

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО БИОЛОГИЯ

Владислав Владимиров Лазаров

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

АВТОРЕФЕРАТ

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

по професионално направление „4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ В ОБЛАСТ
НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ 4. ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И
ИНФОРМАТИКА“

Научна специалност: Имунология

Научни ръководители: Проф. д-р Димитрина К. Димитрова-Диканарова, дм
Проф. д-р. Недка Л. Трифонова, дм

Рецензенти: Проф. д-р Цв. Ц. Маринова, дмн
Доц. М. Д. Маркова, дб

СОФИЯ, 2017

Дисертационният труд съдържа 116 страници и е илюстриран с 36 микрофотографии, 15 фигури (една от които с 5 подфигури) и 4 таблици. Цитирани са 206 литературни източника, от които: 179 литературни източника на латиница и 27 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден от разширен катедрен съвет в Катедрата по биология на Медицински факултет, Медицински университет – София.

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

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 02.10.2017г. от 16:00 часа във Втора аудитория на Предклиничния университетски център, ул. „Здраве“ 2, МФ, МУ – София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ – София, пред **Научно жури в състав:**

Научно жури:

Проф. д-р Димитрина К. Димитрова-Диканарова, дм – научен ръководител на докторанта, вътрешен член

Доц. Майя Дянкова Маркова, дб, вътрешен член

Проф. д-р Цветанка Цанкова Маринова, дмн – МФ, при СУ, външен член

Доц. Мария Иванова Стаменова, дб, ИБИР, БАН, външен член

Доц. Маргарита Василева Моллова, дб, ИБИР, БАН, външен член

Резервни членове:

Проф. д-р. Недка Любомирова Трифонова, дм – научен ръководител на докторанта, вътрешен член

Доц. д-р. Иван Димитров Буланов, дм, МУ – София, външен член

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	6
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	24
ОБСЪЖДАНЕ	49
ИЗВОДИ	62
ПРИНОСИ	63
НАУЧНА АКТИВНОСТ СВЪРЗАНА С ДИСЕРТАЦИЯТА	65
ПРИЛОЖЕНИЕ – МИКРОСНИМКИ ОТ ТЪКАНИ НА ЕМБРИОНИ И ФЕТУСИ	66

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Списък на използваните съкращения

АК – аминокиселини

АПК – антиген представящи клетки

БАН – българска академия на науките

б.с. – белтъчно съдържание

г.с – гестационна седмица
ЗАЛС – заешки антилещен серум
МА – моноклонални антитела
СА – спермоантитела
СЗО – световна здравна организация
СОА – спермообличащи антитела
ФСХ – фоликулостимулиращ хормон
ЧСП – човешка семинална плазма
Ц – цитоплазма
Я – ядро
АВ – avidin–biotin
АLAbs – anti–lense antibodies; анти-лещени антитела
АSAbs – anti-sperm antibodies; анти-спермални антитела
ART - assisted reproductive technology; техники за асистирана репродукция
сDNA – complementary DNA; комплементарна ДНК
DAB – 3,3'-diaminobenzidine; 3,3'-диаминобензидин
ELISA – enzyme linked immunosorbay assay; ензимносвързан имуносорбентен метод
GAT - gelatin agglutination test; желатино аглутинационен тест на Кибрик
ICSI - intra-cytoplasmic sperm injection; интра-цитоплазмено спермално инжектиране
IEF – isoelectric focusing; изоелектрично фокусиране
IUI - intrauterine insemination; вътрематочна инсеминация
IVF – in vitro fertilization; ин витро оплждане
МНС – major histocompatibility complex; главен комплекс за тъканна съвместимост
OD- optical density; оптична плътност
OPD – orthophenylene diamine; ортофенилен диамин
PAGE - polyacryl amide gel electrophoresis; полиакрил амидна гел електрофореза
PCOS - polycystic ovary syndrome; синдром на поликситозните яйчници
PVC – polyvinyl chloride; поливинил хлорид
PVDF - polyvinylidene fluoride; поливинилиден флуорид
PBS - phosphate buffer saline; фосфатен буфер
PS – polystyrene; полистирен

SD – standard deviation; стандартно отклонение

SDS – sodium dodecyl sulphate; натриев додецил- сулфат

SIT - sperm immobilization test; спермоимобилизационен тест на Изожима

SIV – sperm immobilization value; спермоимобилизационно ниво

TAT – tray agglutination test; микроспермоаглутинационен тест на Фриберг

TEMED – tetramethylenediamine; тетраметилендиамин

TRIS – (hydroxymethyl) aminomethane; (хидроксиметил) аминометан

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

TTBS – tris buffered saline and Tween 20

ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

Пионерни са изследванията върху ролята на различни сперматозоидни антигени и имунен отговор срещу тях на научния колектив към Катедрата по биология под ръководството на Акад. Радой Попиванов. Наличието на спермоантитела в безплодни двойки са доказани от редица учени: S. Isojima, K. Kouyama (Димитрова Д., 2003), Voisin и други. Съществен принос в това научно направление имат и българските учени Д. Димитрова, М. Моллова, Р. Фичорова, С. Калайджиев, и др. (МУ – София и ИБИР, БАН).

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

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

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Да се проследи хуморалният имунен отговор срещу антигените в имунологична изолация (сперматозоидни антигени и нискомолекулния стресов протеин - алфа-В-кристалин) в семейни двойки с репродуктивни проблеми.

Задачи:

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

4. Проследяване на хуморалния имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация
 - а) изследване за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез аглутинационни, имобилизационни методи и ELISA
 - б) изследване за наличие на антитела срещу алфа-кристалини в серуми на пациенти с репродуктивни проблеми чрез ELISA

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Опитни животни

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

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

1.2. Антигени

- Recombinant Human Crystallin Alpha B (CRYAB human), ProSpec – Tany TechnoGene Ltd.
- Нормален човешки серум и лиофилизирана плазма от Национален център по хематология и трансфузиология.

1.3. Антитела

1.3.1. Имунен серум срещу алфа-, бета- и гама кристалинови фракции

(предоставени ми от д-р Н. Трифонова).

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

1.3.3. Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugated; rabbit anti-human IgG peroxidase conjugated, Sigma.

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

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

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

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

1.4.3. Серуми от пациенти

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

на размножаването към Катедрата по биология. Част от серумите ни бяха любезно предоставени от Проф. д-р Ватев. Контролните серуми бяха събирани в Лаборатория по имунология на размножаването към Катедрата по биология.

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

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

- 104 от фертилни жени (контроли) в репродуктивна възраст

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

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

- 60 фертилни жени (контроли) в репродуктивна възраст

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

2. Методи

1.1. Приготвяне на водно-солеви екстракти от очни лещи

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

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

надстояща течност бе използвана в двойна имунодифузия за търсене на кристалини от различните класове.

2.2. Хроматографско изолиране на фракции от водносолеви екстракти на човешки очни лещи

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

2.3. Имунизация на зайци за получаване на хиперимунен серум срещу алфа кристалин – проведена в ИБИР, БАН.

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

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

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

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

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

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

2.4. Определяне на белтъчно съдържание на екстракти

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

2.5. Имунохистохимична оцветяваща техника

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

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

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

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

3. Депарафиниране и рехидратиране

3.1. депарафиниране чрез процедури на преминаване на препаратите през:

ксилол 1 – 10 мин.

ксилол 2 – 10 мин.

ксилол 3 – 10 мин.

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

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

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

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

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

- Миене 3 х 5 мин. с PBS в кювета.

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

- Миене 3 х 5 мин. с PBS 1 х

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

- Миене 3 х 5 мин. с PBS 1 х

- Проявяване с DAB :

– 5 ml d H₂O + 2 капки буфер – разбърква се + 4 капки от р-р на DAB разбърква се + 2 капки H₂O₂ - разбърква се, накапва се върху средата до покафеняване и реакцията се стопира с d H₂O

(проявяването се осъществява на тъмно)

- Оцветява се с Nematohu₁lin неразреден за 25 сек. И

изплакване с чешмяна вода – 10 – 15 мин.

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

- Ксилол 4 и Ксилол 5 – x 5 мин.

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

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

2.6. Ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA)

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

Индиректната ELISA протича в следните основни етапи:

1. натоварване на ямките на плаката с антиген (антигенът се свързва неспецифично към пластмасовите ямки)
2. блокиране на останалите несвързани места в ямките чрез прибавяне на индиферентен белтък (напр. албумин, сухо мляко) или с Tween в неколкостратно по-голяма концентрация от тази в миешия буфер

3. инкубиране с антитяло (нарича се първо антитяло), най-често това е търсеното антитяло, или антитялото, което се охарактеризира
4. инкубиране с конюгирано с ензим антитяло (второ антитяло), свързващо се специфично с първото антитяло
5. прибавяне на субстрат и наблюдаване на цветна реакция
6. след стопиране с 10% сярна киселина отчитане при дължина на вълната 492nm.
7. Между отделните стъпки плаките се измиват трикратно за отстраняване на несвързаните реагенти (антигени и антитела) с миеш буфер

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

Антигенът бе накапван върху 96-ямкова PVC плака (U-bottom, Costar, Cambridge, USA) по 50 μ л/ямка антиген разтворен в 0,05 М карбонатен буфер ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, pH 9,6) и плаките бяха инкубирани на стайна температура 1 час и на 4⁰С за 16-18 часа. Използвани бяха следните антигени: хроматографски пречистен алфа кристалин с б.с.7 $\mu\text{g/ml}$; нормален човешки серум и алфа кристалин в падащи разреждания.

- След трикратно измиване с миеш 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 μ л/ямка блокиращ буфер (0,2% Tween 20 /PBS) за 60 мин.
- След трикратно промиване с миеш разтвор, плаките бяха инкубирани за 120 мин. на стайна температура с по 50 μ л/ямка от антисерума в падащи разреждания (в блокиращ буфер) за титриране на серума и в постоянно разреждане срещу антигени в падащо разреждане.
- Плаките бяха отново промити и инкубирани за 60 мин. на стайна температура с по 50 μ л /ямка анти-заешко IgG, белязано с пероксидаза в подходящо разреждане в блокиращ буфер.
- След трикратно промиване ензимната активност бе проявена с по 50 μ л/ямка разтвор на o-phenyldiamine (OPD) (Sigma, USA) в цитратен буфер (pH 5,0), съдържащ 0,015% H_2O_2 , стопиране с 10% сярна киселина и оптичната плътност бе отчетена на ELISA-ридер (Labsystems Multyscan) при дължина на вълната 492 nm.

За доказването на анти-лещените антитела (ALAbs) бе приложен ензим-свързан имуносорбентен тест, адаптиран за целта от нас. След адсорбиране на антигена на натоваарените протеинсвързващи места на плаката бяха блокирани за 60 минути на 37°C с 150 мкл на ямка 0,2% Tween 20 /PBS. Изследваните серуми, предварително разредени 1:100 в PBS, бяха накапвани в обем по 50 мкл на ямка. OD стойностите на серумите от контролната група бяха използвани за определяне интервала на физиологичното ниво на серумни имуноглобулини, реагиращи с антигените на очната леща. OD стойности, по-високи от средната стойност на OD на контролната група плюс два пъти стандартното отклонение бяха приети за сигнификантно повишени спрямо физиологичното ниво и серумните проби бяха отчетени като високо-титърни положителни за анти-лещени антитела.

За доказване на анти-сперматозоидни антитела чрез ELISA сперматозоиди бяха имобилизирани на PVC плаки, предварително третирани с poly-L-lysine Hydro bromide, и след това фиксирани с 30% метанол. ELISA индекс I беше определен по формулата $I = A/B$, където A е оптичната плътност на тестирувания серум, а B е средната стойност на оптичната плътност на всички серуми от тестираната група;

Определена бе бариерна стойност за ELISA $I_b = \bar{x} + 2SD$, където \bar{x} е средната стойност на оптичната плътност на серумите от контролната група, а SD е стандартното отклонение. Серуми с $I \geq I_b$ бяха приети за положителни.

Буфери:

Цитратен буфер, pH 5.0:

1.03g лимонена киселина, 3.67g Na₂HPO₄, 100ml dH₂O.

PBS pH 7.2:

0.24g KH₂PO₄ 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 8.0g NaCl, 1L dH₂O.

Блокиращ буфер, pH 5.8-8.2:

1% телешки албумин в буфера (1.21g Tris HCl, 2.94g NaCl, 100ml dH₂O).

Карбонатен буфер, pH 9.6:

0.159g Na₂CO₃, 0.293g NaHCO₃, 100ml dH₂O

2.7. Методи за доказване на антитела срещу сперматозоиди

Освен чрез ЕЛИЗА антитела срещу сперматозоидни антигени могат да бъдат установени чрез голям брой методи при изследване на кръвен серум, семинална плазма, сперматозоиди и цервикален мукус в специализирани центрове по репродуктивна медицина. Голяма част от тези методи са включени като стандартни протоколи в съответни издания на Световната Здравна Организация (Rose et al., 1976; WHO Reference Bank for Reproductive Immunology, 1977). Методите за доказване на спермоантителата (AS Abs) са описани детайлно от други автори и модифицирани в нашата лаборатория. При всички тестове за СА бяха използвани "swim up" сперматозоиди от здрави донори.

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

2.7.1. Спермоаглутинационни тестове

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

участващите в реакцията аглутиногени. Счита се, че СА, предизвикващи аглутинация от типа t-t, са главно от IgG клас и се доказват по-добре с теста на Kibrick, докато аглутинацията от типа h-h се свързва с антитела от IgM клас и GAT е относително нечувствителен за откриването ѝ (Shulman, 1986). Тестът на Friberg- TAT, е чувствителен метод за доказване на спремоаглутинини от двата типа. Методът, който ние използваме е микроспермоаглутинационен тест на Фриберг, който дава възможност за качествена оценка (като тип на аглутинацията) и количествена оценка (титър) на спермоаглутинационната активност на изследвания серум.

2.7.1.1. Аглутиниращ тест на Фриберг (TAT)

В ямките на микротитърни плаки на Terassaki бяха накапвани по 5 мкл серуми, тествани в падащи разреждания. Повърхността на плаката беше покрита с течен парафин с помощта на Пастъорова пипета. Донорна нормоспермична еякулатна проба бе втечнявана на 37°C за 30 минути и разреждана с 0,1% разтвор на глюкоза в PBS, рН 7,2 до крайна концентрация на сперматозоидите $40 \cdot 10^6$ /мл. Глюкозният разтвор бе внимателно надслояван с тънка пастъорова пипета над спермалната проба, която след това беше поставяна в термостата при 37°C за 1 час под ъгъл 45°. Към всяка ямка под парафина бяха накапвани по 1 мкл от аспирирания надстоящ слой на спермалната проба (счита се, че подвижните жизнени сперматозоиди са “изплували” в горния надслоен глюкозен пласт, наречен “swim up” феномен). Накапването се извършваше чрез спринцовката на Хамилтон, като се започваше от най-малкото серумни разреждане и между отделните серуми се изхвърлят по две стъпки (2 мкл). Плаката бе инкубирана за 1 час при 37C и резултатът отчитан под инвертен микроскоп. Определян беше типът на аглутинацията и степента на аглутинацията. Като контроли бяха използвани: PBS, отрицателен серум, познат положителен серум, предварително титриран.

2.7.2. Спермо-имобилизиращ тест на Изожима (SIT)

Основното явление, което се отчита, е имобилизацията на сперматозоидите с участието на комплемент, т.е. откриват се антитела от IgM и IgG (без IgG4 субклас) класове, които могат да фиксират комплемента. За позитивиране на тези тестове от значение е и мястото на свързване на антителата върху

сперматозоидната повърхност. Много антитела срещу антигени на сперматозоидната главичка не водят до загуба на подвижността, макар, че намаляват способността за пенетрация в клетката.

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

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

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

2.8. Двойна имунодифузия по Ухтерлони

Приложен бе микровариант на метода двойна имунодифузия в агаров гел по Ухтерлони. Върху диапозитивни стъкла 37/35 мм бе разливан 1% разтвор на агар Difco Laboratories във физиологичен разтвор при дебелина на слоя 1.5 мм. След втвърдяването на гела бяха изрязани ямки с диаметър 6 мм на разстояние 5 мм по шаблон. Пробите бяха инкубирани 12 часа на стайна температура и 48 часа

в хладилник във влажна камера. След промиване на плаките във физиологичен разтвор 48 часа, те бяха изсушени в термостат под филтърна хартия и оцветени с 0.5% с Coomassie brilliant blue R-250.

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

За отстраняване на "неспецифично" взаимодействащите антитела в поликлоналният заешки серум с протеини, намиращи се в нормалния човешки серум бе осъществена абсорбция на заешкия серум с нормален човешки серум и с нормален миши. За целта към 5 мл от имунния заешки серум беше прибавено 500 мг суха кръвна плазма и съответно равен обем миши серум. Сместа бе инкубирана за една нощ на 4⁰С. На следващия ден серумът бе центрофугиран на 5000 об. за 20 мин, за да се отделят получените агрегати от комплексите антиген-антитяло.

2.10. SDS-PAGE

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

Използвани бяха следните буфери и разтвори:

Буфер за разделящия гел рН 8.8 (4 пъти концентриран)

Трис 18.16 g в 50 ml дест вода; корекция на рН с 1 M HCl;

10% SDS 4 ml;

довеждане до 100 ml с дест. вода

Буфер за концентриращия гел рН 6.8 (4 пъти концентриран)

Трис 6.056 g в 50 ml дест вода; корекция на рН с 1 M HCl;

10% SDS 4 ml;

довеждане до 100 ml с дест. вода

Електрофоретичен буфер рН 8.3

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

Буфер за пробите за електрофореза при редуциращи условия

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

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

Буфер за пробите за електрофореза при нередуциращи условия

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

Оцветяващ разтвор

Coomassie Brilliant Blue – 0.5 g	
CH ₃ OH	100 ml
CH ₃ COOH	20 ml
Дестилирана вода	80 ml

Обезцветяващ разтвор

CH ₃ OH	180 ml
CH ₃ COOH	40 ml
дест. вода	220 ml

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

Running gel 12%

- Acrylamid 2400 µl

- Running buffer 1500 μ l
- Aqua distillata 2070 μ l
- Am. Persulfate 10 % - 30 μ l
- TEMED 6 μ l

Буфер за концентриращия гел 4.5%

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

Основни стъпки

Касетата бе сглобявана по указанията на фирмата производител (LKB)

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

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

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

2.11. Western блот

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

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

Буфери

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

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

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

Основни стъпки:

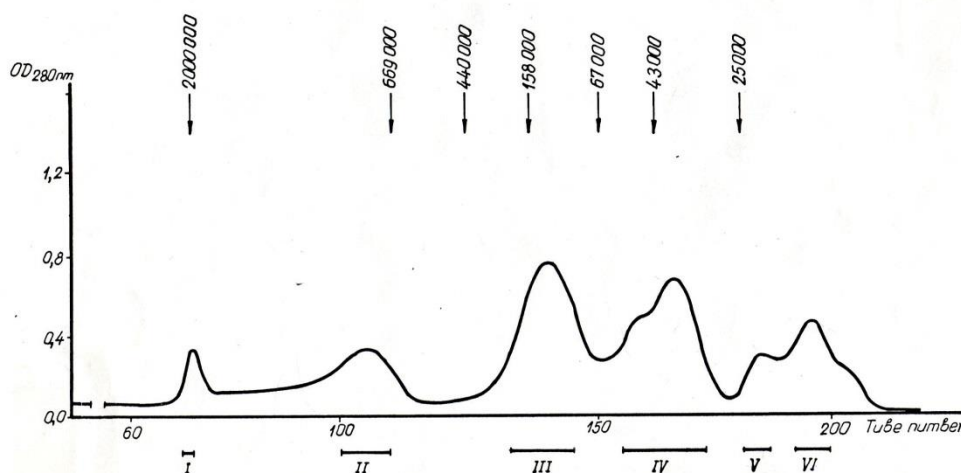
- След приключване на разделянето (чрез PAGE), гелът се инкубира за 10 мин. в буфер за пренос
- В буфера за пренос се сглобява “сандвич”, съставен от 3 броя филтърна хартия Whatman, нитроцелулозната мембрана, гела, 3 броя филтърна хартия Whatman.
- “Сандвичът” се поставя в електроблотера ориентиран по следния начин: катод - филтърна хартия – гел - мембрана – филтърна хартия – анод.
- Преносът се осъществява при 0,8 mA на кв. см. за около 1 час.
- След края на преноса, мембраната се оцветява с разтвор на Ponceau S и след оценка на преноса, багрилото се отмива с дестилирана вода.

- Нитроцелулозната мембрана се поставя за 1 час в блокиращ буфер при 37⁰С за блокиране на свободните белтък-свързващи места.
- Инкубиране за 2 часа със съответните антитела при 37⁰С.
- След трикратно измиване по 10 мин. с ТТBS, мембраната се инкубира с второ ензим-белязано антитяло за 1 час при 37⁰С.
- Следва ново измиване – двукратно с ТТBS и еднократно с ТBS.
- Реакцията се визуализира чрез инкубиране на мембраната с хромогенен субстрат (например при ензим пероксидаза субстратът е DAB или АЕС (3-amino-9-ethylcarbazole), разтворени в 1 мл диметилформаид и прибавени на капки към 4 мл Na-ацетат (0,1 М; рН 4,0) и 20 µl H₂O₂.

РЕЗУЛТАТИ

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

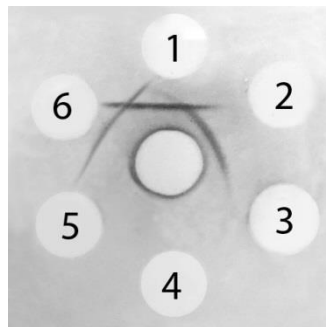
За изолиране на алфа-кристалини от екстракти на човешки и свински очни лещи бе приложена гелна хроматография върху Biogel A5m.



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

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

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

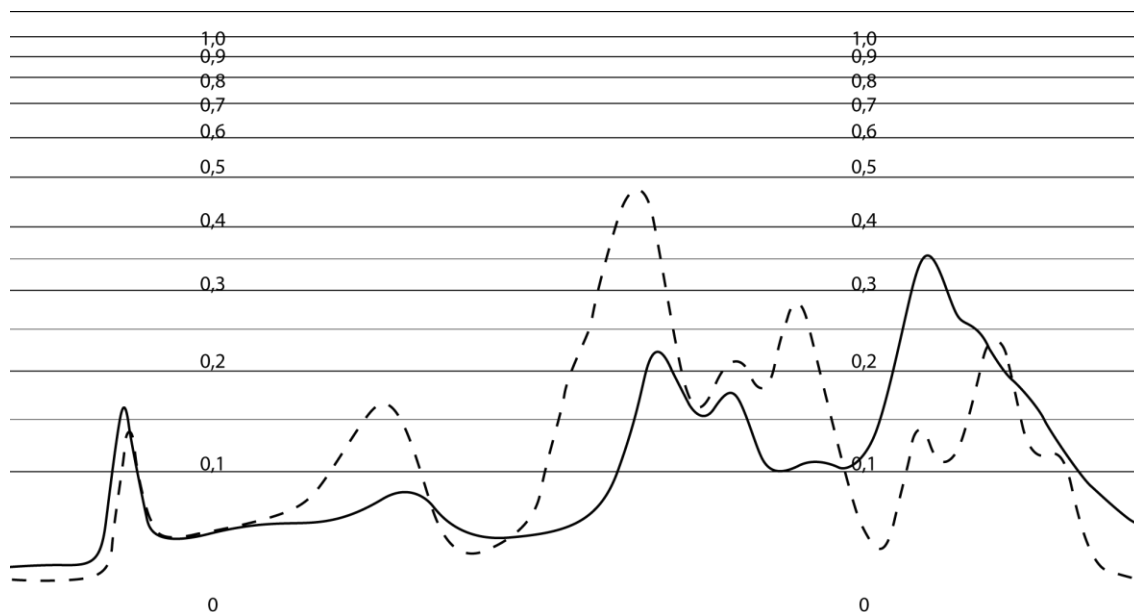


Фиг. 2 Двойна имунодифузия в агаров гел

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

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

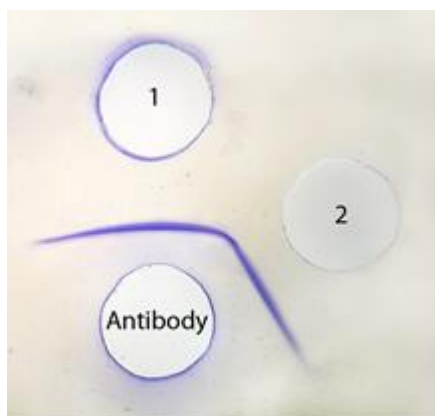
За преодоляване на това ограничение проведохме сравнителни хроматографски експерименти със екстракти от човешка и свинска очна леща (фиг. 3)



Фиг. 3. Гелна хроматограма на водно-солеви екстракти от свински лещи (отбелязани с пунктир) и от фетални човешки очни лещи (отбелязани с непрекъсната линия) върху Biogel A5m. Размери на колоната 2,6/104, нанесена проба от 2 ml, с белтъчно съдържание 80 mg, елуентен разтвор 0,05M TRIS буфер рН 7,2, скорост на изтичане на елуата 2,5 ml/min, обем на елуата в епруветка по 5ml. Върху абсцисата са представени поредните фракции (от 60-та до 210-та).

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

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

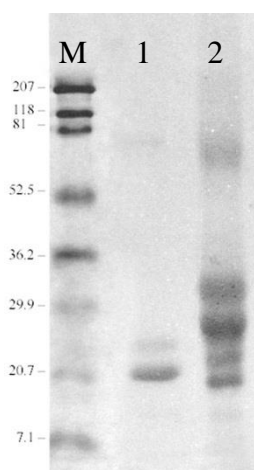


Фиг. 4. Двойна имунодифузия по Ouchterlony в 1% агаров гел. В централната ямка е накапан серум, съдържащ антитела срещу изолирани алфа-кристалини на човешка очна леща. В ямка 1 е накапан α -кристалин от човешка очна леща, а в ямка 2 – α -кристалин от свинска очна леща.

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

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

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



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

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

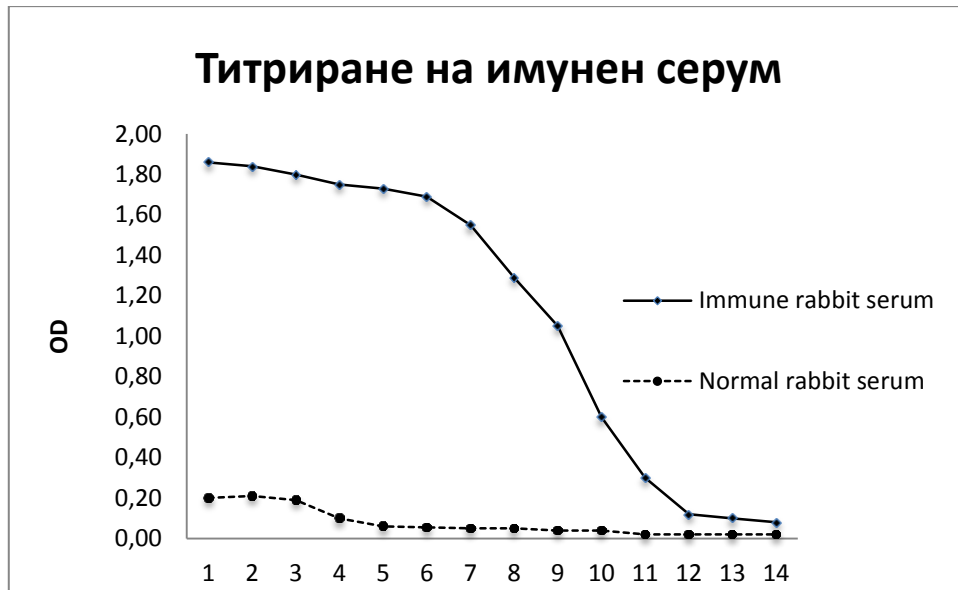
2. Получаване и характеризирание на заешки хиперимунен серум срещу хроматографски пречистения алфа-кристалин на свинска очна леща

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

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

2.1. Определяне титъра на серума

Титърът на серума беше определен чрез тестиране в падащи разреждания срещу постоянни концентрации на антигена (алфа-кристалини) с използване на ензимносвързания имуносорбентен метод (ELISA). 96 ямкова полистиренова (PS) плака бе натоварена с алфа-кристалин с белтъчно съдържание 5 μ g/мл в 0.05M карбонатен буфер рН 9,6. Полученият имунен серум е накапан в двукратни повторения в падащи разреждания от 1/100 до 1/800000. Като контрола е използван в същите падащи разреждания серум, получен от заека преди започване на имунизацията. Резултатите от титрирането на серума са представени на фиг . 6.



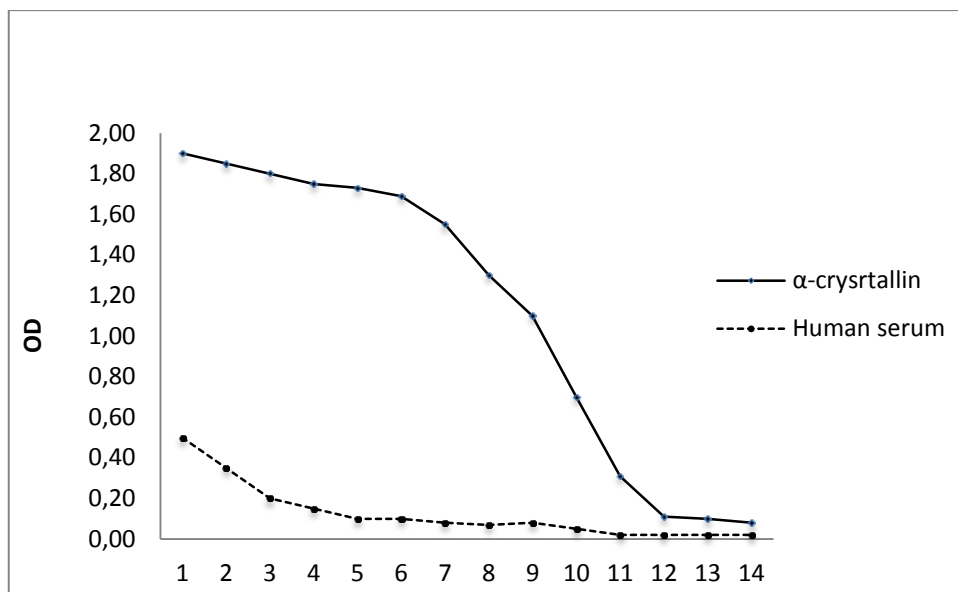
Фиг. 6. Тестиране на имунния заешки серум (като контрола – неимуен заешки серум, получен от заека преди започване на имунизацията) в падащи разреждания от 1:100 до 1:800 000 срещу алфа-кристалин с постоянна концентрация – 5мкг/мл

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

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

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

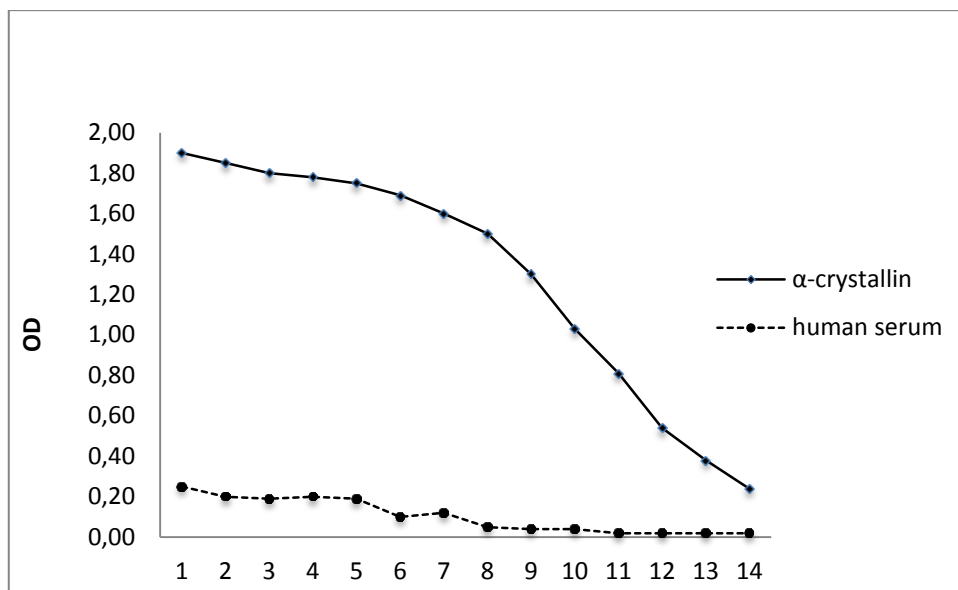
За да се провери наличието на кръстосано реагиращи антитела или на антитела с други специфичности в заешкия имуен серум, същият бе тестиран чрез ELISA срещу падащи разреждания на нормален човешки серум и съответния антиген (алфа-кристалин) (фиг. 7.)



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

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

За целта към 1 мл от имунния заешки серум беше прибавено еквивалентно количество нормален човешки серум и сместа бе инкубирана за една нощ на 4⁰С. На следващия ден серумът бе центрофугиран, за да се отделят получените агрегати от комплексите антиген-антитяло. Преинкубираният по този начин серум тестирахме чрез ELISA срещу антигените – алфа-кристалин и нормален човешки серум, накапани на плаката в падащи разреждания от 50 до 0,05 µg/ml. Представената на фиг. 7 графика доказва, че след преабсорбцията, имунният заешки серум не притежава реактивност срещу нормален човешки серум, а дозо-зависима крива срещу антигена алфа-кристалин доказва запазване на високата специфичност на имунния серум срещу съответния му антиген.



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

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



Фиг.8а. Имуноблот на разделен чрез SDS PAGE електрофореза алфа-кристалин трансфериран върху нитроцелулозна мембрана и проявен 1. С

произведен от нас имунен серум срещу алфа-кристалин 2. имунен серум срещу алфа-кристалин на фирмата Santa Cruz (анти-CRYAB).

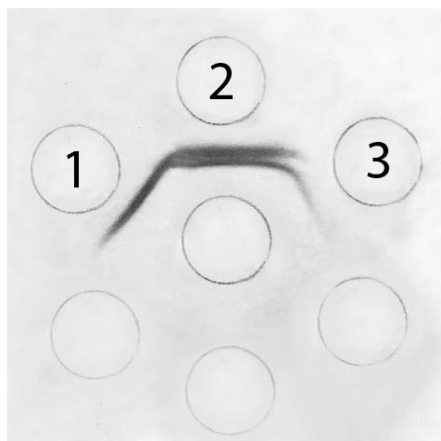
3. Проследяване експресията на алфа-кристалини в ембрионални и фетални човешки тъкани

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

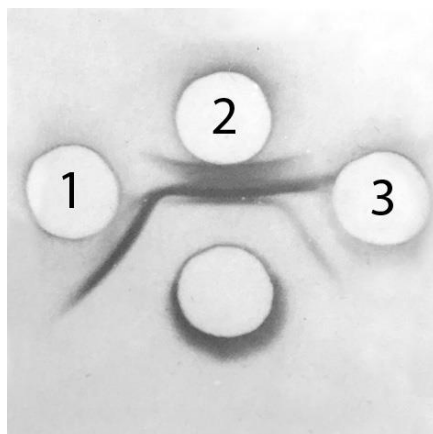
За да се установи най-ранната експресия на кристалините в очната леща и съставът им в онтогенезата бяха приготвени екстракти от лещи на възраст – 5 и 6-та гестационна седмица, както и от възрастни човешки лещи. Екстрактите са приготвени по метода, описан в глава Материали и методи.

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

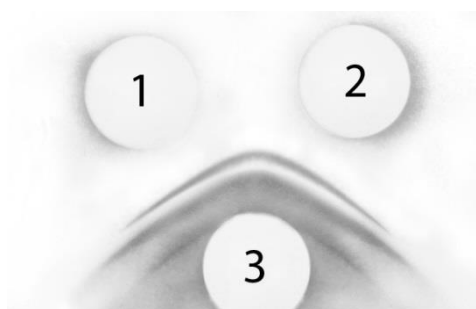
Екстрактите бяха тествани чрез двойна имунодифузия в 1% агар във физиологичен разтвор с използването на заешки хиперимунен серум срещу пълен екстракт на човешка очна леща.



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



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



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

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

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

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

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

В много от ембрионалните тъкани се наблюдава позитивна реакция

- първа фарингеална дъга: позитивни първични ядки на вкостяване, позитивни ядра и цитоплазма на клетките на повърхностния епител на лигавицата; отрицателни ядра и цитоплазма на клетките в подлежащите слоеве и в подлежащата съединителна тъкан; преобладаващата част от ядрата и цитоплазмата на мускулните клетки са силно позитивни, само единични ядра са негативни (снимка 1а).
- в епитела на носна лигавица, включително олфакторен епител се наблюдава позитивиране на почти всички ядра в герминативния и повърхностен слой и на ядра от останалите слоеве, както и позитивна зърнистост в цитоплазмата на епителните клетки (снимка 2а).
- силно позитивни ядра и цитоплазма на зачатъка на зъб и на повърхностния слой епител на лигавицата (снимка 3а)
- мозък – отрицателни ядра, положително оцветени аксони (снимка 4а)
- в тимуса се наблюдава слабо позитивна реакция (снимка 5а)
- дуктус кохлеарис – силно позитивни първични ядки на вкостяване в костния лабиринт (положителни ядра и цитоплазма), отрицателен перихондриум; преобладават отрицателни ядра и позитивна цитоплазма на клетките от ципестия лабиринт (снимка 6а)
- сърце и перикард – преобладават позитивни ядра, позитивна цитоплазма със зърнистост и стрираност; (снимка 7а)
- аортата е с позитивен ендотел, положителна съединителнотъканна обвивка, а клетките в туника медиа са с негативни ядра и позитивна цитоплазма (снимка 8а)
- бял дроб – отрицателен бронхиален епител (снимка 9а)

- черво – отрицателен епител (снимка 10а)
- ръка – позитивни ядра и цитоплазма на мускулни клетки, кожен епител и първични ядра на вкостяване, хрущял – негативен (снимка 11а)
- надбъбречна жлеза – слабо позитивна цитоплазма, преобладават отрицателни клетки (снимка 12а)
- мезонефрос – отрицателни ядра и цитоплазма (снимка 12а)
гонада (семенник) – единични позитивни клетки (цитоплазма); надсеменник – силно позитивни клетки на еферентните каналчета (снимка 12а)

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

- първа фарингеална дъга: отрицателни хондроцити, позитивен перихондриум, позитивни ядра и цитоплазма на повърхностния епител на лигавицата, отрицателни ядра и цитоплазма на подлежащите слоеве и съединителната тъкан; част от ядрата и цитоплазмата на мускулатурата са позитивни, (снимка 1б).
- в епитела на носна лигавица, включително олфакторен епител се наблюдава отрицателна реакция (снимка 2б).
- позитивни ядра и цитоплазма на зачатък на зъб и на повърхностния слой епител (снимка 3б).
- мозък – част от ядрата на невроните са позитивни, положително оцветени аксони (снимка 4б)
- в тимуса се наблюдава отрицателна реакция (снимка 5б).
- дуктус кохлеарис – отрицателни ядра и цитоплазма на хрущявите на лабиринта, липсват ядки на вкостяване, позитивен перихондриум; преобладават отрицателни ядра и цитоплазма на клетките от ципестия лабиринт (снимка 6б).
- сърце и перикард – преобладават позитивния ядра, позитивна цитоплазма със зърнистост и стрираност (снимка 7б).
- аорта позитивен ендотел, съединителнотъканна обвивка и негативни ядра и позитивна цитоплазма на клетките в туника медиа (снимка 8б).
- бял дроб – слабо позитивен бронхиален епител (снимка 9б).
- черво – позитивна цитоплазма на епитела (снимка 10б).

- ръка – позитивни ядра и цитоплазма на мускулни клетки, кожен епител , хрущял – негативен, позитивен перихондриум (снимка 11б).
- надбъбречна жлеза – позитивна цитоплазма и единични ядра (снимка 12б).
- мезонефрос – отрицателни ядра и цитоплазма (снимка 12б).
- гонади (семенник) – единични позитивни клетки (цитоплазма); надсеменник – силно позитивни клетки на еферентните каналчета (фиг. 12б).

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

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

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

- миокард – позитивни ядра и цитоплазма – със зърнистост и раираност (снимка 13б)
- мозък – позитивни ядра и цитоплазма (снимка 14б)
- тимус – позитивна цитоплазма на лимфоцитите; слабо позитивна цитоплазма на епителните клетки (снимка 15б)
- бъбрек - позитивна реакция в гломерулите, особено в капсулата и в епитела на извитите каналчета (снимка 16б)
- чревен епител – слабо позитивна цитоплазма на епитела (снимка 17б)
- черен дроб – позитивни ядрена и цитоплазмена реакция (снимка 18б)

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

Приложение – микроснимки от тъкани на ембриони и фетуси

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

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

		(+) Я		
Мезонефрос / метанефрос	(-)	(++)	(-) гломерули (+) Я и Ц на епител в извити каналчета	(+) гломерули, (+)капсула и мембрана (+) Я и Ц на епител в извити каналчета
Тестис	(-)	(-)		
Епидидимис	(+) Я и Ц	(+++) Я и Ц		
Чревен епител	(-)	(+) Ц	(-)	(+/-)
Черен дроб	0	0	(-) Я и Ц	(++) Я, (+) Ц

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

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

4.1.Изследване на хуморалния имуен отговор срещу сперматозоидни антигени

Тъй като антителата срещу сперматозоиди се различават по функция и по епитопите, които разпознават, бяха приложени различни тестове: за доказване на спермоаглутинационни антитела - микроспермоаглутинационен тест на Friberg (TAT), за спермоимобилизационни антитела - спермоимобилизационен тест на Изожима (SIT), а за различни антигени върху и под повърхността на сперматозоидите - ELISA. При метода ELISA са използвани меки полистеренови плаки, предварително обработени за повишаване на адхезивния капацитет с poly-L-lysine hydrobromid и натоварвани с по 50 мкл на ямка сперматозоидна суспензия (5×10^6 сперматозоида на мкл.).

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

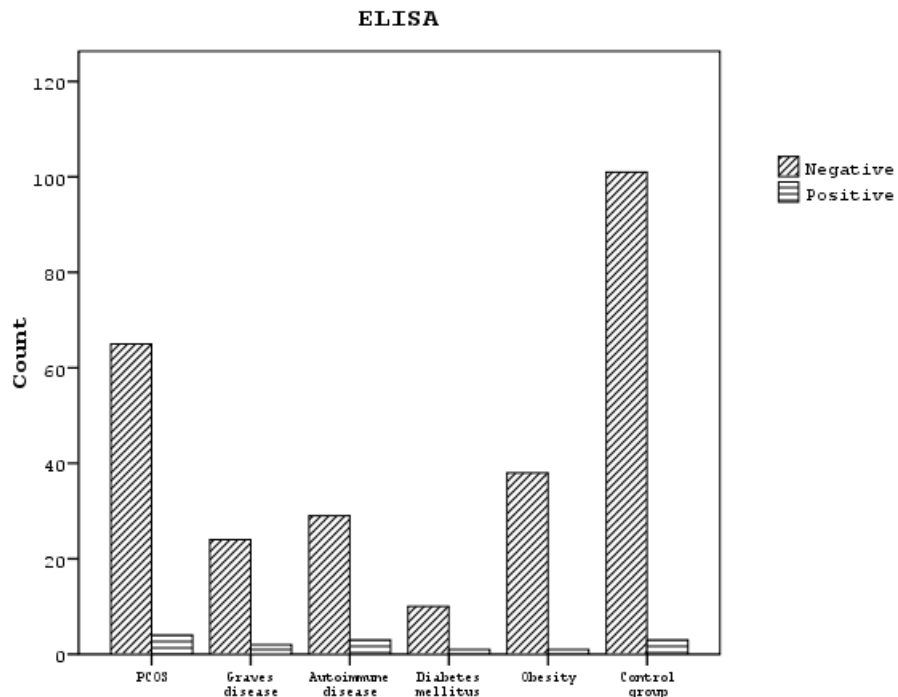
Изследвани бяха серуми от 104 фертилни и 107 пациентки с ендокринни заболявания, имащи отношение към репродукцията. Те бяха разделени в групи

както следва: синдром на поликистозни яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит, диабет тип I, затлъстяване.

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

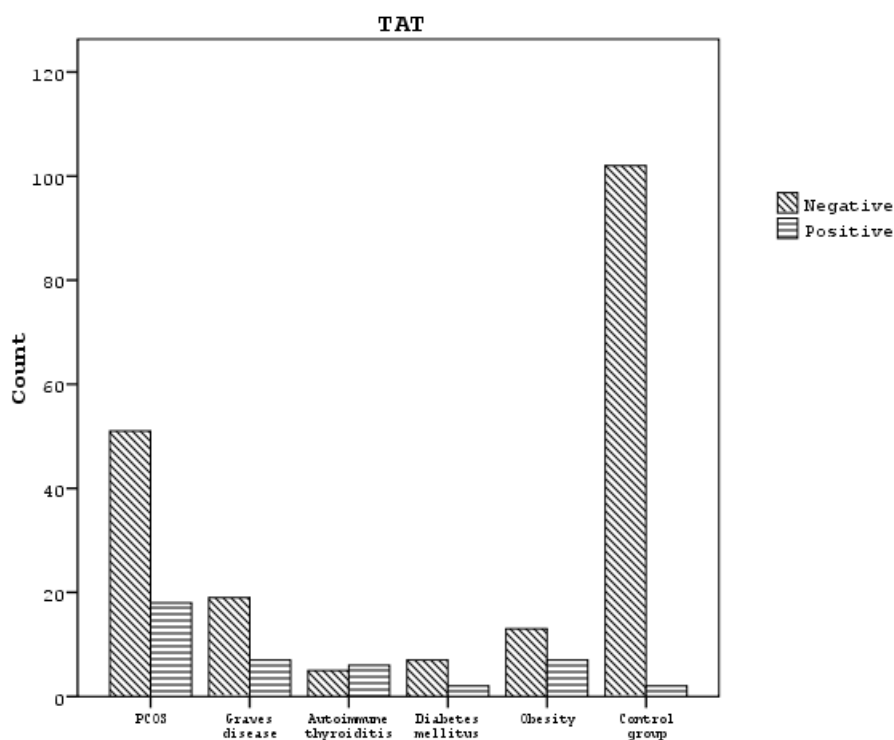
При изследването чрез ELISA на 177 пациентки с ендокринни заболявания положителни срещу сперматозоидни антигени бяха 11 (6,21%) (табл. 2, фиг. 9).

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



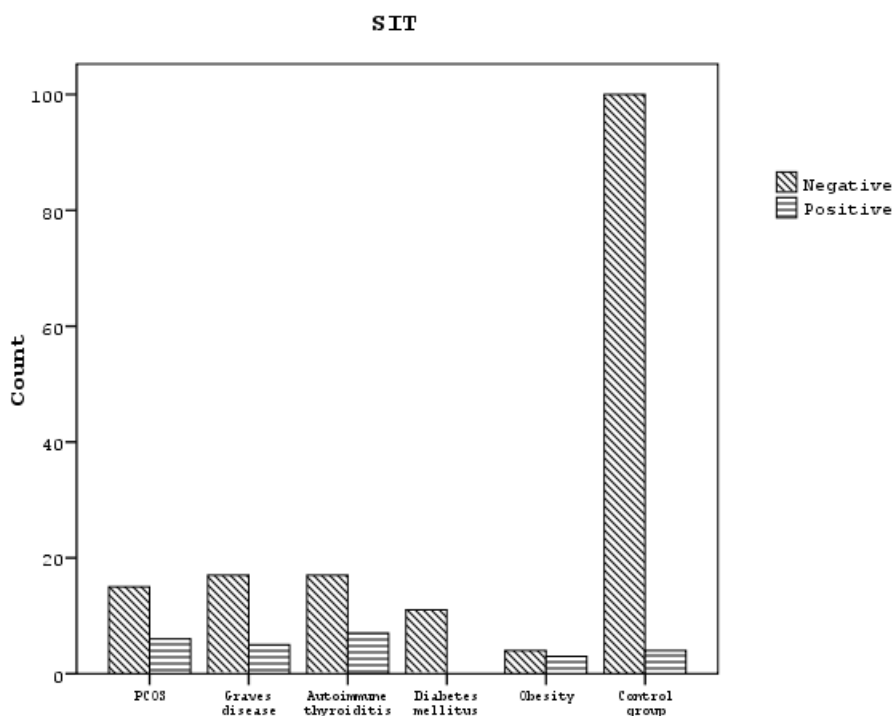
Фиг. 9. Честота на позитивните и негативни серуми, изследвана чрез ELISA в пациентските групи (синдром на поликистозните яйчници, тиреотоксикоза, автоимунен тиреоидит (болест на Хашимото), инсулин-зависим диабет (тип I), затлъстяване и контролната група.

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



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

При тестирането на 85 серума за наличие на антитела срещу сперматозоидни антигени чрез метода на спермоимобилизация (SIT) бе установено че, 21 серума (24,7%) проявяват спермоимобилизираща активност. При разделянето на пациентките по групи ендокринни заболявания бяха получени следните резултати: от 21 жени със синдрома на поликистозните яйчници 6 са позитивни (28,57%) и 15 са негативни; от 22 с тиреотоксикоза – 5 са позитивни (22,72) и 17 негативни; от 24 пациентки с аутоимунен тиреоидит позитивните са 7 (29,16%) срещу 17 негативни; от 11 пациентки с диабет тип I – всички бяха негативни; от жените със затлъстяване (7), позитивни са 3 серума (42,86%), а 4 са негативни. От изследваните 104 контролни серума 5 са положителни (4,81%) (фиг.11).



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

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

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

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

Изследването на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоидите при пациентките със синдрома на поликистозните яйчници чрез метода ELISA установи честота на положителни серуми 5,79%, която не се

различава статистически значимо от честотата на позитивните серуми (2,88%) при контролната група ($P > 0.05$, Chi-Square Tests). Изследването на серумите от пациентките със синдрома на поликистозните яйчници за антитела срещу антигени на сперматозоидите чрез методите TAT и SIT обаче, показва статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени ($P < 0.001$, Chi-Square Tests).

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

4.2.Изследване на хуморалния имуен отговор срещу алфа-кристалини в пациенти с репродуктивни проблеми

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

В ELISA концентрацията на антителата срещу α -кристалини е отчетената като оптична плътност (OD) при дължина на вълната 492 nm. Статистическият анализ е проведен с непараметричен метод. Контролната негативна група включва жени без репродуктивни проблеми. За позитивни са приети серумите с OD $>$ от средната стойност на контролната група + 2 пъти стандартното отклонение ($\bar{X} + 2SD$), а при стойности на OD по-ниски от тях, серумите се приемаха за

отрицателни. За сравняване нивото на OD, което е пропорционално на концентрацията на антителата в серумите на изследваните групи, бе използван теста на Mann-Whitney. За сравняване на честотите на положителните серуми в пациентските и контролната група бе използван Fisher's exact test.

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

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

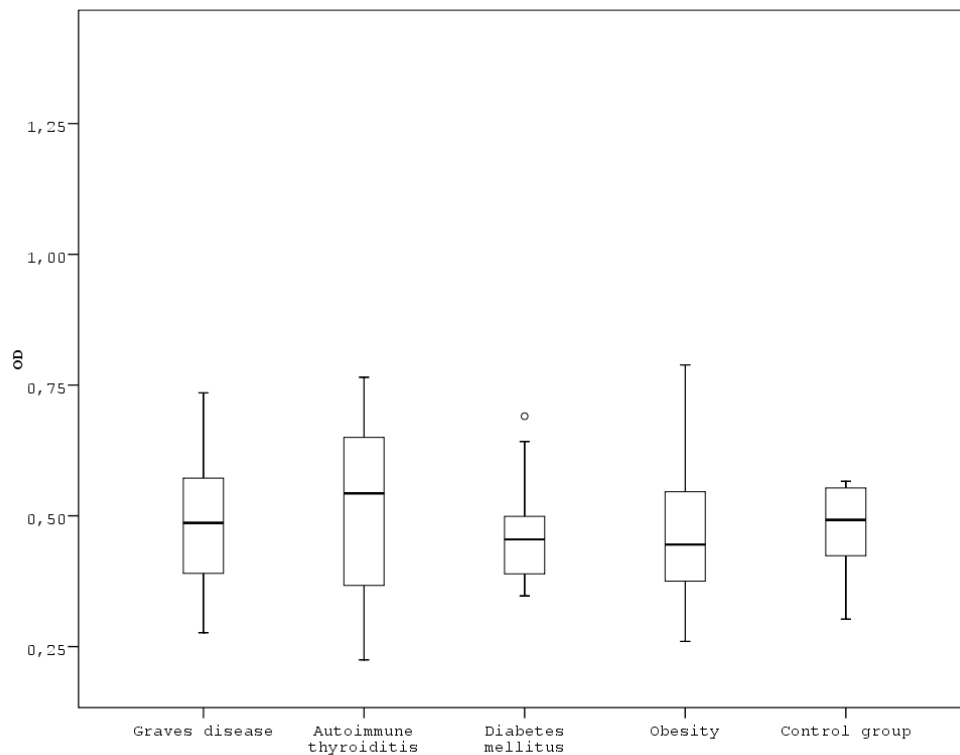
Заболяване	Брой изследвани пациенти	Концентрация на антителата (OD) и честота на позитивните пациенти	
		медиана OD _{492nm} (минимална-максимална стойност на OD)	Брой позитивни (%)
Болест на Graves	26	0.4865 (0.2765-0.7350) ^a	3 (11.5) ^b
Автоимунен тиреоидит	32	0.543 (0.2245-0.7650) ^a	8 (25) ^c
Захарен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

^a (P>0.05, Mann-Whitney test)

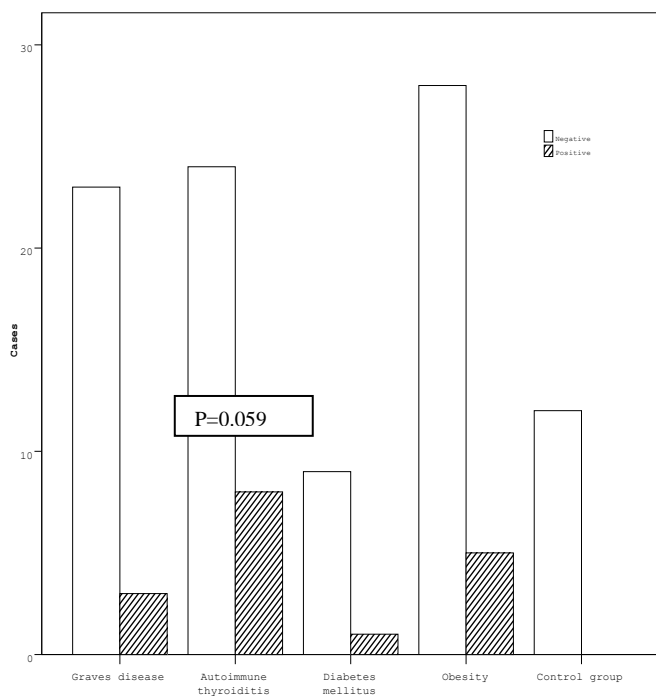
^b (P>0.05, Fisher's exact test)

^c P=0.059

Проведеният статистически анализ с използването на теста на Mann-Whitney показва, че не съществува достоверно повишаване на концентрацията на анти- α -кристалин антитела в серума на пациентките от всяка една група спрямо контролната група (P>0.05). Прави впечатление обаче, че при пациентките с автоимунен тиреоидит, честотата на позитивните серуми спрямо тази в контролната група е на границата на статистическата значимост (P=0.059) (табл.3).



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



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

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

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

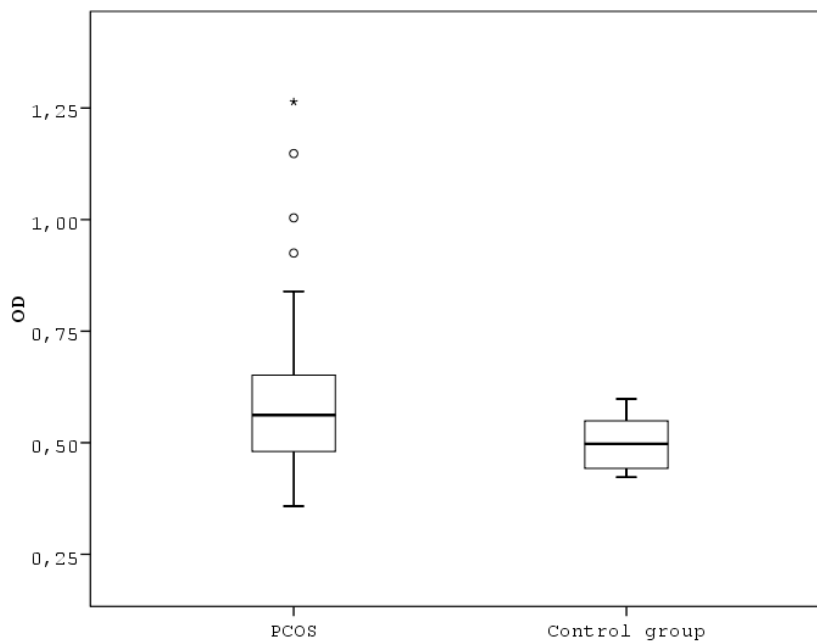
Таблица 4.

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

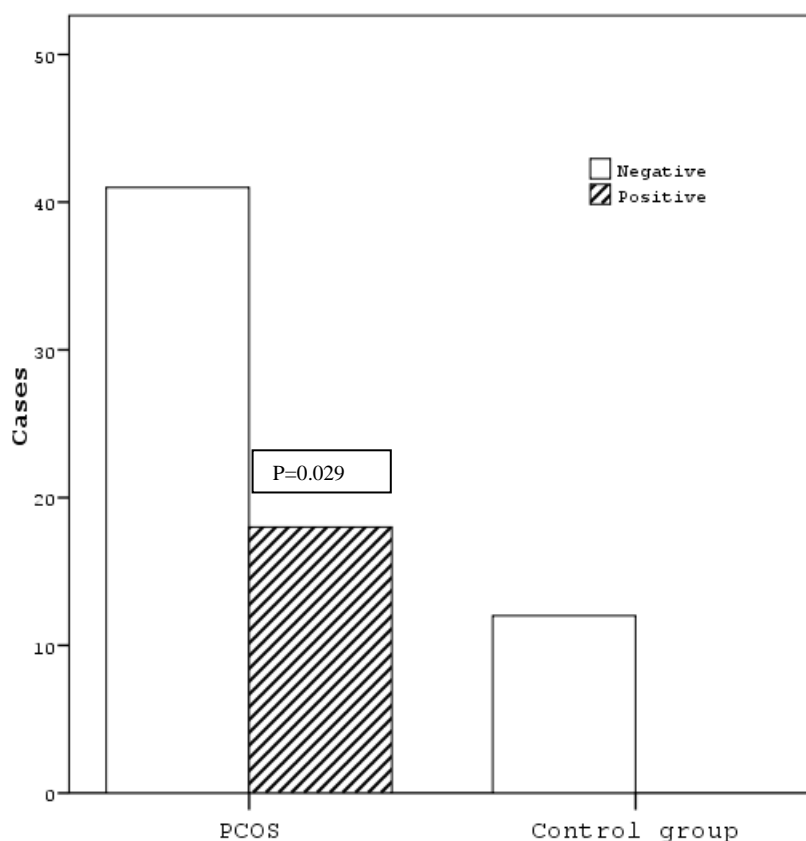
Заболяване	Брой тествани пациентки	Концентрация на антитела и процент позитивни пациенти	
		медиана OD _{492nm} (минимална-максимална стойност на OD)	Брой позитивни пациенти (%)
PCOS	59	0.6031 (0.3580 – 1.2640) ^a	15 (25.4) ^b
Контролна група	12	0.4979 (0.4230 – 0.5980)	0

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

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



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



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

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

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

ОБСЪЖДАНЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Фосфорилираната по серин 59 форма на α B-crystallin показва колокализация с цитоскелетните компоненти и действа като протектор на цитоскелета.

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

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

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

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

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

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

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

Според някои автори, α В-кристалинът притежава клетъчна и тъканно-специфична експресия и извън условия на стрес по време на развитието на организма. При бозайниците α В-кристалинът е основният белтък на очната леща, където е свързан с α A-crystallin (HspB4) в големи хетероолигомерни структури. Предполага се, че играе структурна функция, като участва в правилното подреждане на кристалините в лещените влакна, което осигурява прозрачността

и еластичността на очната леща според Трифонова, Н, 1985. В тъканите с висока степен на оксидативен метаболизъм при мишка и плъх – сърце, скелетни мускули, участъци на бъбреците нискомолекулните стресови протеини се експресират интензивно. Различията в степента на конститутивна експресия на алфаВ crystallin в тъканите на бозайници вероятно е свързано с механизмите на защита на белтъците на тези клетки срещу стрес или с изпълнението на специфични нейни функции.

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

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

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

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

Понастоящем методите за доказване на спермоантитела са рутинен диагностичен тест, заедно с другите класически и съвременни методи при изясняване причините за инфертилитет. В последните десетилетия в репродуктивната биология все по-голям интерес представляват изследванията върху друга група имунологично изолирани белтъци и тяхната роля в процесите на оплождане, ембриогенеза и протичане на нормална бременност. Това са

нискомолекулните стресови протеини, към които спада алфаВ кристалинът, който се намира в особена имунологична изолация.

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

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

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

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

При анализа на литературните данни, включително и на тези, отнасящи се до българската популация се установява, че чрез теста на Friberg – TAT,

спермоантитела се доказват в 4% до 36% при мъжете и в 8% до 28% при жените (Генов и сътр., 1979; Menge et al., 1980; Fichorova et al., 1992). При проведени изследвания на серуми от инфертилни пациенти (обем на извадката, n=326) чрез аглутинационните методи (GAT и TAT) диагностично значими титри на спермоантитела се установяват в 4,8% от мъжките серуми и в 0% от женските чрез GAT и в 31% от мъжките и 21,6% от женските серуми чрез TAT (Димитрова и Калайджиев, 2001). Описва се и положителна линейна корелация между наличието на СА в тестираните серуми, доказани чрез GAT и TAT. Резултатите от това изследване показват известно увеличаване на честотата на спермоантитела както в TAT, така и в SIT и ELISA в Българската популация (Димитрова и Калайджиев, 2001).

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

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

Счита се, че SIT, при който фалшиво положителни резултати се наблюдават рядко е по-малко чувствителен от спермоаглутинационните тестове, поради това, че спермоаглутиниращите антитела не винаги принадлежат към комплемент-фиксиращи имуноглобулинови класове.

При проведените от нас изследвания на хуморалния имунен отговор срещу антигени на сперматозоиди при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници чрез SIT клинично значими титри са установени в 28,57% от изследваните пациентки. При пациентките с други ендокринни заболявания положително реагиращите в SIT бяха 23,43%. Следователно от общ брой изследвани 85 пациентки с ендокринни заболявания и репродуктивни проблеми, процентът на положително реагиращите е 24,7%. В контролната група (104 фертилни) тази честота беше 4,81%. Изследването на серумите от пациентките с

поликистозни яйчници за спермоаглутиниращи антитела чрез SIT показва статистически значимо по-висока честота на положителните серуми в пациентската група спрямо контролната група от фертилни жени ($P < 0,001$).

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

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

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

При проведените от нас изследвания като антигени бяха използвани цели сперматозоиди от сперматозоидна суспензия, получени чрез метода "swim up" от фертилни донори и плаки с повишена лепяща способност в резултат на обработване с поли-L лизин хидробромид. Предимствата на ELISA в сравнение с класическите спермоаглутинационни и спермоимобилизационни тестове се състоят във високата чувствителност и възможност за тестиране на голям брой серуми

едновременно. Счита се, че по-високата честота на позитивните в ELISA серуми, при използване на цели сперматозоиди като антиген, включително и в контролните фертилни групи, се дължи на неспецифично свързване на циркулиращи имунни комплекси и IgG-Fc фрагменти със сперматозоидите. Фиксацията на сперматозоидите преди реакцията с тестиращия серум може да доведе до денатурация на сперматозоидните антигени или до мембранни увреждания, даващи фалшиво положителни или лъжливо отрицателни резултати. Според някои автори, използването на разтворими антигени дава по-рядко фалшиво положителни резултати и по-добра корелация с клиничния статус.

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

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

Стратегията, която се използва сега при изследването на спермоантитела в световните водещи центрове по репродуктивна медицина и у нас, е свързана с използването на повече от два метода: MAR и TAT (Ватев и сътр., 2000). В нашата лаборатория тази комбинация включва: GAT, TAT, SIT, ELISA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ИЗВОДИ

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

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

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

а) върху парафинови срези от тъканите на човешки ембрион :

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

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

б) върху парафинови срези на тъкани на човешки фетус:

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

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

4. Анализирани са хуморалният имуноен отговор срещу антигени в имунологична изолация:

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

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

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

ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с научно-теоретичен характер:

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

Приноси с научно-приложен характер:

1. Установена е повишена честота на спермоимобилизиращи и спермоаглутиниращи антитела в серуми от пациентки с поликистозни яйчници и репродуктивни проблеми.
2. Чрез ELISA са установени повишени концентрации на антитела срещу алфа-кристалини и честота на позитивни серуми при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници и репродуктивни проблеми.
3. Доказана е зависимост между синдрома на поликистозните яйчници и повишен хуморален имунен отговор срещу антигени в имунологична изолация (сперматозоидни антигени и алфа-кристалини).

Приноси с методичен характер

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

Научна активност свързана с дисертацията

Списък на публикациите

1. Iliana Buteva-Hristova, **Vladislav Lazarov**, Valentin Lozanov, Antoaneta Gateva, Blagovest Bechev, Katerina Kavaldzieva, Nikola Mladenov, Nedka Trifonova, Dimitrina Dimitrova-Dikanarova & Zdravko Kamenov (2017). Serum anti- α -crystallin antibodies in women with endocrine disorders, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:3, 574-580, DOI:10.1080/13102818.2017.1308232 (**ИФ за 2016 – 1,059**).
2. Dimitrina K. Dimitrova-Dikanarova, Vladislav **V. Lazarov**, Radka Tafradjiska Hadjiolova, Ivanka I. Dimova, Nina U. Petkova & Zahariy A. Krastev (2017). Association between *Helicobacter pylori* infection and the presence of anti-sperm antibodies, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:1, 1-8, DOI: 10.1080/13102818.2016.1258330 (**ИФ за 2016 – 1,059**).
3. **Лазаров В. В.**, Н. Л. Трифонова, Д. К. Димитрова-Диканарова (2016). Антитела срещу имунологично изолирани антигени при пациентки със синдрома на поликистозните яйчници – PCOS. *Акушерство и гинекология*, 55,6:35-39 (**SJR за 2015 – 0,119**).

Участия в научни прояви

1. Илиана Бътева-Христова, Зафер Сабит, **Владислав Лазаров**, Недка Трифонова, Илия Ватев. Експресия на нискомолекулни стресови протеини в тъкани на репродуктивна система на мишка. IX Национална конференция по медицинска биология, 21-23.10. 2011г., гр. Плевен.
2. **Лазаров В.**, И. Бътева-Христова, П. Рашев, В. Лозанов, Ил. Ватев, Д. Димитрова, Н. Трифонова. Нискомолекулни стресови протеини Алфа-В Crystallin и HSP27 в репродуктивни органи и гамети на мишка. X Национална конференция по медицинска биология, Плевен, 25-27 Октомври, 2013, Резюмета на научните съобщения, 2013, стр. 38 - 39.
3. **Lazarov V.**, D. Dimitrova, A. Gateva, Z. Kamenov, П. Vatev. Antisperm antibodies and infertility in patients with obesity. XI National

Conference of Medical Biology. 15-17 May, 2015, Plovdiv, Bulgaria, In:
Folia medica, Vol. 57 (Suppl.1/2015), 2015, p.189.

Сърдечно благодаря на научните си ръководители проф. Димитрова и проф. Трифонова- за огромната подкрепа, която ми оказват още от първия ми ден в Катедрата.

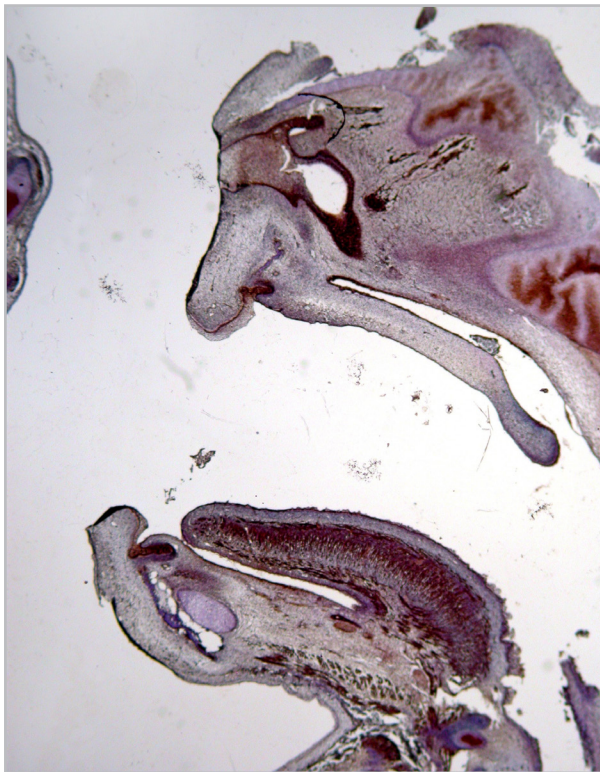
На колегите – за проявеното разбиране и съдействие.

На проф. Каменов, проф. Ватев и д-р Бътева-Христова - за предоставените материали.

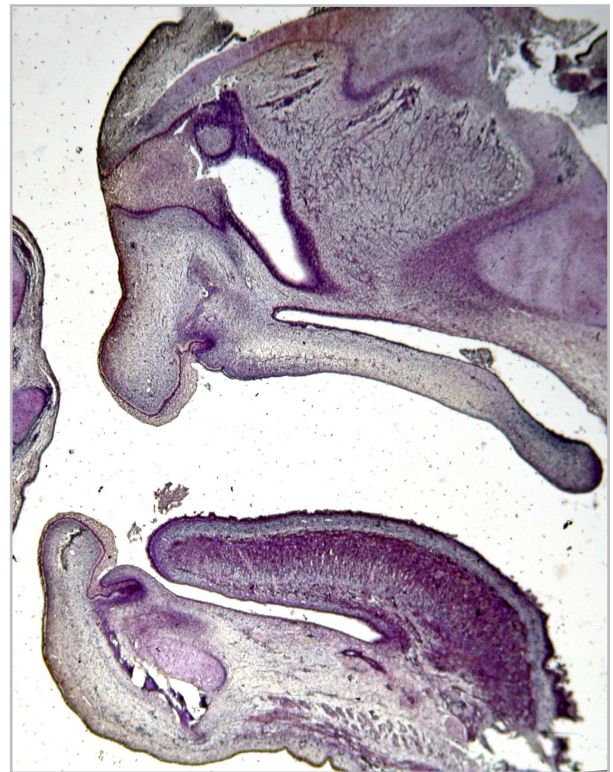
На рецензентите - за направените критични забележки.

На семейството ми - за това, че са до мен.

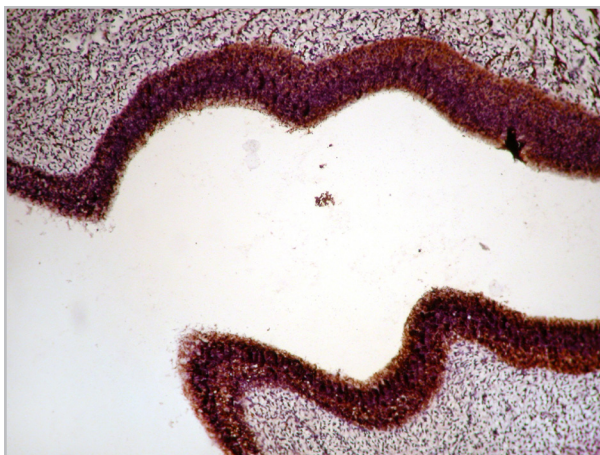
Приложение – микроснимки от тъкани на ембриони и фетуси



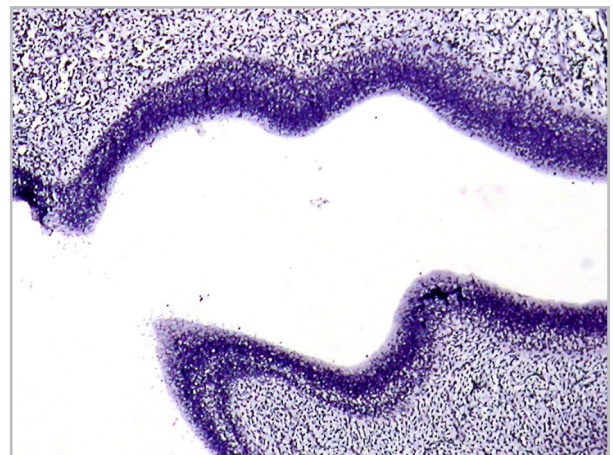
Снимка 1а Експресия на алфа кристалин в първа фарингеална дъга



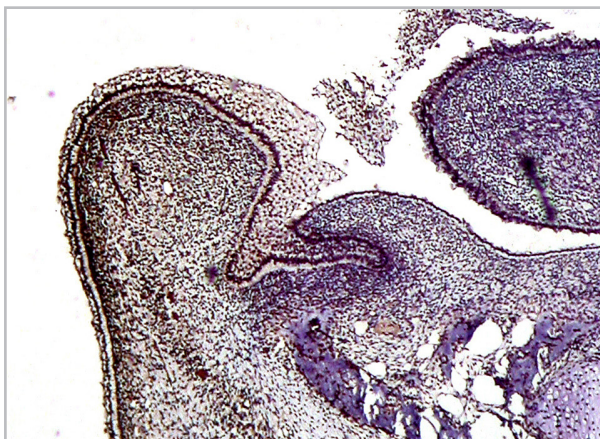
Снимка 1б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в първа фарингеална дъга



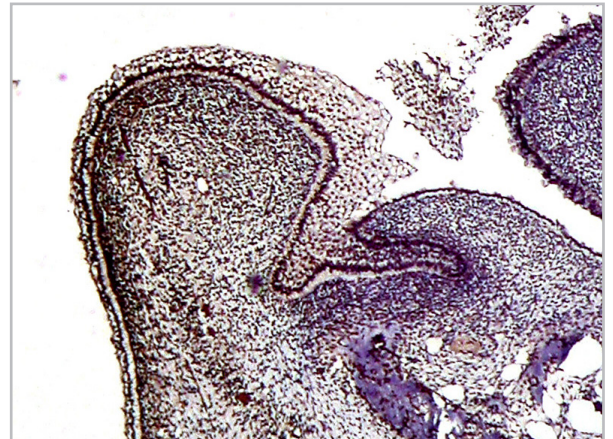
Снимка 2а Експресия на алфа кристалин в носна лигавица



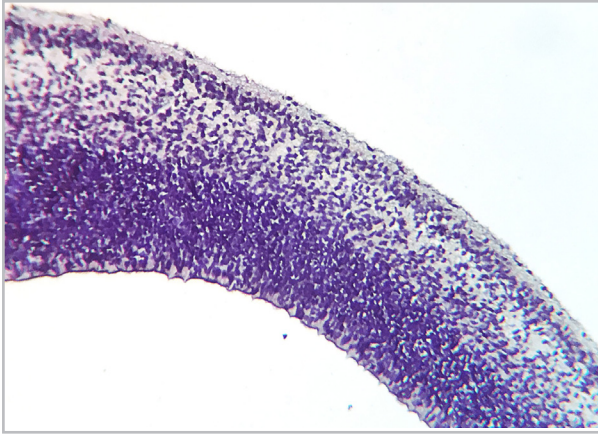
Снимка 2б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в носна лигавица



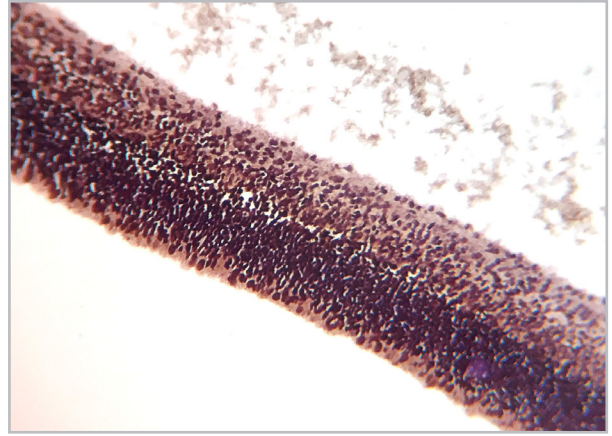
Снимка 3а Експресия на алфа кристалин в зачатък на зъб



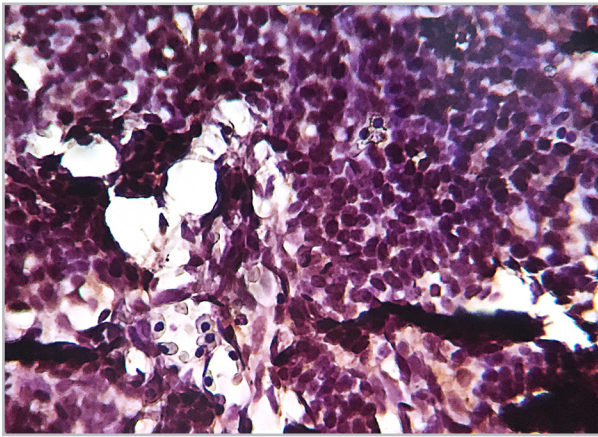
Снимка 3б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в зачатък на зъб



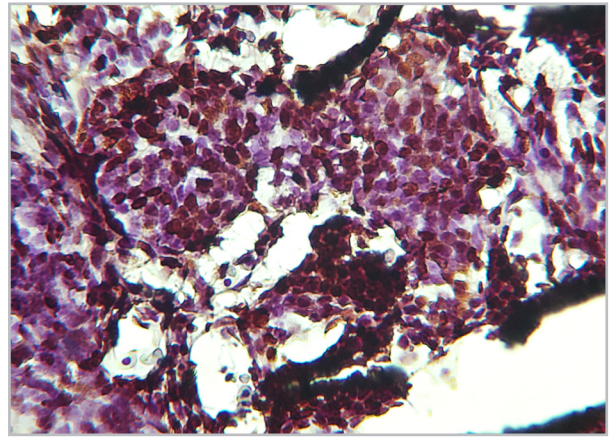
Снимка 4а Експресия на алфа кристалин в главен мозък



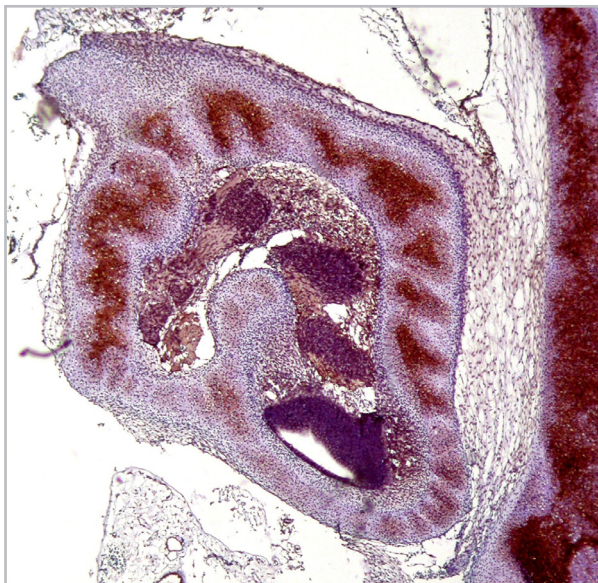
Снимка 4б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в главен мозък



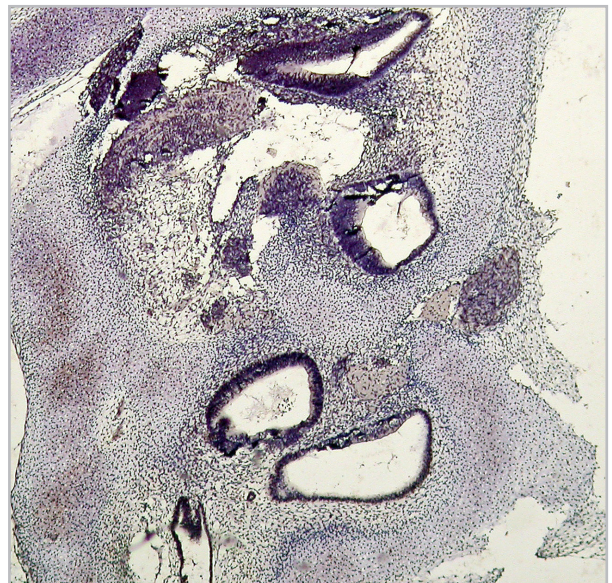
Снимка 5а Експресия на алфа кристалин в тимус



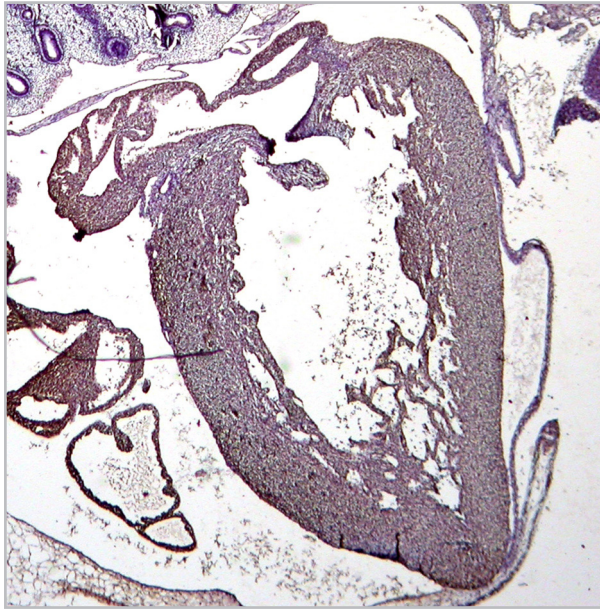
Снимка 5б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в тимус



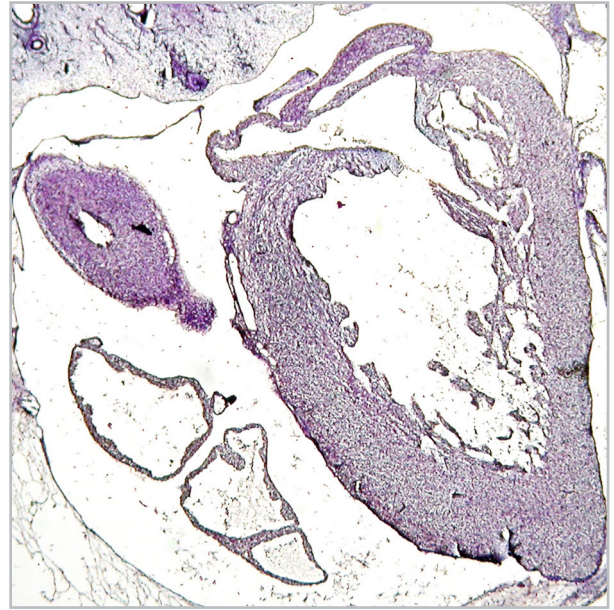
Снимка 6а Експресия на алфа кристалин в ductus cochlearis



Снимка 6б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в ductus cochlearis



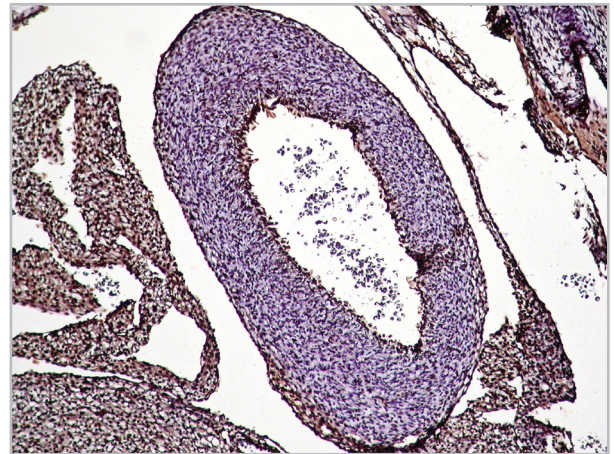
Снимка 7а Експресия на алфа кристалин в сърце



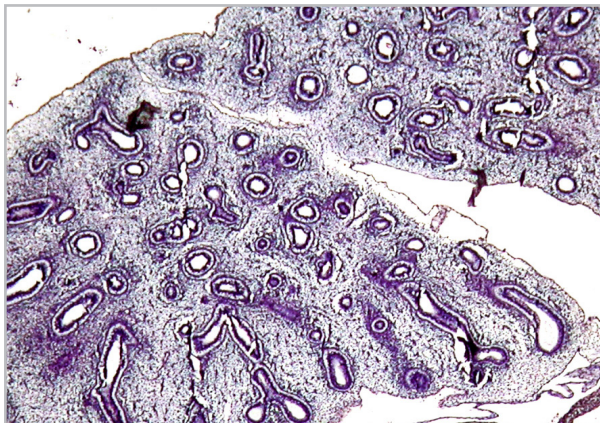
Снимка 7б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в сърце



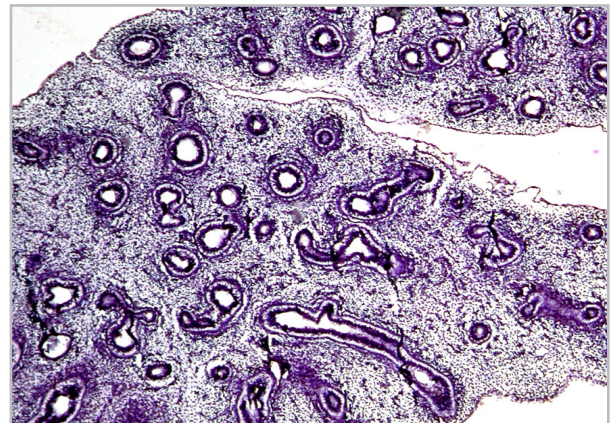
Снимка 8а Експресия на алфа кристалин в аорта



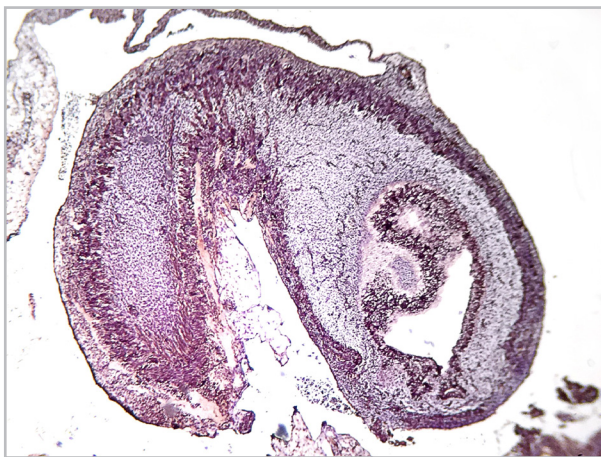
Снимка 8б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в аорта



Снимка 9а Експресия на алфа кристалин в бял дроб



Снимка 9б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в бял дроб



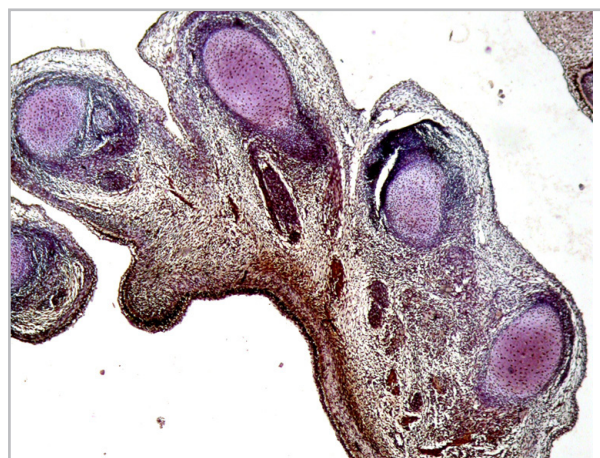
Снимка 10а Експресия на алфа кристалин в черво



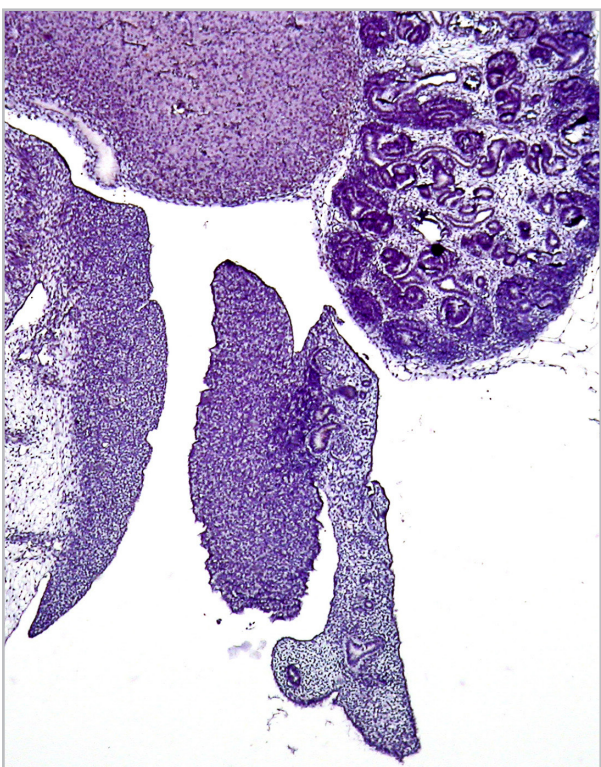
Снимка 10б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в черво



Снимка 11а Експресия на алфа кристалин в ръка



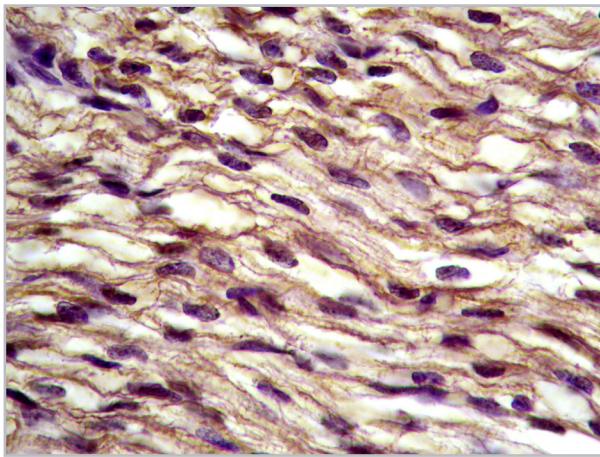
Снимка 11б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в ръка



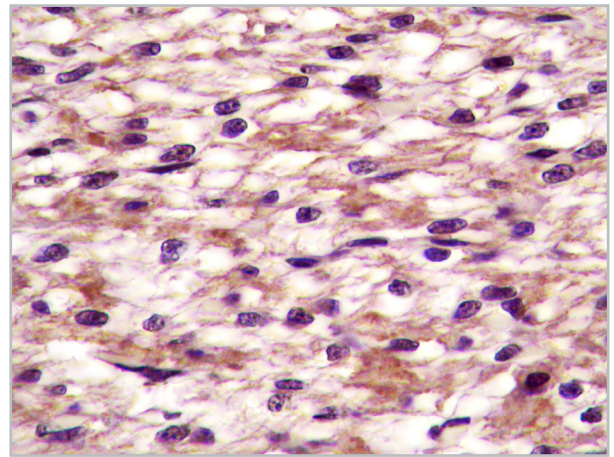
Снимка 12а Експресия на алфа кристалин в гонада, надбъбрек и мезонефрос



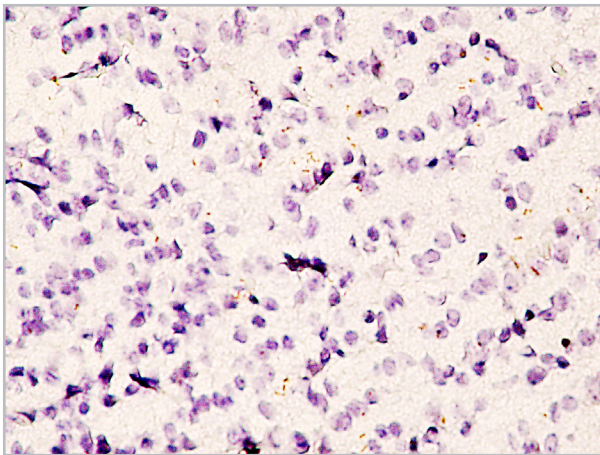
Снимка 12б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в гонада, надбъбрек и мезонефрос



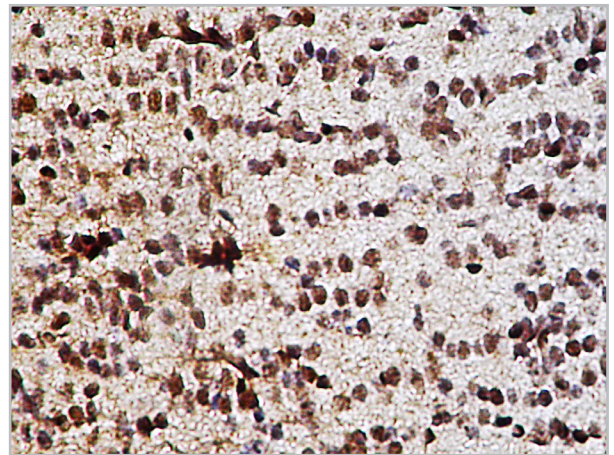
Снимка 13а Експресия на алфа кристалин в сърдечна мускулатура



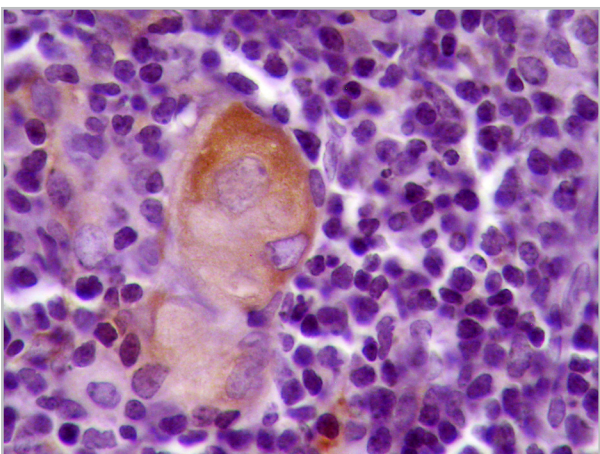
Снимка 13б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в сърдечна мускулатура



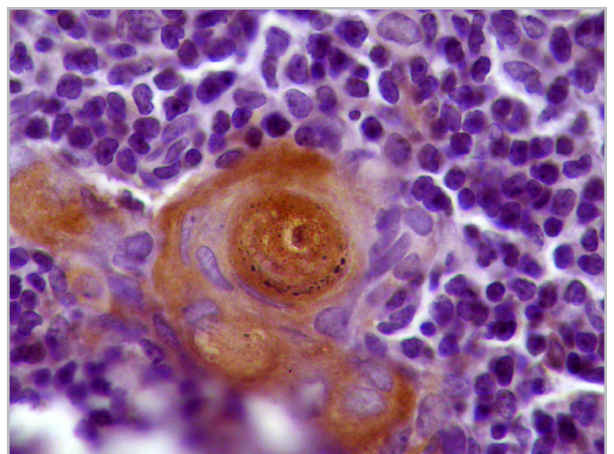
Снимка 14а Експресия на алфа кристалин в мозък



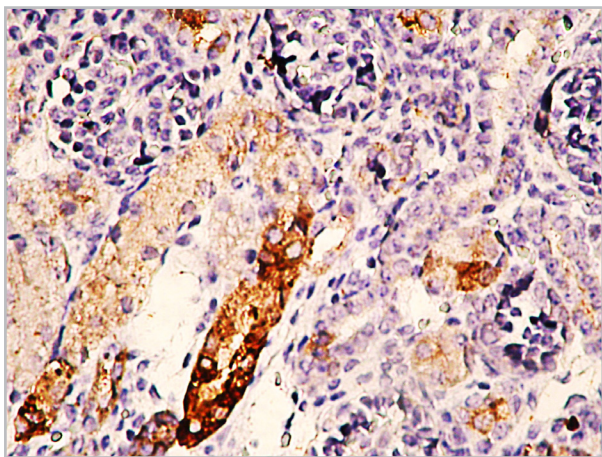
Снимка 14б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в мозък



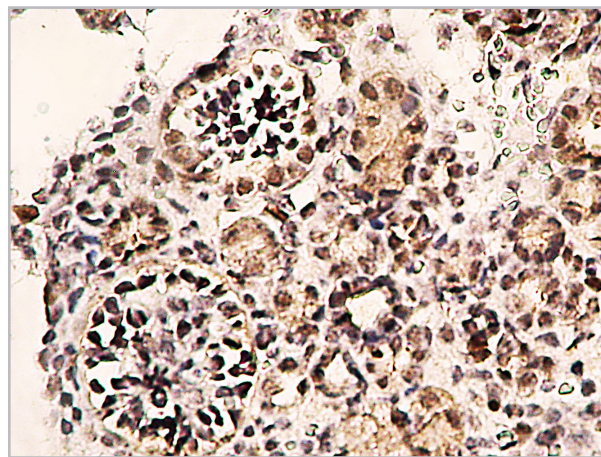
Снимка 15а Експресия на алфа кристалин в тимус



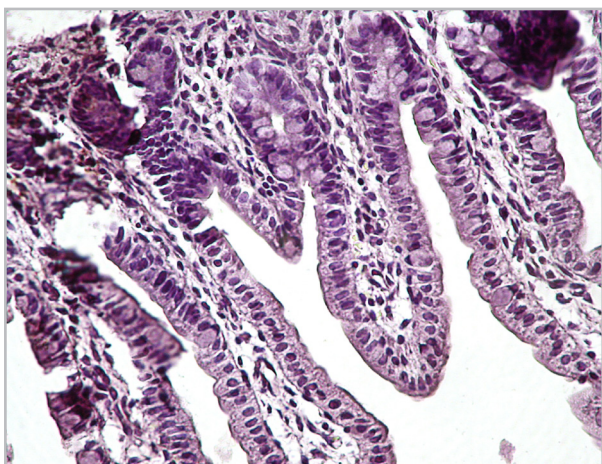
Снимка 15б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в тимус



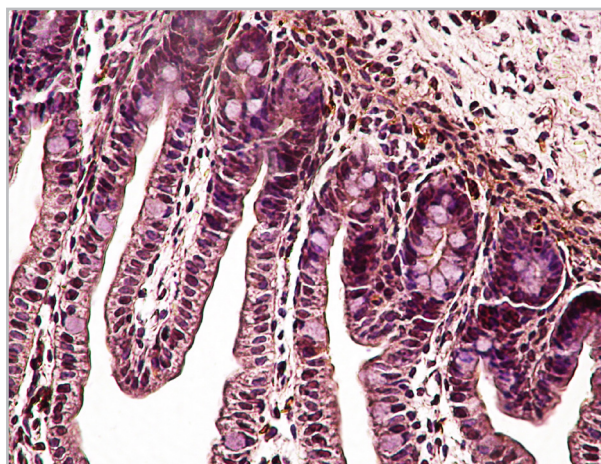
Снимка 16а Експресия на алфа кристалин в бъбрек



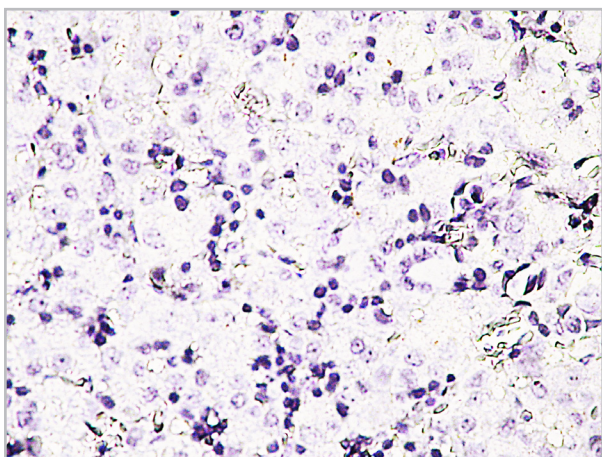
Снимка 16б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в бъбрек



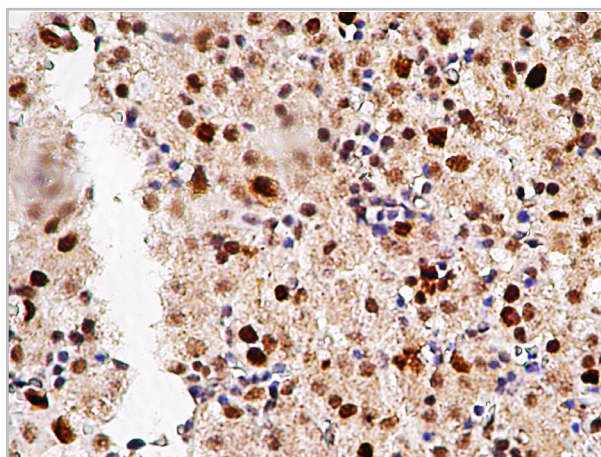
Снимка 17а Експресия на алфа кристалин в чревна лигавица



Снимка 17б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в чревна лигавица



Снимка 18а Експресия на алфа кристалин в черен дроб



Снимка 18б Експресия на фосфорилиран алфа кристалин в черен дроб