- Comhaire, F. H. (1988). Varicocele and its treatment. In *Springer eBooks* (pp. 49–57). https://doi.org/10.1007/978-94-009-1237-3_5
- Comhaire, F. H., & Mahmoud, A. (2013). An update on treatments and interventions for male infertility, and the role of nutraceutical food supplementation. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.6000/1927-5951.2012.03.01.1>
- Cristofani, R., Piccolella, M., Crippa, V., Tedesco, B., Marelli, M. M., Poletti, A., & Moretti, R. M. (2021). The role of HSPB8, a component of the Chaperone-Assisted selective autophagy machinery, in cancer. *Cells*, 10(2), 335. <https://doi.org/10.3390/cells10020335>
- Cui, D., Han, G., Shang, Y., Liu, C., Xia, L., Li, L., & Yi, S. (2015). Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 444, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.033>
- Cunningham, D. S., Fulgham, D. L., Rayl, D. L., Hansen, K. A., & Alexander, N. J. (1991). Antisperm antibodies to sperm surface antigens in women with genital tract infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 164(3), 791–796. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90517-u](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90517-u)
- Curci, A., Bevilacqua, A., Fiorenza, M. T., & Mangia, F. (1991). Developmental regulation of heat-shock response in mouse oogenesis: Identification of

- differentially responsive oocyte classes during Graafian follicle development. *Developmental Biology*, 144(2), 362–368. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90428-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90428-6)
- Curci, A., Bevilacqua, A., & Mangia, F. (1987). Lack of heat-shock response in preovulatory mouse oocytes. *Developmental Biology*, 123(1), 154–160. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90437-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90437-4)
- Day, R. M., Gupta, J. S., & MacRae, T. H. (2003). A small heat shock/alpha-crystallin protein from encysted *Artemia* embryos suppresses tubulin denaturation. *Cell Stress Chaperones*, 8, 183–193. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)008](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008)
- Dimitrova, D., Kalaydjiev, S., Hristov, L., Nikolov, K., Boyadjiev, T., & Nakov, L. (2004). Antichlamydial and Antisperm Antibodies in Patients with Chlamydial Infections. *American Journal of Reproductive Immunology*, 52(5), 330–336. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00230.x>
- Dimitrova-Dikanarova, D. K., Lazarov, V. V., Tafradjiska-Hadjiolova, R., Dimova, I. I., Petkova, N. U., & Krastev, Z. A. (2016). Association between *Helicobacter pylori* infection and the presence of anti-sperm antibodies. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1258330>
- Dirnfeld, M., Lahat, N., Daniel-Spiegel, E., Wiener-Megnazi, Z., Goldman, S., Abramovici, H., & Shalev, E. (2002). Immunosuppressive Properties of Follicular Fluid and Media Conditioned by Zygotes Correlate with Subsequent Conception in In Vitro Fertilization. *American Journal of Reproductive Immunology*, 48(5), 329–333. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.01178.x>
- Doty, A., Benson, S., Pozor, M., Macpherson, M., Buhi, W., Dow, C., & Troedsson, M. (2007). HEAT SHOCK INDUCES APOPTOSIS IN EQUINE SPERMATOCYTES. *Biology of Reproduction*, 77(Suppl_1), 128. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/77.s1.128>
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., & Hartl, F. U. (2006). Molecular Chaperones of the Hsp110 Family Act as Nucleotide Exchange Factors of Hsp70s. *The EMBO Journal*, 25(11), 2519–2528. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601138>
- Dubińska-Magiera, M., Jabłońska, J., Saczko, J., Kulbacka, J., Jagla, T., & Daczewska, M. (2014). Contribution of Small Heat Shock Proteins to Muscle Development and Function. *FEBS Letters*, 588(4), 517–530. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.005>
- Dym, M., & Romrell, L. J. (1975). INTRAEPITHELIAL LYMPHOCYTES IN THE MALE REPRODUCTIVE TRACT OF RATS AND RHESUS MONKEYS. *Reproduction*, 42(1), 1–7. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420001>

- Eggert-Kruse, W., Batschulat, K., Demirakca, T., & Strowitzki, T. (2014). Male Immunity to the Chlamydial 60 kDa Heat Shock Protein (HSP 60) - Associated With Semen Quality? *Andrologia*, 47(1), 66–76. <https://doi.org/10.1111/and.12224>
- Eggert-Kruse, W., Rohr, G., Demirakca, T., Rusu, R., Naher, H., Petzoldt, D., & Runnebaum, B. (1997). Chlamydial Serology in 1303 Asymptomatic Subfertile Couples. *Human Reproduction*, 12(7), 1464–1475. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.7.1464>
- El-Demiry, M. I., Hargreave, T. B., Busuttill, A., Elton, R., James, K., & Chisholm, G. D. (1987). Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertility and Sterility*, 48(3), 470–479. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59421-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59421-7)
- Ellerman, D. A., Pei, J., Gupta, S., Snell, W. J., Myles, D., & Primakoff, P. (2009). Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 76(12), 1188–1199. <https://doi.org/10.1002/mrd.21092>
- Ellis, J. (1987). Proteins as Molecular Chaperones. *Nature*, 328(6129), 378–379. <https://doi.org/10.1038/328378a0>
- Esmailnejad, A., Nikahval, B., Mogheiseh, A., Karampour, R., & Karami, S. (2020). The detection of canine anti-sperm antibody following parenteral immunization of bitches against homogenized whole sperm. *Basic and Clinical Andrology*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12610-020-0100-z>
- Esteves, S. C., Schneider, D. T., & Verza, S., Jr. (2007). Influence of antisperm antibodies in the semen on intracytoplasmic sperm injection outcome. *International Braz J Urol*, 33(6), 795–802. <https://doi.org/10.1590/s1677-55382007000600007>
- Fan, G. (2012). Role of Heat Shock Proteins in Stem Cell Behavior. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 305–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398459-3.00014-9>
- Fenichel, P., Hsi, B. L., Farahifar, D., Donzeaut, M., Barrier-Delpech, D., & Yeh, C. J. G. (1989). Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *Reproduction*, 87(2), 699–706. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870699>
- Fiszer, D., & Kurpisz, M. (1998). Major histocompatibility Complex Expression on Human, male germ cells: a review. *American Journal of Reproductive Immunology*, 40(3), 172–176. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1998.tb00409.x>
- Francavilla, F., Romano, R., Santucci, R., Marrone, V., Properzi, G., & Ruvolo, G. (1997). Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the

- inhibition of ZP binding. *Fertility and Sterility*, 67(6), 1128–1133. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81450-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81450-1)
- Franklin, R. R., & Dukes, C. D. (1964). Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 89(1), 6–9. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(16\)35035-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(16)35035-9)
- Gadella, B. M. (2017). Reproductive Tract Modifications of the Boar Sperm Surface. *Molecular Reproduction and Development*, 84(9), 822–831. <https://doi.org/10.1002/mrd.22821>
- Gadella, B. M., Tsai, P., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm Head Membrane Reorganisation During Capacitation. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 473–480. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082583bg>
- Gaestel, M. (2002). sHsp-Phosphorylation: Enzymes, Signaling Pathways and Functional Implications. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 151–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_8
- Garrido, C. (2002). Size Matters: Of the Small HSP27 and Its Large Oligomers. *Cell Death and Differentiation*, 9(5), 483–485. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401005>
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., & Kroemer, G. (2006). Heat Shock Proteins 27 and 70: Anti-Apoptotic Proteins With Tumorigenic Properties. *Cell Cycle*, 5(22), 2592–2601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3448>
- Garrido, C., Ottavi, P., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P., Chauffert, B., & Mehlen, P. (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Research*, 57(13), 2661–2667. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9205074/>
- Gastmann, O., Burfeind, P., Günther, E., Hameister, H., Szpirer, C., & Hoyer-Fender, S. (1993). Sequence, Expression, and Chromosomal Assignment of a Human Sperm Outer Dense Fiber Gene. *Molecular Reproduction and Development*, 36(4), 407–418. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360402>
- Ghayour-Mobarhan, M., Sahebkar, A., Parizadeh, S. M. R., Moohebati, M., Tavallaie, S., RezaKazemi-Bajestani, S. M., Esmaeili, H., & Ferns, G. (2008). Antibody Titres to Heat Shock Protein 27 Are Elevated in Patients With Acute Coronary Syndrome. *International Journal of Experimental Pathology*, 89(3), 209–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00586.x>
- Giese, K. C., & Vierling, E. (2002). Changes in Oligomerization Are Essential for the Chaperone Activity of a Small Heat Shock Protein in Vivo and in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46310–46318. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208926200>

- Gleicher, N., & Barad, D. (2006). Unexplained Infertility: Does It Really Exist? *Human Reproduction*, 21(8), 1951–1955. <https://doi.org/10.1093/humrep/del135>
- Grad, I., & Picard, D. (2007). The Glucocorticoid Responses Are Shaped by Molecular Chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.018>
- Grotegut, P., Kuehn, S., Dick, H. B., & Joachim, S. C. (2020). Destructive Effect of Intravitreal Heat Shock Protein 27 Application on Retinal Ganglion Cells and Neurofilament. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 549. <https://doi.org/10.3390/ijms21020549>
- Gusev, N. B., Bogatcheva, N. V., & Marston, S. B. (2002). Structure and Properties of Small Heat Shock Proteins (sHsp) and Their Interaction With Cytoskeleton Proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 67(5), 511–519. <https://doi.org/10.1023/a:1015549725819>
- Haller-Kikkatalo, K., Salumets, A., & Uibo, R. (2011). Review on Autoimmune Reactions in Female Infertility: Antibodies to Follicle Stimulating Hormone. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/762541>
- Harakal, J., Qiao, H., Wheeler, K., Rival, C., Paul, A. G. A., Hardy, D. M., Cheng, C. Y., Goldberg, E., & Tung, K. S. K. (2022). Exposed and Sequestered Antigens in Testes and Their Protection by Regulatory T Cell-Dependent Systemic Tolerance. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.809247>
- Haslbeck, M., & Buchner, J. (2002). Chaperone Function of sHsps. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_3
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., & Buchner, J. (2005). Some Like It Hot: The Structure and Function of Small Heat-shock Proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(10), 842–846. <https://doi.org/10.1038/nsmb993>
- Haslbeck, M., & Vierling, E. (2015). A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1537–1548. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>
- Haslbeck, M., Weinkauff, S., & Buchner, J. (2018). Small Heat Shock Proteins: Simplicity Meets Complexity. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6), 2121–2132. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev118.002809>
- Hassanin, A. M., Ahmed, H. H., & Kaddah, A. N. (2018). A Global View of the Pathophysiology of Varicocele. *Andrology*, 6(5), 654–661. <https://doi.org/10.1111/andr.12511>

- Hedger, M. (2010). Immunology of the Testis and Male Reproductive Tract. In *Elsevier eBooks* (pp. 189–230). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-046884-6.01112-x>
- Heikkila, J. J., Browder, L. W., Gedamu, L., Nickells, R. W., & Schultz, G. A. (1986). Heat-shock Gene Expression in Animal Embryonic Systems. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 28(6), 1093–1105. <https://doi.org/10.1139/g86-153>
- Heikkila, J. J., Kloc, M., Bury, J., Schultz, G. A., & Browder, L. W. (1985). Acquisition of the Heat-shock Response and Thermotolerance During Early Development of *Xenopus Laevis*. *Developmental Biology*, 107(2), 483–489. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90329-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90329-x)
- Hendricks, K. E., & Hansen, P. J. (2009). Can Programmed Cell Death Be Induced in Post-ejaculatory Bull and Stallion Spermatozoa? *Theriogenology*, 71(7), 1138–1146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.12.006>
- Henriques, M. C., Santiago, J., Patrício, A., Herdeiro, M. T., Loureiro, S., & Fardilha, M. (2023). Smoking Induces a Decline in Semen Quality and the Activation of Stress Response Pathways in Sperm. *Antioxidants*, 12(10), 1828. <https://doi.org/10.3390/antiox12101828>
- Homaei-Shandiz, F., Mehrad-Majd, H., Tasbandi, M., Aledavood, A., Afshari, J. T., Ghavami, V., & Ghayour-Mobarhan, M. (2016). Anti-Heat Shock Protein-27 Antibody Levels in Women With Breast Cancer: Association With Disease Complications and Two-Year Disease-Free Survival. *PubMed*, 17(10), 4655–4659. <https://doi.org/10.22034/apjcp.2016.17.10.4655>
- Honarpour, N., Du, C., Richardson, J. A., Hammer, R. E., Wang, X., & Herz, J. (2000). Adult Apaf-1-Deficient Mice Exhibit Male Infertility. *Developmental Biology*, 218(2), 248–258. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9585>
- Honda, H., Hasegawa, A., Chen, Y., Wakimoto, Y., & Shibahara, H. (2024). Anti-tubulin Beta 4 a (TBB4A) Antibody Immobilized Sperm in a Complement-dependent Manner in Humans. *Journal of Reproductive Immunology*, 164, 104259. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2024.104259>
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2022). Heat Shock Proteins: Biological Functions, Pathological Roles, and Therapeutic Opportunities. *MedComm*, 3(3). <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Hunt, C., & Morimoto, R. I. (1985). Conserved Features of Eukaryotic Hsp70 Genes Revealed by Comparison With the Nucleotide Sequence of Human Hsp70. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(19), 6455–6459. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6455>

- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, *434*(7030), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature03362>
- Isojima, S., Graham, R. M., & Graham, J. B. (1959). Sterility in Female Guinea Pigs Induced by Injection with Testis. *Science*, *129*(3340), 44. <https://doi.org/10.1126/science.129.3340.44>
- Jacob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, *268*(3), 1517–1520. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8093612/>
- Jantschitsch, N., Kindas-Mügge, N., Metz, N., Amann, N., Micksche, N., & Trautinger, N. (1998). Expression of the Small Heat Shock Protein HSP 27 in Developing Human Skin. *British Journal of Dermatology*, *139*(2), 247–253. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02361.x>
- Jiang, J., & Kelly, K. A. (2011). Phenotype and function of regulatory T cells in the genital tract. *Current Trends in Immunology*, *12*, 89–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22287829/>
- Jog, N. R., Jala, V. R., Ward, R. A., Rane, M. J., Haribabu, B., & McLeish, K. R. (2007). Heat Shock Protein 27 Regulates Neutrophil Chemotaxis and Exocytosis Through Two Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology*, *178*(4), 2421–2428. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2421>
- Johnson, L., Thompson, D. L., & Varner, D. D. (2008). Role of Sertoli Cell Number and Function on Regulation of Spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, *105*(1–2), 23–51. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.029>
- Jones, D. B., Coulson, A. F., & Duff, G. W. (1993). Sequence Homologies Between Hsp60 and Autoantigens. *Immunology Today*, *14*(3), 115–118. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90210-c](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90210-c)
- Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., & Hightower, L. E. (2008). Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins. *Cell Stress and Chaperones*, *14*(1), 105–111. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7>
- Kantartzi, P. D., Goulis, C. D., Goulis, G. D., & Papadimas, I. (2007). Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia*, *11*(3), 99–104. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2658802/>
- Kappé, G., Franck, E., Verschuure, P., Boelens, W. C., Leunissen, J. a. M., & De Jong, W. W. (2003). The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1–10. *Cell Stress Chaperones*, *8*(1), 53–61. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC514853/>
- Kappé, G., Verschuure, P., Philipsen, R. L., Staalduinen, A. A., Van De Boogaart, P., Boelens, W. C., & De Jong, W. W. (2001). Characterization of two novel

- human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1520(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00237-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00237-8)
- Kargari, M., Tavassoli, S., Avan, A., Ebrahimi, M., Azarpazhooh, M. R., Asoodeh, R., Nematy, M., Hassanian, S. M., Rahmani, F., Mohammadzade, E., Esmacili, H., Moohebbati, M., Ferns, G. A., Ghayour-Mobarhan, M., & Parizadeh, S. M. R. (2017). Relationship Between Serum Anti-heat Shock Protein 27 Antibody Levels and Obesity. *Clinical Biochemistry*, 50(12), 690–695. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.02.015>
- Kato, K., Ito, H., & Inaguma, Y. (2002). Expression and Phosphorylation of Mammalian Small Heat Shock Proteins. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 129–150. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_7
- Kelly, R. (1995). Contraception: Immunosuppressive Mechanisms in Semen: Implications for Contraception. *Human Reproduction*, 10(7), 1686–1693. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136156>
- Khambata, K., Modi, D., & Gupta, S. (2021). Immunoregulation in the testis and its implication in fertility and infections. *Exploration of Immunology*. <https://doi.org/10.37349/ei.2021.00021>
- Kim, D., Somji, S., Garrett, S. H., Sens, M. A., Shukla, D., & Sens, D. A. (2001). EXPRESSION OF Hsp 27, Hsp 60, Hsc 70, AND Hsp 70 BY IMMORTALIZED HUMAN PROXIMAL TUBULE CELLS (HK-2) FOLLOWING EXPOSURE TO HEAT SHOCK, SODIUM ARSENITE, OR CADMIUM CHLORIDE. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 63(7), 475–493. <https://doi.org/10.1080/15287390152410129>
- Kim, M., Geum, D., Khang, I., Park, Y., Kang, B., Lee, K., & Kim, K. (2001). Expression Pattern of HSP25 in Mouse Preimplantation Embryo: Heat Shock Responses During Oocyte Maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 61(1), 3–13. <https://doi.org/10.1002/mrd.1125>
- Kligman, I., Jeremias, J., Rosenwaks, Z., & Witkin, S. S. (1998). Cell-Mediated Immunity to Human and Escherichia Coli 60-kDa Heat Shock Protein in Women: Association With a History of Spontaneous Abortion and Endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 40(1), 32–36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1998.tb00385.x>
- Kostenko, S., & Moens, U. (2009). Heat Shock Protein 27 Phosphorylation: Kinases, Phosphatases, Functions and Pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(20), 3289–3307. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0086-3>
- Koteiche, H. A., Berengian, A. R., & Mchaourab, H. S. (1998). Identification of Protein Folding Patterns Using Site-Directed Spin Labeling. Structural Characterization of a β -Sheet and Putative Substrate Binding Regions in the

- Conserved Domain of α A-Crystallin. *Biochemistry*, 37(37), 12681–12688. <https://doi.org/10.1021/bi9814078>
- Koteiche, H. A., & Mchaourab, H. S. (2003). Mechanism of Chaperone Function in Small Heat-shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10361–10367. <https://doi.org/10.1074/jbc.m211851200>
- Kregel, K. C. (2002). Invited Review: Heat Shock Proteins: Modifying Factors in Physiological Stress Responses and Acquired Thermotolerance. *Journal of Applied Physiology*, 92(5), 2177–2186. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01267.2001>
- Kremer, J., & Jager, S. (1980). Characteristics of Anti-Spermatozoal Antibodies Responsible for the Shaking Phenomenon with Special Regard to Immunoglobulin Class and Antigen-Reactive Sites. *Andrology*, 3(1–6), 143–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1980.tb00103.x>
- Kriehuber, T., Rattei, T., Weinmaier, T., Bepperling, A., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). Independent Evolution of the Core Domain and Its Flanking Sequences in Small Heat Shock Proteins. *The FASEB Journal*, 24(10), 3633–3642. <https://doi.org/10.1096/fj.10-156992>
- Kutteh, W. H., Prince, S. J., Hammond, K. R., Kutteh, C. C., & Mestecky, J. (1996). Variations in Immunoglobulins and IgA Subclasses of Human Uterine Cervical Secretions Around the Time of Ovulation. *Clinical & Experimental Immunology*, 104(3), 538–542. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.36742.x>
- Kyurkchiev, S. D., Shigeta, M., Koyama, K., & Isojima, S. (1985). Establishment of human-mouse hybridomas using lymphocytes from sterile women with sperm-immobilizing antibodies. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 37(10), 2135–2136. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2416854/>
- Lamb, J. R., Bal, V., Mendez-Samperio, P., Mehlert, A., So, A., Rothbard, J., Jindal, S., Young, R. A., & Young, D. B. (1989). Stress Proteins May Provide a Link Between the Immune Response to Infection and Autoimmunity. *International Immunology*, 1(2), 191–196. <https://doi.org/10.1093/intimm/1.2.191>
- Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., & Anderson, C. W. (1992). Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *Journal of Biological Chemistry*, 267(2), 794–803. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48354-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48354-8)
- Latchman, D. S. (2002). Protection of Neuronal and Cardiac Cells by HSP27. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 253–265. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_14

- Lazarov, V., Bechev, B., Stoeff, S., Magrisso, M., Trifonova, N., & Dimitrova, D. (2016). Chemiluminescent data on the functional state of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) from blood and pleural effusions, in cases of inflammation and malignancies. *Series on Biomechanics*, 30(1), 43–47. http://jsb.imbm.bas.bg/page/en/details.php?article_id=179
- Leathersich, S., & Hart, R. J. (2022). Immune infertility in men. *Fertility and Sterility*, 117(6), 1121–1131. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.02.010>
- Lee, G. J. (1997). A Small Heat Shock Protein Stably Binds Heat-denatured Model Substrates and Can Maintain a Substrate in a Folding-competent State. *The EMBO Journal*, 16(3), 659–671. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.3.659>
- Lee, G. J., & Vierling, E. (2000). A Small Heat Shock Protein Cooperates With Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein. *PLANT PHYSIOLOGY*, 122(1), 189–198. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.189>
- Leonardi, R., Barbato, E., Paganelli, C., & Lo Muzio, L. (2004). Immunolocalization of Heat Shock Protein 27 in Developing Jaw Bones and Tooth Germs of Human Fetuses. *Calcified Tissue International*, 75(6), 509–516. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0077-1>
- Li, T. S. (1974). Sperm immunology, infertility, and fertility control. *Obstet Gynecol.*, 44(4), 607–623. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4137940/>
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). THE HEAT-SHOCK PROTEINS. *Annual Review of Genetics*, 22(1), 631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
- Linnet, L. (1983). Clinical Immunology of Vasectomy and Vasovasostomy. *Urology*, 22(2), 101–114. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(83\)90487-9](https://doi.org/10.1016/0090-4295(83)90487-9)
- Loones, M., Rallu, M., Mezger, V., & Morange, M. (1997). HSP Gene Expression and HSF2 in Mouse Development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(2), 179–190. <https://doi.org/10.1007/pl00000590>
- Lyons, R. A., Saridogan, E., & Djahanbakhch, O. (2006). The Reproductive Significance of Human Fallopian Tube Cilia. *Human Reproduction Update*, 12(4), 363–372. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml012>
- MacPhee, D. J. (2017). The role of heat shock proteins in reproductive system development and function. In *Advances in anatomy, embryology and cell biology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3>
- Mandelbaum, S. L., Diamond, M. P., & DeCherney, A. H. (1987). The Impact of Antisperm Antibodies on Human Infertility. *The Journal of Urology*, 138(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)42969-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)42969-7)
- Mann, S. L., Patton, W. C., King, A., & Chan, P. J. (2002). Comparative Genomic Hybridization Analysis of Sperm DNA Apoptosis After Exposure to Heat

- Shock. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19(4), 195–200.
<https://doi.org/10.1023/a:1014846113170>
- Markova, M. D. (2004). Electron Microscopic Observations of Human Sperm Whole-mounts After Extraction for Nuclear Matrix and Intermediate Filaments (NM-IF). *Andrology*, 27(5), 291–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2004.00479.x>
- Markova, M. D., Delimitreva, S. M., Kolarov, A. I., & Zhivkova, R. S. (2018). Impact of autoimmunity on oogenesis and ovarian morphology. *Acta Morphologica Et Anthropologica*, 25(1–2), 103–107.
<https://www.iempam.bas.bg/journals/acta/acta25a/103-107.pdf>
- Markova, M. D., Nikolova, V. P., & Marinova, Ts. Ts. (2011). OBSERVATIONS OF INTERFACE BETWEEN TAIL MICROTUBULES AND OUTER DENSE FIBERS IN HUMAN NECROZOOSPERMIC SPERMATOOZOA. *J Biomed Clin Res*, 4(2), 82–85. https://www.researchgate.net/profile/Maya-Markova/publication/274569982_Observations_of_interface_between_tail_microtubules_and_outer_dense_fibers_in_human_necrozoospermic_spermatoozoa/links/552386ac0cf2a2d9e146f6f4/Observations-of-interface-between-tail-microtubules-and-outer-dense-fibers-in-human-necrozoospermic-spermatoozoa.pdf
- Marmar, J. L. (1991). The status of vasectomy reversals. *Int J Fertil.*, 36(6), 352–357. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1684959/>
- Martinova, Y., Zaprianova, S. Z., Rashev, P., & Mollova, M. (2004). Expression and localization of small heat shock proteins in mouse testicular tissue. *J Biomed Clin Res*, 2(1), 66–68. https://www.researchgate.net/profile/Pavel-Rashev/publication/249962555_Expression_and_localization_of_small_heat_shock_proteins_in_mouse_testicular_tissue/links/0c960535c05d69c50e000000/Expression-and-localization-of-small-heat-shock-proteins-in-mouse-testicular-tissue.pdf
- Mazumdar, S., & Levine, A. S. (1998). Antisperm Antibodies: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Fertility and Sterility*, 70(5), 799–810. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00302-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00302-1)
- Mchaourab, H. S., Dodson, E. K., & Koteiche, H. A. (2002). Mechanism of Chaperone Function in Small Heat Shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40557–40566. <https://doi.org/10.1074/jbc.m206250200>
- Mehlen, P., Mehlen, A., Godet, J., & Arrigo, A. (1997). Hsp27 as a Switch Between Differentiation and Apoptosis in Murine Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31657–31665. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31657>
- Menge, A. C., & Beitner, O. (1989). Interrelationships Among Semen Characteristics, Antisperm Antibodies, and Cervical Mucus Penetration

- Assays in Infertile Human Couples. *Fertility and Sterility*, 51(3), 486–492. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)60559-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)60559-9)
- Michaud, S., Morrow, G., Marchand, J., & Tanguay, R. M. (2002). Drosophila small heat shock proteins: cell and Organelle-Specific chaperones? *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 79–101. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_5
- Michel, V., Pilatz, A., Hedger, M., & Meinhardt, A. (2015). Epididymitis: Revelations at the Convergence of Clinical and Basic Sciences. *Asian Journal of Andrology*, 17(5), 756. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.155770>
- Mincheva-Nilsson, L., Baranov, V., Yeung, M. M., Hammarström, S., & Hammarström, M. L. (1994). Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(4), 2020–2032. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7509833/>
- Mounier, N., & Arrigo, A. P. (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress & Chaperones*, 7(2), 167–176. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12380684/>
- Naaby-Hansen, S. (1990). The humoral autoimmune response to vasectomy described by immunoblotting from two-dimensional gels and demonstration of a human spermatozoal antigen immunochemically crossreactive with the D2 adhesion molecule. *Journal of Reproductive Immunology*, 17(3), 187–205. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(90\)90002-n](https://doi.org/10.1016/0165-0378(90)90002-n)
- Nakov, L. S. (1996). The role of anti - sperm and anti - zona pellucida antibodies in immunologically - mediated infertility. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 21, 93–100.
- Nakov, L. S. (2003). The role of anti-sperm and anti-zona pellucida antibodies in immunologically - mediated infertility. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 21, 93–100.
- Neuer, A. (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update*, 6(2), 149–159. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.149>
- Neuer, A., Spandorfer, S., Giraldo, P., Mele, C., Liu, H. C., Marzusch, K., Kneissl, D., & Witkin, S. S. (1997). Immune sensitization to the 60 KD heat shock protein and pregnancy outcome. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 5(2), 154–157. <https://doi.org/10.1155/s1064744997000239>
- Nowicka-Bauer, K., Kamieniczna, M., Cibulka, J., Ulcova-Gallova, Z., & Kurpisz, M. (2015). Proteomic identification of sperm antigens using serum samples from individuals with and without antisperm antibodies. *Andrologia*, 48(6), 693–701. <https://doi.org/10.1111/and.12502>
- Oborna, I., Fingerova, H., Novotny, J., Brezinova, J., Svobodova, M., & Aziz, N. (2009). REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HUMAN SEMEN IN

- RELATION TO LEUKOCYTE CONTAMINATION. *Biomedical Papers*, 153(1), 53–57. <https://doi.org/10.5507/bp.2009.009>
- Obuchowski, I., Karaś, P., & Liberek, K. (2021). The small ones Matter—SHSPs in the bacterial chaperone network. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.666893>
- Oya-Ito, T., Liu, B., & Nagaraj, R. H. (2006). Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(1), 279–291. <https://doi.org/10.1002/jcb.20781>
- Panasenko, O. O., Kim, M. V., Marston, S. B., & Gusev, N. B. (2003). Interaction of the Small Heat Shock Protein With Molecular Mass 25 kDa (Hsp25) With Actin. *European Journal of Biochemistry*, 270(5), 892–901. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03449.x>
- Pastuszak, A., & Wang, R. (2015). Varicocele and testicular function. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 659. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.153539>
- Paul, C., Teng, S., & Saunders, P. T. (2009). A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death1. *Biology of Reproduction*, 80(5), 913–919. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071779>
- Pires, E. S., Meherji, P. K., Vaidya, R. R., Parikh, F. R., Ghosalkar, M. N., & Khole, V. V. (2007). Specific and Sensitive Immunoassays Detect Multiple Anti-ovarian Antibodies in Women With Infertility. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(12), 1181–1190. <https://doi.org/10.1369/jhc.7a7259.2007>
- Pöllänen, P., & Maddocks, S. (1988). Macrophages, lymphocytes and MHC II antigen in the ram and the rat testis. *Reproduction*, 82(2), 437–445. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820437>
- Pöllänen, P., & Niemi, M. (1987). Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Andrology*, 10(1), 37–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00163.x>
- Pratt, W., Morishima, Y., Murphy, M., & Harrell, M. (2005). Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Springer eBooks*, 111–138. https://doi.org/10.1007/3-540-29717-0_5
- Primakoff, P., Lathrop, W., & Bronson, R. (1990). Identification of Human Sperm Surface Glycoproteins Recognized by Autoantisera from Immune Infertile Men, Women, and Vasectomized Men1. *Biology of Reproduction*, 42(5–6), 929–942. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.6.929>
- Prodromou, C. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *The EMBO Journal*, 19(16), 4383–4392. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4383>

- Purandhar, K., Jena, P. K., Prajapati, B., Rajput, P., & Seshadri, S. (2014). Understanding the Role of Heat Shock Protein Isoforms in Male Fertility, Aging and Apoptosis. *The World Journal of Men S Health*, 32(3), 123. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.3.123>
- Qiu, X.-., Shao, Y.-., Miao, S., & Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2560–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6192-6>
- Quinlan, R. (2002). Cytoskeletal competence requires protein chaperones. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 219–233. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56348-5_12
- Raizman, J. E., Chen, Y., Seibert, T., Hibbert, B., Cuerrier, C. M., Salari, S., Zhao, X., Hu, T., Shi, C., Ma, X., Simard, T., Caravaggio, J., Rayner, K., Bowdish, D., Moore, K., & O'Brien, E. R. (2013). Heat shock protein-27 attenuates foam cell formation and atherogenesis by down-regulating scavenger receptor-A expression via NF- κ B signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(12), 1721–1728. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.07.015>
- Rane, M. J., Pan, Y., Singh, S., Powell, D. W., Wu, R., Cummins, T., Chen, Q., McLeish, K. R., & Klein, J. B. (2003). Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating AKT activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27828–27835. <https://doi.org/10.1074/jbc.m303417200>
- Raviol, H., Sadlish, H., Rodriguez, F., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2006). Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *The EMBO Journal*, 25(11), 2510–2518. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601139>
- Ritossa, F. (1962). A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571–573. <https://doi.org/10.1007/bf02172188>
- Rose, N. R., Hjort, T., & Rumke, P. (1976). Techniques for detection of iso and auto antibodies to human spermatozoa. *Clinical and Experimental Immunology*, 23(2), 175–199.
- Rouen, A., Pyram, K., Pollet-Villard, X., Hyon, C., Dorna, M., Marques, S., Chantot-Bastaraud, S., Joyé, N., Cassuto, N. G., & Siffroi, J. (2013). Simultaneous cell by cell study of both DNA fragmentation and chromosomal segregation in spermatozoa from chromosomal rearrangement carriers. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(3), 383–390. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9915-7>
- Rowe, P. J., Comhaire, F. H., & Hargreave, T. B. (1993). *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Male*. Cambridge University Press.

- Rümke, P., & Hellinga, G. (1959). Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. *American Journal of Clinical Pathology*, 32(4), 357–363. <https://doi.org/10.1093/ajcp/32.4.357>
- Rumke, P., Van Amstel, N., Messer, E., & Bezemer, P. (1974). Prognosis of Fertility of Men With Sperm Agglutinins in the Serum. *Fertility and Sterility*, 25(5), 393–398. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)40388-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)40388-2)
- Salinthone, S., Tyagi, M., & Gerthoffer, W. T. (2008). Small Heat Shock Proteins in Smooth Muscle. *Pharmacology & Therapeutics*, 119(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.04.005>
- Santarosa, M., Favaro, D., Quايا, M., & Galligioni, E. (1997). Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: Possible role and prognostic implications in cancer patients. *European Journal of Cancer*, 33(6), 873–877. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(97\)00002-6](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)00002-6)
- Scharf, K., Siddique, M., & Vierling, E. (2001). The expanding family of Arabidopsis thaliana small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6(3), 225–237. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006)
- Schwarzinger, F., Schüller, T., & Krause, W. (2009). Flow cytometric determination of binding of monoclonal antibodies to human spermatozoa. *Andrologia*, 29(3), 163–168. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1997.tb00311.x>
- Shah, M., Stanek, J., & Handwerger, S. (1998). Differential Localization of Heat Shock Proteins 90, 70, 60 and 27 in Human Decidua and Placenta During Pregnancy. *The Histochemical Journal*, 30(7), 509–518. <https://doi.org/10.1023/a:1003259907014>
- Shahat, A., Rizzoto, G., & Kastelic, J. (2020). Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. *Theriogenology*, 158, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.034>
- Shakoori, A. R., Oberdorf, A. M., Owen, T. A., Weber, L. A., Hickey, E., Stein, J. L., Lian, J. B., & Stein, G. S. (1992). Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 48(3), 277–287. <https://doi.org/10.1002/jcb.240480308>
- Shams, S., Shafi, S., Bodman-Smith, K., Williams, P., Mehta, S., & Ferns, G. A. (2008). Anti-heat shock protein-27 (Hsp-27) antibody levels in patients with chest pain: Association with established cardiovascular risk factors. *Clinica Chimica Acta*, 395(1–2), 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.04.026>
- Shashidharamurthy, R., Koteiche, H. A., Dong, J., & Mchaourab, H. S. (2004). Mechanism of Chaperone Function in Small Heat Shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5281–5289. <https://doi.org/10.1074/jbc.m407236200>

- Sheynkin, Y., Welliver, R., Winer, A., Hajimirzaee, F., Ahn, H., & Lee, K. (2010). Protection from scrotal hyperthermia in laptop computer users. *Fertility and Sterility*, *95*(2), 647–651. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.10.013>
- Shi, C., Deng, J., Chiu, M., Chen, Y., & O'Brien, E. R. (2020). Heat shock protein 27 immune complex altered signaling and transport (ICAST): Novel mechanisms of attenuating inflammation. *The FASEB Journal*, *34*(11), 14287–14301. <https://doi.org/10.1096/fj.202001389rr>
- Shibahara, H., Chen, Y., Honda, H., Wakimoto, Y., Fukui, A., & Hasegawa, A. (2022). Sex difference in anti-sperm antibodies. *Reproductive Medicine and Biology*, *21*(1). <https://doi.org/10.1002/rmb2.12477>
- Shibahara, H., Shiraishi, Y., Hirano, Y., Kasumi, H., Koyama, K., & Suzuki, M. (2007). Relationship Between Level of Serum Sperm Immobilizing Antibody and Its Inhibitory Effect on Sperm Migration through Cervical Mucus in Immunologically Infertile Women. *American Journal of Reproductive Immunology*, *57*(2), 142–146. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00457.x>
- Singh, M. K., Sharma, B., & Tiwari, P. K. (2017). The small heat shock protein Hsp27: Present understanding and future prospects. *Journal of Thermal Biology*, *69*, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.004>
- Soltys, B. J., & Gupta, R. S. (1997). CELL SURFACE LOCALIZATION OF THE 60 kDa HEAT SHOCK CHAPERONIN PROTEIN (Hsp60) IN MAMMALIAN CELLS. *Cell Biology International*, *21*(5), 315–320. <https://doi.org/10.1006/cbir.1997.0144>
- Son, G. H., Geum, D., Chung, S., Park, E., Lee, K. H., Choi, S., & Kim, K. (2005). A Protective Role of 27-kDa Heat Shock Protein in Glucocorticoid-evoked Apoptotic Cell Death of Hippocampal Progenitor Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(4), 1751–1758. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.152>
- Spandorfer, S. D., Liu, H., Neuer, A., Barmat, L. I., Davis, O., & Rosenwaks, Z. (1999). The embryo toxicity of hydrosalpinx fluid is only apparent at high concentrations: an in vitro model that simulates in vivo events. *Fertility and Sterility*, *71*(4), 619–626. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(98\)00541-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(98)00541-x)
- Spector, N. L., Mehlen, P., Ryan, C., Hardy, L., Samson, W., Levine, H., Nadler, L. M., Fabre, N., & Arrigo, A. (1994). Regulation of the 28 kDa heat shock protein by retinoic acid during differentiation of human leukemic HL-60 cells. *FEBS Letters*, *337*(2), 184–188. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80270-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80270-x)
- Spector, N. L., Ryan, C., Samson, W., Levine, H., Nadler, L. M., & Arrigo, A. (1993). Heat shock protein is a unique marker of growth arrest during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Journal of Cellular Physiology*, *156*(3), 619–625. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041560322>

- Stope, M. B., Klinkmann, G., Diesing, K., Koensgen, D., Burchardt, M., & Mustea, A. (2017). Heat shock protein HSP27 secretion by ovarian cancer cells is linked to intracellular expression levels, occurs independently of the endoplasmic reticulum pathway and HSP27's phosphorylation status, And is mediated by exosome liberation. *Disease Markers*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/1575374>
- Sukhotnik, I., Greenblatt, R., Voskoboinik, K., Lurie, M., Coran, A. G., & Mogilner, J. G. (2007). Relationship between time of reperfusion and E-selectin expression, neutrophil recruitment, and germ cell apoptosis after testicular ischemia in a rat model. *Fertility and Sterility*, 90(4), 1517–1522. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1334>
- Sun, Y., & MacRae, T. H. (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(21), 2460–2476. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5190-4>
- Suryawan, I. G. R., Pikir, B. S., Rantam, F. A., Ratri, A. K., & Nugraha, R. A. (2024). Hypoxic Preconditioning Promotes Survival of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell via Expression of Prosurvival and Proangiogenic Biomarkers. *F1000Research*, 10, 843. <https://doi.org/10.12688/f1000research.55351.3>
- Sziller, I., Witkin, S. S., Ziegert, M., Csapo, Z., Ujhazy, A., & Papp, Z. (1998). Serological responses of patients with ectopic pregnancy to epitopes of the Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein. *Human Reproduction*, 13(4), 1088–1093. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.4.1088>
- Szyller, J., & Bil-Lula, I. (2021). Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury and Benefits From Physical Exercises: A Review to the Current Knowledge. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1). <https://doi.org/10.1155/2021/6678457>
- Taneichi, A., Shibahara, H., Hirano, Y., Suzuki, T., Obara, H., Fujiwara, H., Takamizawa, S., & Sato, I. (2002). Sperm immobilizing antibodies in the sera of infertile women cause low fertilization rates and poor embryo quality in vitro. *American Journal of Reproductive Immunology*, 47(1), 46–51. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.1o055.x>
- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., & Anderson, R. L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress & Chaperones*, 1(1), 23–28. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9222585/>
- Taylor, R. P., & Benjamin, I. J. (2005). Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38(3), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.12.014>
- Tezel, G., & Wax, M. B. (2000). The Mechanisms of hsp27 Antibody-Mediated Apoptosis in Retinal Neuronal Cells. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3552–3562. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03552.2000>

- Thomas, J., Fishel, S., Hall, J., Green, S., Newton, T., & Thornton, S. (1997). Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Human Reproduction*, *12*(11), 2418–2421. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.11.2418>
- Tissières, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, *84*(3), 389–398. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90447-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1)
- Tokuda, N., Kasahara, M., & Levy, R. B. (1990). Differential regulation and expression of major histocompatibility complex (MHC) and Ly-6 gene products on mouse testicular leydig and sertoli cell lines. *Journal of Autoimmunity*, *3*(4), 457–471. [https://doi.org/10.1016/s0896-8411\(05\)80013-7](https://doi.org/10.1016/s0896-8411(05)80013-7)
- Tung, P. S., Rosenior, J., & Fritz, I. B. (1987). Isolation and culture of RAM rete testis epithelial cells: structural and biochemical characteristics1. *Biology of Reproduction*, *36*(5), 1297–1312. <https://doi.org/10.1095/biolreprod36.5.1297>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szgyarto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., . . . Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Upadhyaya, M., Hibbard, B. M., & Walker, S. M. (1984). Antisperm antibodies and male infertility. *British Journal of Urology*, *56*(5), 531–536. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.1984.tb06272.x>
- Van Montfort, R., Slingsby, C., & Vierlingt, E. (2001). Structure and function of the small heat shock protein/ α -crystallin family of molecular chaperones. *Advances in Protein Chemistry*, 105–156. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(01\)59004-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(01)59004-x)
- Vickram, A. S., Dhama, K., Chakraborty, S., Samad, H. A., Latheef, S. K., Sharun, K., Khurana, S. K., K, A., Tiwari, R., Bhatt, P., K, V., & Chaicumpa, W. (2019). Role of antisperm antibodies in infertility, pregnancy, and potential for contraceptive and antifertility vaccine designs: research progress and Pioneering vision. *Vaccines*, *7*(3), 116. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030116>
- Vogt, P. H. (1998). Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*, *4*(8), 739–744. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.8.739>
- Voisin, G. A., Toullet, F., & Almeida, M. D. (1975). CHARACTERIZATION OF SPERMATOZOAL AUTO-, ISO- AND ALLO-ANTIGENS. *European*

Journal of Endocrinology, 80(2_Suppl), S173–S201.
<https://doi.org/10.1530/acta.0.080s173>

- Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W., & Povey, S. (2002). Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics*, 79(4), 464–470. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6748>
- Wakimoto, Y., Chen, Y., Honda, H., & Shibahara, H. (2024). Advancements in the detection and implications of sperm-immobilizing antibodies in female infertility. *Journal of Reproductive Immunology*, 164, 104256. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2024.104256>
- Wang, B., Moon, S. P., Cutolo, G., Javed, A., Ahn, B. S., Ryu, A. H., & Pratt, M. R. (2023). HSP27 Inhibitory Activity Against Caspase-3 Cleavage and Activation by Caspase-9 Is Enhanced by Chaperone O-GlcNAc Modification in Vitro. *ACS Chemical Biology*, 18(8), 1698–1704. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00270>
- Wang, C., Baker, H. G., Jennings, M. G., Burger, H. G., & Lutjen, P. (1985). Interaction between human cervical mucus and sperm surface antibodies. *Fertility and Sterility*, 44(4), 484–488. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48916-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48916-8)
- Wang, K., Gao, Y., Wang, C., Liang, M., Liao, Y., & Hu, K. (2022). Role of oxidative stress in varicocele. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.850114>
- Wang, X.-Y., Chen, X., H. Manjili, M., Repasky, E., Henderson, R., & R. Subject, J. (2003). Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Research*, 63(10), 2553–2560. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12750279/>
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., DiCuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., . . . Yaschenko, E. (2007). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 36(Database), D13–D21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1000>
- Wieske, M., Benndorf, R., Behlke, J., Dölling, R., Grelle, G., Bielka, H., & Lutsch, G. (2001). Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and α B-crystallin inhibit actin polymerization. *European Journal of Biochemistry*, 268(7), 2083–2090. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02082.x>
- Williams, A., & Ford, W. (2004). Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm1. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1309–1316. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028407>

- Wilson, L. (1954). Sperm agglutinins in human semen and blood. *Experimental Biology and Medicine*, 85(4), 652–655. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20982>
- Witkin, S. S. (1999). Immunity to heat shock proteins and pregnancy outcome. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 7(1–2), 35–38. <https://doi.org/10.1155/s1064744999000083>
- Witkin, S. S., & Chaudhry, A. (1989a). Association between recurrent spontaneous abortions and circulating IgG antibodies to sperm tails in women. *Journal of Reproductive Immunology*, 15(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(89\)90034-x](https://doi.org/10.1016/0165-0378(89)90034-x)
- Witkin, S. S., & Chaudhry, A. (1989b). Relationship between circulating antisperm antibodies in women and autoantibodies on the ejaculated sperm of their partners. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(4), 900–903. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90747-3](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90747-3)
- Witkin, S. S., & Linhares, I. M. (2009). Heat shock proteins and fertility. In *Heat shock proteins* (pp. 151–162). https://doi.org/10.1007/978-90-481-3381-9_9
- Witkin, S. S., Neuer, A., Giraldo, P., Jeremias, J., Tolbert, V., Korneeva, I. L., Kneissl, D., & Bongiovanni, A. M. (1997). Chlamydia trachomatis Infection, Immunity, and Pregnancy Outcome. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 5(2), 128–132. <https://doi.org/10.1155/s1064744997000203>
- Wolff, H., Neubert, U., Volkenandt, M., Zöchling, N., Schlüpen, E., Bezold, G., & Meurer, M. (1994). Detection of Chlamydia trachomatis in semen by antibody-enzyme immunoassay compared with polymerase chain reaction, antigenenzyme immunoassay, and urethral cell culture. *Fertility and Sterility*, 62(6), 1250–1254. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)57194-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)57194-5)
- Wu, W., & Welsh, M. (1996). Expression of the 25-kDa Heat-Shock Protein (HSP27) Correlates With Resistance to the Toxicity of Cadmium Chloride, Mercuric Chloride,-Platinum(II)-Diammine Dichloride, or Sodium Arsenite in Mouse Embryonic Stem Cells Transfected With Sense or Antisense HSP27 cDNA. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141(1), 330–339. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0290>
- Wyciszkievicz, A., Kalinowska-Łyszczarz, A., Nowakowski, B., Kaźmierczak, K., Osztynowicz, K., & Michalak, S. (2019). Expression of Small Heat Shock Proteins in Exosomes From Patients With Gynecologic Cancers. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46221-9>
- Xun, W., Shi, L., Cao, T., Zhao, C., Yu, P., Wang, D., Hou, G., & Zhou, H. (2015). Dual functions in response to heat stress and spermatogenesis: characterization of expression profile of small heat shock proteins 9 and 10 in GOAt testis. *BioMed Research International*, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/686239>

- Yeganeh, L. M., Moini, A., Hemmat, M., Yazdi, R. S., Lankarani, N. B., Khodabakhshi, S., & Behbahanian, A. (2017). The association of different auto-antibodies against ovarian tissues and gonadotropins and poor ovarian response in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Human Fertility*, 20(2), 126–131. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1278632>
- Zeng, L., Tan, J., Lu, W., Lu, T., & Hu, Z. (2013). The potential role of small heat shock proteins in mitochondria. *Cellular Signalling*, 25(11), 2312–2319. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.027>
- Zimmerman, J. L., Petri, W., & Meselson, M. (1983). Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell*, 32(4), 1161–1170. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90299-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90299-4)
- Zini, A., Lefebvre, J., Kornitzer, G., Bissonnette, F., Kadoch, I. J., Dean, N., & Phillips, S. (2010). Anti-sperm antibody levels are not related to fertilization or pregnancy rates after IVF or IVF/ICSI. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2010.09.002>