



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ**  
**КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ**

**Мина Мирославова Пенчева**

**Значение и клинично приложение  
на тестикуларния ангиотензин-  
конвертиращ ензим като биомаркер  
за фертилитет при мъжа**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“**

**Научна специалност „Клетъчна биология“, 01.06.18**

**Научен ръководител: проф. д-р Ивета Коева, дм**

**Научен консултант: проф. Нина Атанасова, дбн**

**Пловдив, 2019 г.**

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедра „Анатомия, хистология и ембриология“, Медицински факултет, Медицински университет – Пловдив.

Дисертационният труд съдържа 166 страници и е онагледен с 1 схема, 15 таблици и 39 фигури. Литературната справка включва 321 източника.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Ивета Антонова Коева, дм

Проф. д-р Димитър Стефанов Кадийски, дмн

Проф. д-р Сорен Борос Хайрабедян, дбн

Проф. д-р Анастасия Божилова Пастирова, дмн

Доц. д-р Слави Димитров Делчев, дм

Резервни членове:

Доц. д-р Атанас Георгиев Балтаджиев, дм

Доц. Йорданка Георгиева Глухчева, дб

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ в аудитория на Аудиторния комплекс към МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, гр. Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел към МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, както и на интернет страницата на МУ-Пловдив: <https://mu-plovdiv.bg/>

**Забележка:** Номерата на фигурите в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд.

### **Използвани съкращения**

- ABC – Avidin Biotin complex (Авидин-биотин комплекс)
- A-beta42 – Amyloid beta peptide (Амилоиден бета пептид)
- ABP – Androgen binding protein (Андроген свързващ протеин)
- ACE – Angiotensin converting enzyme (Ангиотензин конвертиращ ензим)
- aFGF-1 – Acidic Fibroblast Growth Factor (Киселинен фибробластен растежен фактор)
- AMH – Anti-Müllerian hormone (Анти-Мюлеров хормон)
- Ang 1-7 – Receptor angiotensin- 1-7 (рецептор за Ang 1-7)
- Ang II – Angiotensin II (ангиотензин II)
- AK – Amino acids (Аминокиселини)
- AP – Assisted reproduction (Асистирана репродукция)
- AT1 – Angiotensin type 1 receptors (Ангиотензинови рецептори тип 1)
- AT2 – Angiotensin type 2 receptors (Ангиотензинови рецептори тип 2)
- ARSA – Arylsulfatase A (Арилсулфатаза А)
- AZF – Azoospermic factor (Азооспермичен фактор)
- BM – Basement membrane (Базална мембрана)
- BSC – Basal spermatogonia stem cell line (Основна сперматогенна стволово-клетъчна линия)
- cAMP – Cyclic adenosine monophosphate (Цикличен аденозин монофосфат)
- cGMP – Cyclic guanine monophosphate (Цикличен гуанин монофосфат)
- CRISP1 – Cysteine rich secretory protein 1 (Богат на цистеин секреторен протеин 1)
- ECM – Extracellular matrix (Екстрацелуларен матрикс)
- EGF – Epidermal growth factor (Епидермален растежен фактор)
- ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
- ER – Endoplasmic reticulum (Ендоплазмен ретикулум)
- ERK1/2 – Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (Екстрацелуларни сигнал-регулирани кинази 1 и 2)
- FGF-2 – Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Основен фибробластен растежен фактор)
- FGFs – Fibroblast Growth Factors (Фибробластни растежни фактори)

FITC – Fluoroisothiocyanate (Флуороизотиоцианат)

FSH – Follicular stimulating hormone (Фоликулостимулиращ хормон)

GPI – Glycerol phosphatidylinositol (Гликозил фосфатидилинозитол)

hCG – human chorionic gonadotropin (Човешки хорион гонадотропин)

H-E – Haematoxylin and Eosin (Хематоксилин –Еозин)

HGF – Hepatocyte growth factor (Хепатоцитен растежен фактор)

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1 (Междуклетъчна адхезионна молекула-1)

ICSI – Intra cytoplasm sperm injection (интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди)

IGF-I – Insulin growth factor-I (Инсулинов растежен фактор 1)

IL1 – Interleukin-1 (Интерлевкин 1)

IP3 – Inositol triphosphate (Инозитол трифосфат)

IVF – in vitro fertilization (инвитро оплождане)

LH – Luteinizing hormone (Лутеинизиращ хормон)

LP – Lamina propria (Собствена пластинка)

МАРК – mitogen-activated protein kinase (митоген-активирана протеин киназа)

MasR – Mas receptor (Mas рецептор)

MCP-1 – Monocyte chemoattractant protein-1 (Моноцит хемотаксичен протеин-1)

MCSF – Macrophage colony stimulating factor (Макрофагиален колония стимулиращ фактор)

mRNA – Ribbonucleic acid (информационна рибонуклеинова киселина)

mRNA – Messenger ribonucleic acid (Информационна рибонуклеинова киселина)

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP – Sodium-potassium adenosine triphosphatase (натриево- калиева помпа)

NADP – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Никотинамид аденин динуклеотид фосфат)

NEP – neutral endopeptidase (неутрална ендопептидаза)

NF-κB – nuclear factor kappa-beta (нуклеарен фактор капа-бета)

NO – Nitric oxide (Азотен оксид)

PAS – Periodic acid Schiff (Шиф с периодна киселина)

RAS – Renin angiotensin system (система ренин-ангиотензин)

ROS – Reactive oxygen species (Реактивни кислородни радикали)

RTF – Rete testis fluid (Мрежа на семенника)

sACE – Somatic Angiotensin Converting Enzyme (соматичен Ангиотензин конвертиращ ензим)

SMA – Smooth Muscle Actin (Гладкомускулен актин)

TA – Tunica albuginea (Туника албугинея)

tACE – Testicular Angiotensin Converting Enzyme (Тестикуларен Ангиотензин конвертиращ ензим)

TGF- $\beta$  – Transforming growth factor  $\beta$  (Трансформиращ растежен фактор  $\beta$ )

TNF $\alpha$  – Tumor necrosis factor-alpha (Тумор-некротизиращ фактор алфа)

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor (Съдов ендотелен растежен фактор)

WHO – World Health Organization (Световна здравна организация)

ZP – Zona pellucida (Зона пелуцида)



## Съдържание:

<b>I.</b>	<b>ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>9</b>
<b>II.</b>	<b>ЦЕЛ .....</b>	<b>10</b>
<b>III.</b>	<b>ЗАДАЧИ .....</b>	<b>10</b>
<b>IV.</b>	<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>11</b>
<b>1.</b>	<b>Биопсия на тестис .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.</b>	<b>Техника на биопсията .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.</b>	<b>Сформиране на групи от биопсичния материал.....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>Семинологично изследване.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.</b>	<b>Селекция на пациенти .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.</b>	<b>Спермален анализ .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.</b>	<b>Сформиране на подгрупи .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.</b>	<b>Обработка на еякулат .....</b>	<b>14</b>
<b>3.</b>	<b>Хистологичен анализ .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>Оцветяване с хематоксилин-еозин .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.</b>	<b>Оцветяване с Азан по Heidenhain .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.</b>	<b>Имунохистохимия .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.</b>	<b>Индиректна имунофлуоресценция върху натривки от         човешки сперматозоиди.....</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) .....</b>	<b>16</b>
<b>4.1.</b>	<b>Клетъчен лизат на сперматозоиди използвани за ELISA .....</b>	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>Морфометрично изследване .....</b>	<b>18</b>
<b>6.</b>	<b>Статистически анализ.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.</b>	<b>СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....</b>	<b>20</b>
<b>1.</b>	<b>Хистологична характеристика на семиниферни каналчета.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.</b>	<b>Рутинен хистологичен анализ – хематоксилин-еозин (H-E) .....</b>	<b>20</b>

1.2. Хистологичен анализ - Оцветяване с Азан (по Heidenhain) .....	21
1.3. Имунореактивност за $\alpha$ -SMA .....	24
1.4. Определяне на сперматогенна активност чрез tACE .....	26
1.5. Резултати от измерена дебелина ЛП и връзка с tACE експресия .....	27
2. Резултати от спермален анализ.....	29
3. Количествено определяне на ACE чрез метода ELISA .....	33
3.1. Резултати ACE концентрация в семенна плазма .....	33
3.2. Резултати ACE клетъчна мембрана на сперматозоиди.....	34
3.3. Резултати от спермалния анализ и връзка с ACE концентрации.....	35
4. Индиректна имунофлуоресценция .....	35
4.1. Имунофлуоресцентна визуализация на tACE в нетретирани сперматозоиди.....	35
4.2. Имунофлуоресцентна визуализация на tACE в капацитирани сперматозоиди .....	42
4.3. Имунофлуоресцентна визуализация на tACE в акрозомно реагирани сперматозоиди .....	47
4.4. Корелационна връзка между динамичното представяне на tACE и спермални показатели.....	52
V. ИЗВОДИ.....	54
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
VII. ПРИНОСИ.....	57
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	58
IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	58
X. SUMMARY.....	59



## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Стерилитетът засяга около 14 % от двойките в детеродна възраст. От дълги години стерилитетът се свързва основно с женския фактор, докато ролята на мъжа е силно подценена. Редица изследвания обаче доказват, че при около 40% от двойките, безплодието се дължи на промени в сперматогенезата. Стерилитетът сам по себе си не застрашава физическото здраве, но има силно емоционално въздействие върху личността и негативно повлиява лични, междуличностни, социални и професионални отношения. От изключително значение е точно изготвената спермограма и адекватният план на лечение. Спермата е сложна органична течност, която съдържа сперматозоиди и комплекс от протеини, които се произвеждат и секретират от органите на мъжкия репродуктивен тракт. Голяма част от протеините се произвеждат и действат в точно определен участък от него, докато други съпътстват сперматозоидите в дългия им път през каналите на мъжката и женска репродуктивна система до оплождането. Един от ензимите който участва във всички процеси на реализация на сперматозоидите е зародишна/тестикуларна изоформа на ангиотензин I конвертиращия ензим (tACE). ACE е тип I интегрален мембранен гликопротеин, част от системата ренин-ангиотензин-алдостерон (RAAS). В хората ACE е изолиран в две изоформи, които са кодирани от един ген, соматична ACE (sACE) и зародишна или тестикуларна ACE (tACE).

Тестикуларната изоформа (tACE) се експресира само в тестисите, по време на развитието на хаплоидните зародишни клетки и принадлежи към семейство протеини, чиято активност е свързана с етапите на сперматогенезата и с уникалния процес на клетъчната диференциация. С настъпването на пубертета, tACE се увеличава значително в тестисите и изнасящите каналчета и в по-малка степен в по-дисталните региони на мъжкия репродуктивен тракт. Ролята на tACE в репродуктивната система е обект на редица изследвания. На този етап е известно, че по време на половото съзряване ензимът определя стъпките на сперматогенезата, както и участието му в уникалния процес на зародишно-клетъчната диференциация. Липсата или нарушение в активността му (повишена/намалена) води до невъзможност да се формират микродомейни и прекъсване на каскадното включване на отделни протеини на плазмената мембрана на сперматозоидите, нарушаване на регулацията в матурационните процеси в надсеменника, невъзможност да се осъществи GPI-AP секреция на протеини, ре-локализация на протеини и протеинни комплекси на плазмената мембрана, участие в капацитацията и хиперактивацията на сперматозоидите, както и до невъзможност да се осъществи оплождане, намалена имплантационна възможност и развитие на ембриона.

Независимо, че много от причините за стерилитета при мъжа са неясни, намирането и прилагането на прецизни биомаркери за мъжкия инфертилитет е от съществено значение за изясняване клетъчните и молекулярни механизми, които са в основата на идиопатичното безплодие при мъжа. В тази връзка е и потенциалната роля на tACE като биомаркер, подпомагащ избора на сперматозоиди с висок потенциал за оплождане и развитието на качествени ембриони.

## **II. ЦЕЛ**

Целта на настоящето проучване е да се потърси връзка между промените в нивата и експресията на tACE в спермата и биопсичен материал от тестиси на пациенти с нарушения в оплодителната способност и измененията в спермалните показатели за сперматозоидите и стената на семиниферните тубули в контекста на потенциалната роля на ензима като биомаркер за фертилитет при мъжа.

## **III. ЗАДАЧИ**

1. Да се опишат и класифицират морфологичните находки в спермата при мъже с фертилни нарушения – астенозооспермия, олигозооспермия, тератозооспермия, спрямо нормозооспермия водещи до стерилитет.
2. Да се определи количествено концентрациите на човешка ACE в семенната плазмата и спермална повърхност чрез ELISA метод.
3. Да се потърси връзка между нивата на ACE в семенната плазмата и спермална повърхност и спермалните показатели-подвижност, морфология и концентрация на сперматозоидите.
4. Да се изследва експресията на tACE в сперматозоиди от еякулат при мъже с фертилни нарушения чрез индиректна имунофлуоресценция.
5. Да се потърси връзка между концентрацията на tACE на клетъчна мембрана на сперматозоид и модела на имунохистохимична експресия на ензима в сперматозоиди от пациенти с нарушения във фертилността.
6. Да се установи модела на имунохистохимична експресия на tACE в биопсичен материал от тестиси на пациенти с нарушения във фертилността.
7. Да се проследят морфологичните изменения в стената на семиниферните тубули от биопсичен материал на пациенти с нарушена оплодителна способност чрез рутинни хистологични техники, имунохистохимия за  $\alpha$ -гладкомускулен актин и морфометрично изследване.
8. Да се потърси корелация между морфологичните изменения и имунохистохимичната експресия на tACE в биопсичен материал от тестиси на пациенти с нарушена оплодителната способност във връзка с потенциалната роля на този фактор като диагностичен и прогностичен маркер за оценка на фертилността при мъжа.
9. Статистически анализ и фотодокументиране на получените резултати.

## **IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Биопсия на тестис**

Полученият материал от тестикуларна тъкан е предоставен от СБАХЛ „Д-р Малинов” - София. В изследването са включени 26 инфертилни мъже с азооспермия (обструктивна азоосперия - орхиепидидимит (n=8), едностранна липса на ductus deferens (n=2), глава на епидидима (n=2), не обструктивна азооспермия (n=3), варикоцеле (n=6), крипторхизъм (n=3), рак на тестисите (n=2), на възраст от 21-42г. за период от 2016-2018 г. Всички пациенти включени в проучването са дали информирано писмено съгласие за вземане на биопсичен материал от единия или и от двата тестиса. Взетата тестикуларна тъкан е поставена в разтвор на Буен за 24 часа и последващо включена в парафин.

#### **1.1. Техника на биопсията**

Обикновено се прилага обща венозна, краткотрайна анестезия извършвана от анестезиолог. Дезинфекцията на оперативното поле се извършваше трикратно с Браунол. Разрез от около 2 см. се прави успоредно на надлъжната ос на тестиса в средната част на свободния страничен ръб. Обвивките на семенника се отварят с малка ножичка до разкриване на tunica albuginea. С малък скалпел се прави разрез от 3-4 мм. върху tunica albuginea. Под действие на налягането в семенника, се наблюдава изпъкване на паренхима с големина на оризово зърно. При необходимост се оказва натиск върху тестиса, за да се появи по-голямо парченце паренхим. Тестикуларната тъкан се изрязва с остра ножичка и поставя върху стерилно предметно стъкло за микроскопско доказване на налични сперматозоиди. При наличие на сперматозоиди се взема второ парченце за обработка до извличане на сперматозоиди, които директно се използват или се замразяват. Веднага след това тъканното късче се постави във фиксатор – разтвор на Буен. Целостта на tunica albuginea се възстановява при използване на атрауматична игла. Обвивките на тестиса се възстановяват с единични шевове.

#### **1.2. Сформиране на групи от биопсичния материал**

Използвайки връзката между миофибробластните клетки и екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) разположен между тях бяха определени четири групи в зависимост от морфологичните изменения на ЛП, независимо от клиничната диагноза.

Въз основа на морфологията на ЛП, измерването на стена на семиниферните каналчета позволява отделните биопсии да бъдат отнесени към една от четирите групи показващи нарастваща патология:

Група 1 – интактна ЛП и съхранена сперматогенеза;

Група 2 – повишено количество на отложен ЕЦМ между слоевете миофибробластни клетки;

Група 3 – наличие на два слоя миофибробластни клетки и задебелен ЕЦМ между тях;

Група 4 – задебелена ЛП с липсващ вътрешен слой от миофибробластни клетки.

## 2. Семинологично изследване

### 2.1. Селекция на пациенти

Изследването се проведе сред 111 мъже, посетили СБАХЛ „Д-р Малинов“, Клиника по урология при УМБАЛ „Св. Георги“, МДЛ „СИНЕВО“ през 2016-2018 г. Всеки пациент попълва набор от документи, оформени в досие, съгласно изискванията – информирано съгласие и анкетна карта.

Таблица 1. Критерии за подбор на пациенти

Критерий за включване в изследването	Критерий за изключване от изследването
Мъже в добро физическо и психическо здраве - 111 броя.	Инфекции на гениталния тракт
Възраст - 20-51г.	Вродено заболяване
Първичен стерилитет	Лекувани с АСЕ инхибитори
Вторичен стерилитет	Над 51г.
Нормозооспермия-контрола - 31 пациента	
Олигозооспермия - 25 пациента	
Астенозооспермия - 31 пациента	
Тератозооспермия - 24 пациента	

### 2.2. Спермален анализ

Еякулат за семинологичното изследване се получава след мастурбация след 3-5 дневно полово въздържание в стерилен контейнер и се съхранява на стайна температура (18-20°C). Направена е количествена и качествена оценка на спермата: обем на еякулата, време на втечняване, вискозитет, рН на еякулата, брой на сперматозоидите в 1 мл. и в целия еякулат, подвижност на сперматозоидите, морфология на сперматозоидите, спазвайки стриктните изисквания на Световната здравна организация (СЗО), отразени в Таблица 1.

Таблица 2. Референтни стойности

Параметър	Референтни стойности
Обем	$\geq 1,5$ мл
Концентрация	$\geq 15$ млн/мл; $\geq 39$ млн/еякулат
Подвижност:	$PR + NP \geq 40 \%$
Прогресивно подвижни (PR)	$PR (A+B) \geq 32\%$
Бързи прогресивно подвижни (A)	$A \geq 25 \%$
Бавни прогресивно подвижни (B)	
Непрогресивно подвижни (NP)	
Неподвижни (IM)	
Морфология:	
според стрикните критерии на Крюгер	$\geq 4 \%$ с нормална морфология

### 2.3. Сформиране на подгрупи

Според получените резултати от спермалния анализ материала се разпределя в четири групи, които допълнително се подлагат на обработка и подразделят на подгрупи:

- 1 Нормозооспермия:
  - 1.2 Свежи сперматозоиди
  - 1.3 Капацитирали сперматозоиди
  - 1.4 Акрозомно реагирани сперматозоиди
- 2 Олигозооспермия:
  - 2.1 Свежи сперматозоиди
  - 2.2 Капацитирали сперматозоиди
  - 2.3 Акрозомно реагирани сперматозоиди
- 3 Астенозооспермия:
  - 3.1 Свежи сперматозоиди
  - 3.2 Капацитирали сперматозоиди
  - 3.3 Акрозомно реагирани сперматозоиди
- 4 Тератозооспермия:
  - 4.1 Свежи сперматозоиди
  - 4.2 Капацитирали сперматозоиди
  - 4.3 Акрозомно реагирани сперматозоиди

## 2.4. Обработка на еякулат

След изготвяне на спермограма (WHO-5th ed., 2010), целият останал материал се центрофугира на 300g, за да се разделят сперматозоидите от семенната плазма. Семенната плазма се замразява и се съхранява на  $-20^{\circ}\text{C}$  във фризер. Утайката съдържаща сперматозоидите се промива три пъти с PBS, ресуспендира се, центрофугира се на 300g, супернатантата се изхвърля. След края на промиването утайката съдържаща сперматозоидите се разрежда с PBS до концентрация  $5 \times 10^6$  клетки/ml, като се разпределя в 2 епруветки *Eppendorf* по 200  $\mu\text{l}$ , едната се използва за определяне на концентрация tACE в клетъчна мембрана на сперматозоидите (ELISA метод) съхранява се на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Втората епруветка *Eppendorf* с 200  $\mu\text{l}$  разтвор със сперматозоиди се използва за индиректна имунофлуоресценция, вземат се 20  $\mu\text{l}$  и се накапват върху предметни стъкла за определяне на изявата на ензима в нетретирани сперматозоиди (промити три пъти с PBS), съхнат на въздух. Към останалите сперматозоиди се прибавя 200  $\mu\text{l}$  среда за капацитация на Ferti Pro (Belgium), поставят се в инкубатор  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , за да изплуват по метода swim-up за 1 час. От изплувалите сперматозоиди се вземат по 20  $\mu\text{l}$  и се накапват върху предметни стъкла, които съхнат на въздух. Остатъкът от капацитирания материал се промива отново с PBS, поставя се 10  $\mu\text{l}$  йонофор A23187 (sc-3591, Santa Cruz Biot.), за акрозомна реакция, отново се поставя в термостат за 1 час. Изваждат се от термостата и от повърхностния слой се взема материал, накапва се по 20  $\mu\text{l}$  капки върху предметни стъкла, оставят се да съхнат на въздух. След като изсъхнат стъклата с капките се потопяват в леден метанол за 15 минути, вадят се да съхнат на въздух. Съхраняват се в хладилник на  $+4^{\circ}\text{C}$ . Всички използвани предметни стъкла са покрити с адхезив (Poly-L-lysine, Sigma).

## 3. Хистологичен анализ

### 3.1. Оцветяване с хематоксилин-еозин

Тестис биопсиите бяха фиксирани при стайна температура в течност на Буен за 12-24 часа. Последва дехидратация във възходяща алкохолна батерия и просветляване в кедрово масло. След промивка с ксилол тестикуларните фрагменти престояват в течен парафин в термостат на  $56^{\circ}\text{C}$  за 24 часа, след което се включиха в парафин. Парафиновите блокчета се нарязоха на автоматичен парафинов микротом (Leica 2055) и се фиксираха върху предметни стъкла. После се депарафинираха в низходяща алкохолна батерия и се рехидратираха в дестилирана вода за 15-20 минути. Последва оцветяване с хематоксилин (на Харис) за 3-5 минути и с еозин за 1-2 минути. Хематоксилин на Харис (работен разтвор) се приготвя в разреждане хематоксилин:дН<sub>2</sub>О=1:1 Филтрува се преди употреба. Продължихме с дехидриране и просветляване, след което срезове бяха включени в канадски балсам и покрити с покривни стъкла.

### 3.2. Оцветяване с Азан по Heidenhain

Първи етап е депарафиниране на срезове с последващо рехидратиране до дестилирана вода и поставяне в анилинов спирт за 5 минути. Следва изплакване отново в дестилирана вода и потапяне в темпериран на 55° азокармин за 20 минути. Продължаваме с изплакване в дестилирана вода и диференциране в анилинов алкохол. Последва бързо измиване в оцетно-кисел алкохол и байцване в 5% фосформолибденова киселина за 1 час. Продължаваме с бързо измиване с дестилирана вода и поставяне в анилиново синьо-orange G за 1 час. Следва миене в дестилирана вода и дехидриране във възходяща алкохолна батерия. Следващи етапи са просветляване и покриване с канадски балсам.

### 3.3. Имунохистохимия

Моделът на експресия на tACE беше направено върху парафинови срезове от биопсичен материал на човешки тестис (4-5µm) получени с автоматичен парафинов микротом Leica 2055. Срезове се монтираха върху предметни стъкла покрити с адхезив (Poly-L-lysine, Sigma). След депарафиниране и рехидратиране, срезове бяха проплакнати с дестилирана вода и се подлагат на антигенно разкриване на епитопите. За целта срезове бяха поставени за 40 мин. в предварително загрят до 95°C цитратен буфер с рН 6.0, след което се охлаждат до стайна температура (стъклата са все още в буфера). След като се охладят, срезове се измиват 3 x 5 мин в миеш буфер (50mM TRIS, рН 7.6, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween-20, TTBS) и се блокира ендогенната пероксидаза с 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 мин). За блокиране на ендогенния биотин беше използван съответния кит (кат. № ВВК 120, Scy Tek, USA), като срезове бяха инкубирани съгласно инструкциите на кита: 15 мин. с част А, проплакване и 15 мин. с част В. След трикратно промиване с миеш буфер, срезове се инкубират за 5 мин с реактив за блокиране на неспецифичното свързване (Superblock, кат. № AAA500 Scy Tek., USA) при стайна температура, промиват се еднократно и се инкубират с първично поликлонално козе анти тяло срещу ACE (sc - 12187, разрежено 1:300) за 24 часа при 4° във влажна камера След трикратно измиване с TTBS (3 x 5 мин), срезове се инкубират с второ анти тяло: биотинилирано анти-козе (кат. № AGL015 Scy Tek., USA) за 10 мин на стайна температура. След трикратно промиване за по 5 мин. в TTBS срезове бяха инкубирани с HRP за 10 мин.

След инкубацията стъклата се промиват с TTBS (3 x 5 мин). Реакцията се проявява с 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB, кат. № ACV500 Scy Tek., USA) на тъмно (2 x 5 мин) с двукратно промиване в дестилирана вода (2 x 5 мин). След стопиране на реакцията бяха проведени: контраоцветяване с хематоксилин за 10 мин., диференциране в чешмяна вода за 20 мин. и обезводняване на тъканите във възходяща редица алкохоли, впоследствие отстранени с два последователни ксилола за 10 мин. Препаратите бяха покрити с канадски балсам и наблюдавани със светлинен микроскоп.

Като контроли послужиха срезове, при които първичното или вторичното анти тяло бяха заместени с PBS.

**Имунореактивност за  $\alpha$ -SMA** се установи на парафинови срезове (4-5 $\mu$ m) монтирани върху силанизирани стъкла и депарафинирани последователно с ксилол и абсолютен алкохол. След депарафиниране и рехидратиране, срезове бяха проплакнати с дестилирана вода и инкубирани с 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за 10 мин. на стайна температура, впоследствие проплакнати с чешмяна вода. Следва промиване в Tris Buffered Saline (TBS), последва инкубация с нормален кози серум (1 част) към TBS (4 части) и блокиращ серум разтворен в TBS за 30 мин. на стайна температура. Стъклата се подсушават без промиване, прибавя се  $\alpha$ -SMA (A-2547, Sigma) разреден 1:5000 в NRS/TBS/BSA, престой на 4° във влажна камера за една нощ. Следва отново промиване с TBS 2x5мин. Добавя се биотинилирано анти тяло Ab-RAMB (1:500, DAKO) за 30 мин. Следва отново промиване с TBS 2x5. След промиване, върху срезове беше приложен ABC реагент и отново инкубирани за 30 мин. на стайна температура. Промиване с TBS 2x5, комплексът антиген-анти тяло беше визуализиран с DAB за 10 мин. на тъмно. Следва оцветяване с хематоксилин - 40 sec., диференциране в чешмяна вода за 20 мин. и обезводняване на тъканите във възходяща редица алкохоли, впоследствие отстранени с два последователни ксилола за 10 мин. Препаратите бяха покрити с еталан и наблюдавани със светлинен микроскоп.

#### **3.4. Индиректна имунофлуоресценция върху натривки от човешки сперматозоиди**

Този метод беше използван за визуализиране локализацията на tACE в човешки сперматозоиди, изолирани при спермален анализ. Натривките от сперматозоиди бяха промити в PBS, след което инкубирани за 30 мин. с 5% нормален свински серум. След отстраняване на серума, натривките бяха инкубирани със заешко поликлонално анти тяло ACE (sc-12187, Santa Cruz Biot. 1:300) за 1 час на 37°C, трикратно промити в PBS и инкубирани със свински анти-заешки IgG, конюгиран с FITC за 1 час на тъмно. След трикратно промиване, натривките бяха покрити с покривна среда DAPI. Препаратите се отчитат на увеличение 600x, 1000x. Имунофлуоресцентната реакция беше наблюдавана и фотодокументирана със система за конфокална микроскопия – Leica TCS SPE. Препаратите за негативна контрола на имунофлуоресцентното оцветяване бяха инкубирани с PBS, вместо с първичното анти тяло.

#### **4. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA)**

Използвания ELISA кит е за *in vitro* количествено определяне на концентрациите на човешка ACE в семенната плазма и в клетъчната мембрана на сперматозоидите.

Минималната откриваема доза на човешката ACE е 0.469 ng/mL (чувствителността на този тест или най-ниската граница на откриване (LDL) се определя като най-ниската протеинова концентрация, която може да бъде разграничена от нула). Чувствителността на метода е от 0.781-50ng/mL.



Съхранените проби (спермална плазма при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) от различните пациенти бяха оставени на стайна температура до размразяването им, след което бяха центрофугирани за 10 мин. на 1000g. (10000 оборота). Взима се супернатантата и незабавно се започва анализа. Предварително беше направено разреждане на семенната плазма от 2;3;10;20;30;50 пъти, за да се установи с какви концентрации да се работи, което да позволи да сме в обхвата на стандартната крива. От получените резултати определихме да работим с x20 разреждане на семенната плазма и x30 на спермално свързания АСЕ протеин.

Реагентите се оставят на стайна температура ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) преди използването им. Всички реагенти от кита се приготвят непосредствено преди работа според инструкцията на производителя.

Следва инкубация с антигена, натоварен в кладенчетата на плаките, която при кита на Elabscience Biotechnology Co. продължава на 90 мин. при  $37^{\circ}\text{C}$ . Отстранява се течността от всяко кладенче, без измиване. Незабавно се добавя по 100  $\mu\text{L}$  от работния разтвор за биотинилирано откриване на антияло (Ab) във всяка ямка. Плаката се покрива с уплътнител. Внимателно се разклаща, за да се осигури пълно смесване. Инкубира се в продължение на 1 час при  $37^{\circ}\text{C}$ . Следва трикратни измивания, подсушаване чрез потупване върху филтърна хартия, в кладенчетата на плаката се накапва HRP конюгат, с който се инкубира 30 min. Отново има петкратно миене. Прибавя се субстрат за 15 минути при  $37^{\circ}\text{C}$ , плаката се защитава от светлината, инкубира се. Реакцията се спира със стоп разтвор. За положителна и отрицателна контрола се използват фабрично произведени калибратори. След спиране на получената колориметрична реакция, резултатите се отчитат на спектрофотометър (ELISA-reader) с дължина на вълната 450 nm. Измерва се оптичната плътност (OD – optical density). Получените стойности се преизчисляват за всяка проба (спермална плазма) с помощта на специална формула, предоставена от производителя, която дава краен резултат в мерни единици ng/ml (OD 450nm – стойност на поглъщане при 450nm; Sample – спермална плазма)

След края на експеримента всички неизползвани реагенти се поставят обратно в хладилника, съответно според указаната температура на съхранение, до изтичане на срока им на годност.

#### **4.1. Клетъчен лизат на сперматозоиди използвани за ELISA**

По 200  $\mu\text{l}$  от сперматозоидите (в концентрация  $5 \times 10^6$  сперматозоиди/ml) се поставя в епруветка *Eppendorf* 2 ml. Прибавихме 200  $\mu\text{l}$  Buffer (20 mM Hepes, 0.3 M KCL, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100), pH 7.0-7.2 и се промиват 2x10 минути.

Добре промитите сперматозоиди се прехвърлят в 1.5 ml от буфера и се подлагат на алтернативно замразяване / размразяване на  $-20^{\circ}\text{C}$ , като процеса се повтаря три пъти. Следва центрофугиране за 15 мин. на 1000g. (10000 оборота), епруветките се охлаждат в чаша със студена вода и лед, за да се намали топлинното въздействие върху пробата.

Полученият клетъчен лизат се прехвърля, на части от по 1 ml, в епруветки *Eppendorf*. Получената утайка се изхвърля, а към 100 µl от супернатантата се добавят 100 µl дихлорметан (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) за отстраняване на намиращите се в пробата липиди. Сместа се разбърква добре на *Vortex*, двукратно за по 20 секунди, след което пробите се центрофугират на 10 000 rpm за 10 минути. Отделя се горния слой, който е високопречистен и богат на белтък, и се използва за количествено определяне на ACE в клетъчна мембрана на сперматозоидите, чрез ELISA метод.

## 5. Морфометрично изследване

Морфометричното измерване е направено върху парафинови срези от биопсичен материал на човешки тестис от 26 инфертилни мъже с азооспермия- (обструктивна азоосперия- орхиепидидимит (n=8), едностранна липса на vas deferens (n=2), липса на глава на епидидима (n=2), не обструктивна азооспермия (n=3), варикоцеле (n=6), крипторхизъм (n=3), рак на тестисите (n=2). Тестикуларни фрагменти с дебелина 3-5 µm, след депарафиниране и рехидриране с алкохоли с низходяща концентрация бяха оцветени с Азан по Heidenhain (1915). На напречен срез от тестис беше анализирана дебелината на стената на средно 50 семенни каналчета на всеки пациент. Използван беше прецизно калибриран софтуер за анализ на изображението („DP-Soft” 3.2, Olimpus, Japan) като беше отчетена средната дебелина на измерените семенни каналчета. Направени са средно по шест измервания на дебелината на стената на семенни каналчета, при увеличение x200, след оцветяване с Азан по Heidenhain и положителната имунохистохимична реакция за актин. Измерихме цялата дебелина на стената – БМ+ ЛП и техните компоненти. Групите бяха определени на база на дебелината на семенните каналчета според класификацията на Volkmann (Volkmann et al., 2011), а не според диагноза.

Корелирахме степента на задебеляване с наличието и етапност в сперматогенезата, чрез имунохистохимичното позитивиране на клетките за tACE в кръгли и удължени сперматиди. Определохме процентното разпределение на tACE в семиниферните каналчета в тестис. С помоща на софтуер за анализ на изображението („DP-Soft” 3.2, Olimpus, Japan) чрез използване на мерителна решетка (19x25 полета) при увеличение x200, беше отчетено относителното процентно разпределение на tACE имунопозитивни клетки по формулата  $x=(n/475) \times 100$ , където n е броят на квадратчетата, в които има позитивни клетки за tACE, а 475 е общият брой квадратчета. Получените резултати бяха анализирани статистически.

## 6. Статистически анализ

Беше извършен количествен и статистически анализ на получените резултати, сравнявани бяха серии от едновременно проведени реакции, включващи материал от всички експериментални групи, с цел съпоставимост на резултатите, чрез еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Средната стойност от направените измервания на дебелината на стената на семенни

каналчета и експресията на tACE в сперматидите беше използвана, за да определим групите към които да бъдат отнесени съответните биопсии. На базата на направената морфологична класификация на дебелината на ЛП и сперматогенеза в отделните каналчета, по-късно направихме между групово сравнение и корелиране на данните. За да определим наличието на между групови разлики използвахме ANOVA Kruskal-Wallis и Mann-Whitney U-тест.

За изследване на взаимовръзките между отделните показатели от спермалния анализ и количеството на експресия на ACE клетъчна мембрана на сперматозоид и ACE семенна плазма използвахме корелационен анализ, рангов Spearman, а за определяне на статистическите различия беше приложен one-way ANOVA и Tukey post hoc тест за между групови различия, а за между групово сравнение използвахме ANOVA Kruskal-Wallis. За статистически значими са приети резултати с ниво на значимост  $p < 0.05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ .

За оценка влиянието на количеството tACE върху преразпределението на ензима в клетъчната мембрана на сперматозоида използвахме регресионен анализ. Всички данни са представени като средна аритметична  $\pm$  стандартна грешка на средната аритметична ( $X \pm SEM$ ). За обработка на данните беше използвана програмата SPSS 19.

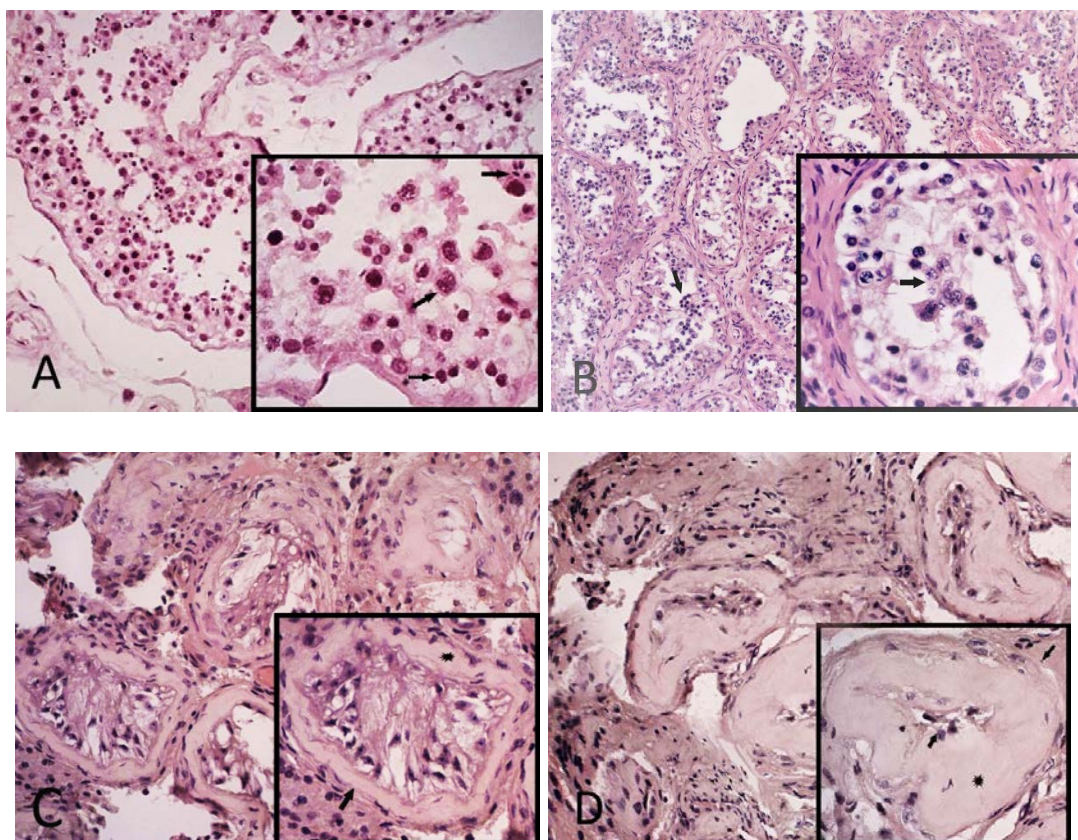
Пробите бяха получени от СБАХЛ „Д-р Малинов“, МДЛ „СИНЕВО“, Клиника по урология УМБАЛ „Св. Георги“. Предоставените материали бяха обработени и анализирани в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей при БАН-София и Катедра „Анатомия, хистология и ембриология“, МУ-Пловдив.

## IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### 1. Хистологична характеристика на семиниферни каналчета

#### 1.1. Рутинен хистологичен анализ – хематоксилин-еозин (H-E)

При хистологичния анализ след оцветяване с хематоксилин-еозин на парафинови срези от човешки биопсичен материал от група 1 (пациенти с обструктивна азооспермия), установихме ясно различни структури - семиниферни каналчета съдържащи около 3 слоя миофибробластни клетки в ЛП, Сертолиеви клетки и нормална сперматогенеза с всички видове герминативни клетки- сперматогонии, първични сперматоцити, сперматиди-кръгли и удължени, зрели сперматозоиди. В рехавата съединителна тъкан на тестикуларния интерстициум добре се различават Лайдигови клетки и кръвоносни съдове. (Фиг. 1. А). При светлинномикроскопското наблюдение на препаратите от материал на пациенти с варикоцеле установихме задебеляване на ЛП за сметка на увеличения ЕЦМ между слоевете миофибробластни клетки, което в отделни каналчета е съпроводено с нарушение в сперматогенезата, докато в други тубули сперматогените клетки са интактни. На база на задебеляването на ЛП и увеличения обем на отложен ЕЦМ биопсиите бяха отнесени към група 2 (Фиг. 1. В). При материала от група 3 (пациенти с варикоцеле и рак на тестиса) ЛП на семиниферните тубули се състои от добре различим външен слой от миофибробласти, граничещ с интерстициума и вътрешен, контактуващ с герминативния епител като между двата слоя се установява ЕЦМ с различна дебелина. Наблюдава се подчертано намаление на диаметъра на тубулите, липса на сперматогенни клетки и наличие на добре различни Сертолиевы клетки (Фиг. 1. С). Хистологичният анализ на биопсиите отнесени към група 4 (материал от пациенти с крипторхизъм) показва липсата на вътрешен слой от миофибробласти в ЛП, при което ЕЦМ (с вариабилна дебелина при отделните тубули) контактува с герминативния епител докато външният миофибробластен слой и разположените навън от него фибробластите са съхранени. Герминативният епител в голяма част от каналчетата е представен само от единични Сертолиевы клетки (Фиг. 1. D).

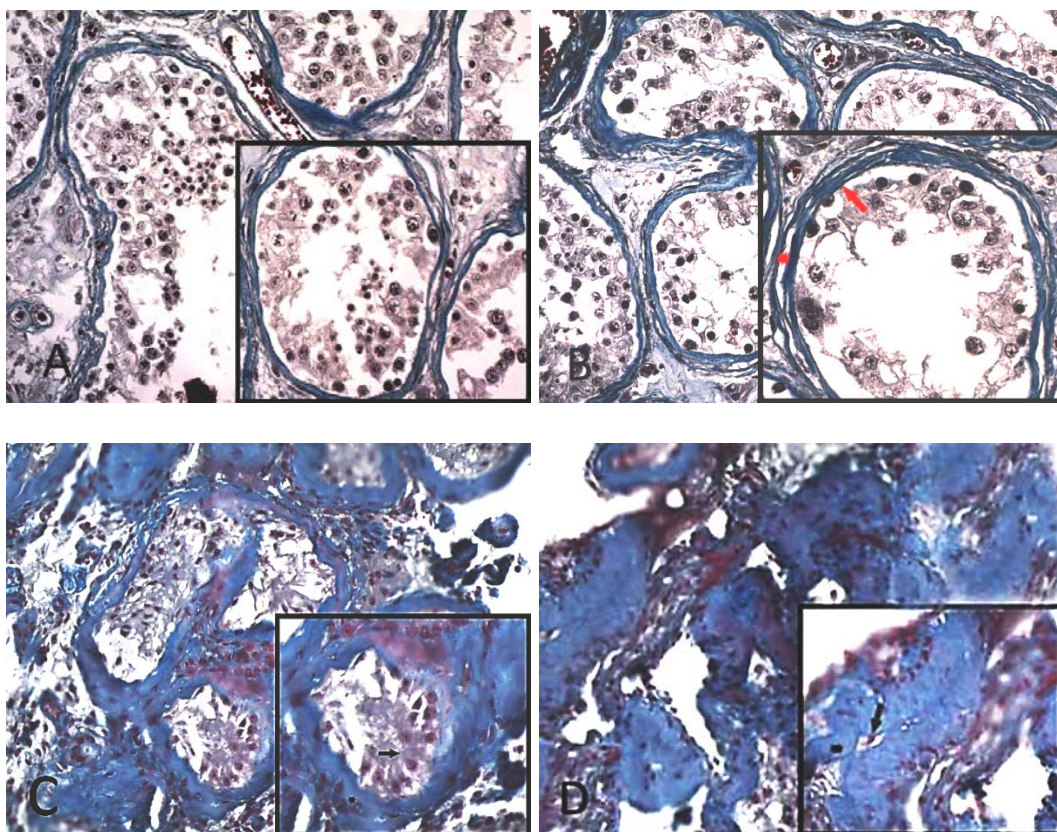


Фигура 1. Хистологичен анализ

А - биопсичен материал от група 1 - нормална морфология и дебелина на ЛП и съхранена сперматогенеза (→) - наличие на всички видове сперматогенни клетки, В - биопсичен материал от група 2 - задебелена ЛП, увеличен по обем и равномерно разпределен ЕЦМ между слоевете миофибробласти; в някои тубули сперматогенезата е намалена, съпроводена с дезорганизация и излющване в лумена на сперматогенния епител (→); С - биопсичен материал от група 3 (→) - задебеляване на ЛП с два ясно различни слоя от миофибробласти - външен и вътрешен; (\*) - отложен между тях ЕЦМ; липса на сперматогенни клетки и наличие на добре различни Сертолиевы клетки; D - (→) - липса на вътрешен слой от миофибробласти в ЛП, при което ЕЦМ (\*) контактува с герминативния епител; силно стеснен лумен на семиниферните каналчета. Оцв. Н-Е, x 100, x 400.

## 1.2. Хистологичен анализ - Оцветяване с Азан (по Heidenhain)

Анализът на препарати класифицирани в група 1 и оцветени с азан по Heidenhain (Kiernan, 2008) демонстрират интензивно оцветяване в синьо на колагеновите влакна намиращи се в структурите на ЛП, която разделя интерстициума и вътрешността на каналчетата. Визуализират се миофибробластните клетки (червени ядра и светлорозова цитоплазма) изграждащи ЛП (Фиг. 2).



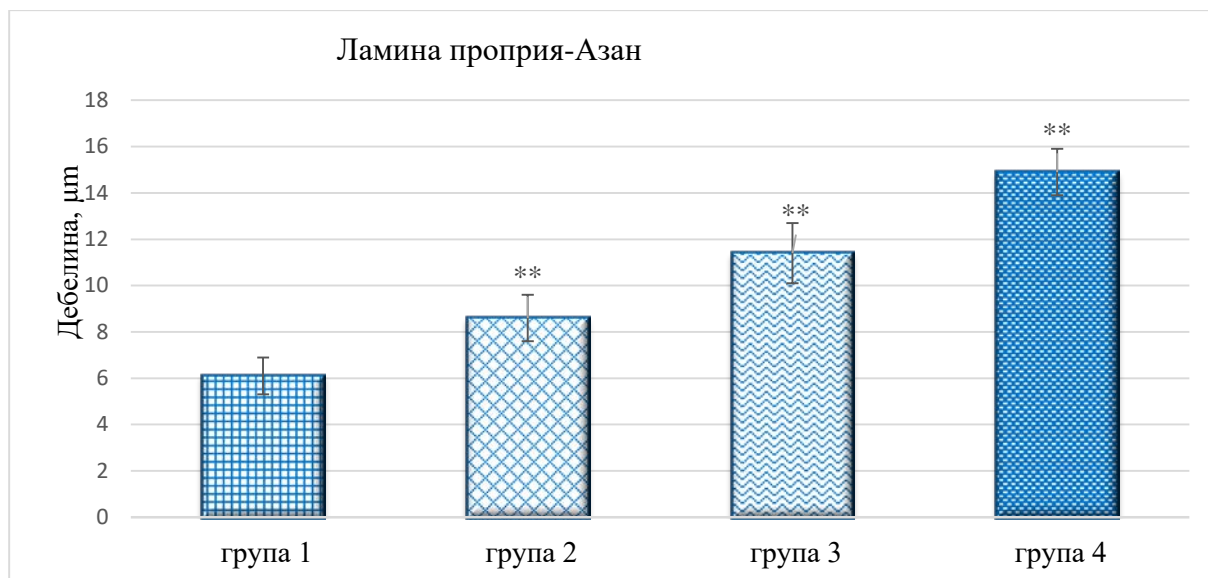
Фигура 2. Хистологичен анализ - оцветяване с азан (по Heidenhain)

А - биопсичен материал от група 1 - нормална дебелина на ЛП; В – група 2 (→) умерено задебелена ЛП, (\*) - отложен колаген между миофибробластите, С - група 3 (\*) увеличена дебелина на ЕЦМ, (→) преобладават Сертолиеви клетки в каналчетата; D - група 4 (\*) изразено отлагане на ЕЦМ, (→) единични Сертолиеви клетки, контактуващи с ЕЦМ. Оцветяване - азан (по Heidenhain), x200, x400.

Оцветяването с азан на ЛП потвърждава наблюденията при рутинната хистология с Н-Е, представяйки повече подробности. Установихме промяна във вида на ЛП- с увеличаване на дебелината се променя релефа, увеличава се неправилния контур в очертанията ѝ. При направения сравнителен анализ на препаратите поставени в групи 2, група 3 и група 4 (Фиг. 2, В, С и D) задебеляването е доста категорично изразено, съпроводено с отлагане на екстрацелуларен матрикс между миофибробластните слоеве, сперматогенезата е силно редуцирана до липса на сперматогенни клетки в отделни каналчета, с наличие само на единични Сертолиевы клетки.

Таблица 3. Морфология на Ламина проприя - оцветяване с азан

Морфология азан	Брой пациенти	Брой измервания	Средна стойност / $\mu\text{m}$ на измерване	SD	CI/95%		p-value спрямо Група 1
					долна граница	горна граница	
Група 1	5	269	6,1	0,8	5,06	7,2	
Група 2	7	228	8,6	1,06	7,64	9,6	p=0,007
Група 3	8	184	11,4	1,3	10,32	12,5	p=0,003
Група 4	6	237	14,94	1,08	13,8	16,08	p=0,002

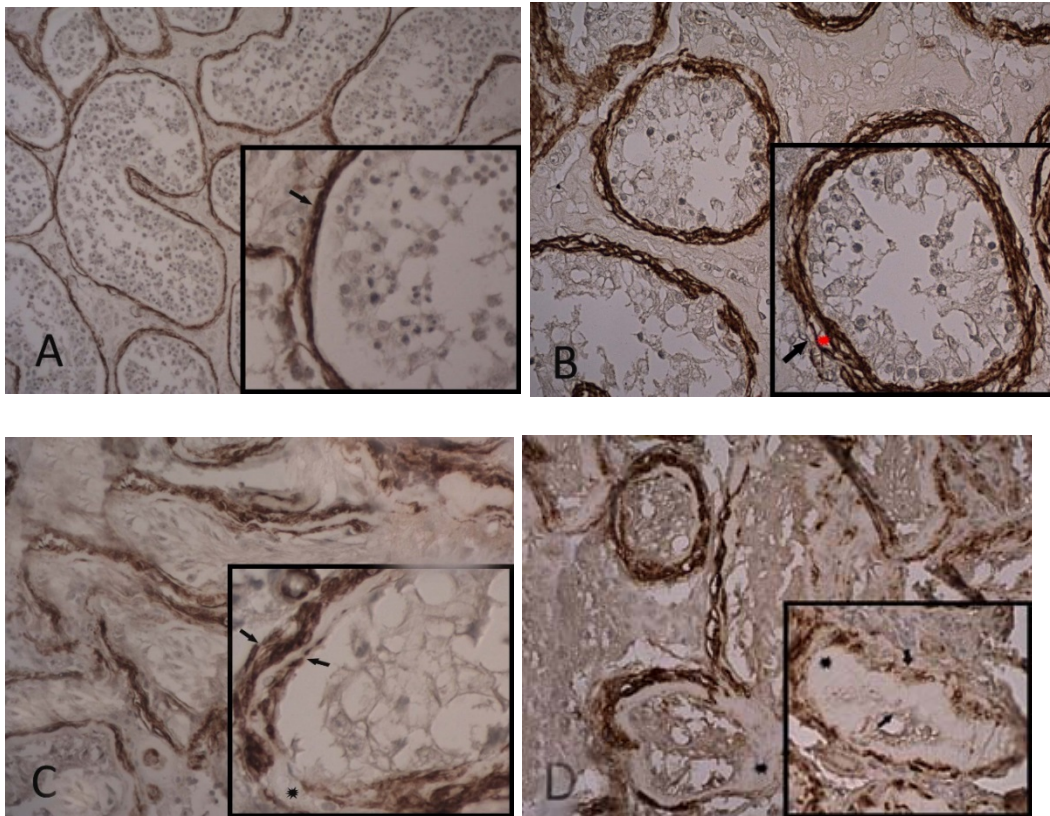


Фигура 3. Дебелина (µm) на ЛП.

Представено е морфометрично измерена дебелината на ЛП след оцветяване с азан (по Heidenhain) в четирите групи, \*\*  $P < 0.05$ .

Статистическият анализ чрез използване теста на *Mann-Whitney* (Фиг. 7). на получените резултатите от измерената дебелина на ЛП след оцветяване с азан разкрива статистически достоверни разлики при ( $p < 0,007$ ,  $p < 0,003$ ,  $p < 0,002$ ) при сравняване на стойностите измерени за всяка една от обособените групи. Много ясно се открива разликата в дебелината във всяка група, като се наблюдава постепенно увеличаване от група 1 към група 4.

### 1.3. Имунореактивност за $\alpha$ -SMA



Фигура 4. Имунореактивност за  $\alpha$ -SMA

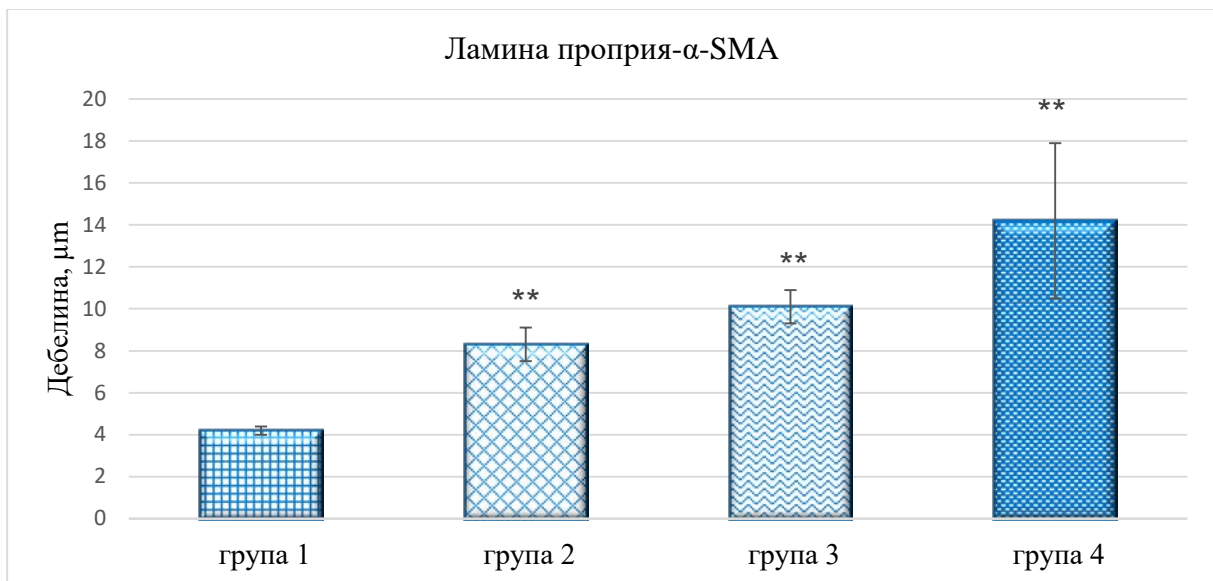
A - група 1 - интактна ЛП, B - група 2 (\*) - увеличение на ЕЦМ между миофиброблстите, (→) - дебелина ЛП; C - два слоя: вътрешен един ред миофибробласти (→), външен няколко слоя миофибробласти (→), (\*) - ЕЦМ с различна дебелина в отделни каналчета; D - (\*) - увеличено количество ЕЦМ контактуващ с сперматогенния епител, (→) редуциран лумен със Сертолиевы клетки, (→) - външни миофибробласти контактуващи с интерстициума, x100, x200, x 400.

В група 1 (Фиг. 4. А) имунореактивността за  $\alpha$ -SMA е добре визуализирана в миофибробластните клетки в стената на семиниферните тубули, без да се регистрират изменения. Наблюдава се съхранена сперматогенна активност. В група 2 (Фиг. 4. В) имунореактивността за  $\alpha$ -SMA е добре изразена, но се отчита увеличение в дебелината на ЛП вследствие на увеличено отлагане на ЕЦМ. В група 3 (Фиг. 4. С) ясно се разграничават двата слоя миофибробласти - вътрешен от един ред миофибробласти и външен с няколко слоя миофибробласти и отложения между тях ЕЦМ, който има променлива дебелина в отделните каналчета. На базата на имунореактивността за  $\alpha$ -SMA измерихме дебелината на стената на семиниферните каналчета, при което установихме значително задебеляване в отделни каналчета, дължащи се вероятно на по-голямото количество ЕЦМ между миофибробластните слоеве. Отчита се и намалената сперматогенна активност в тубулите.



Таблица 4. Статистически данни за имунореактивността на  $\alpha$ -SMA

Имунохистохимия $\alpha$ -Актин	Брой пациенти	Брой измервания	Средна стойност / $\mu\text{m}$ на измерване	SD	CI/95%		p-value спрямо Група 1
					долна граница	горна граница	
Група 1	5	254	4,2	0,2	3,9	4,5	
Група 2	7	204	8,3	0,8	7,5	9,1	<0,05
Група 3	8	170	10,1	0,8	9,4	10,8	<0,05
Група 4	6	87	14,2	3,7	10,7	17,6	<0,05



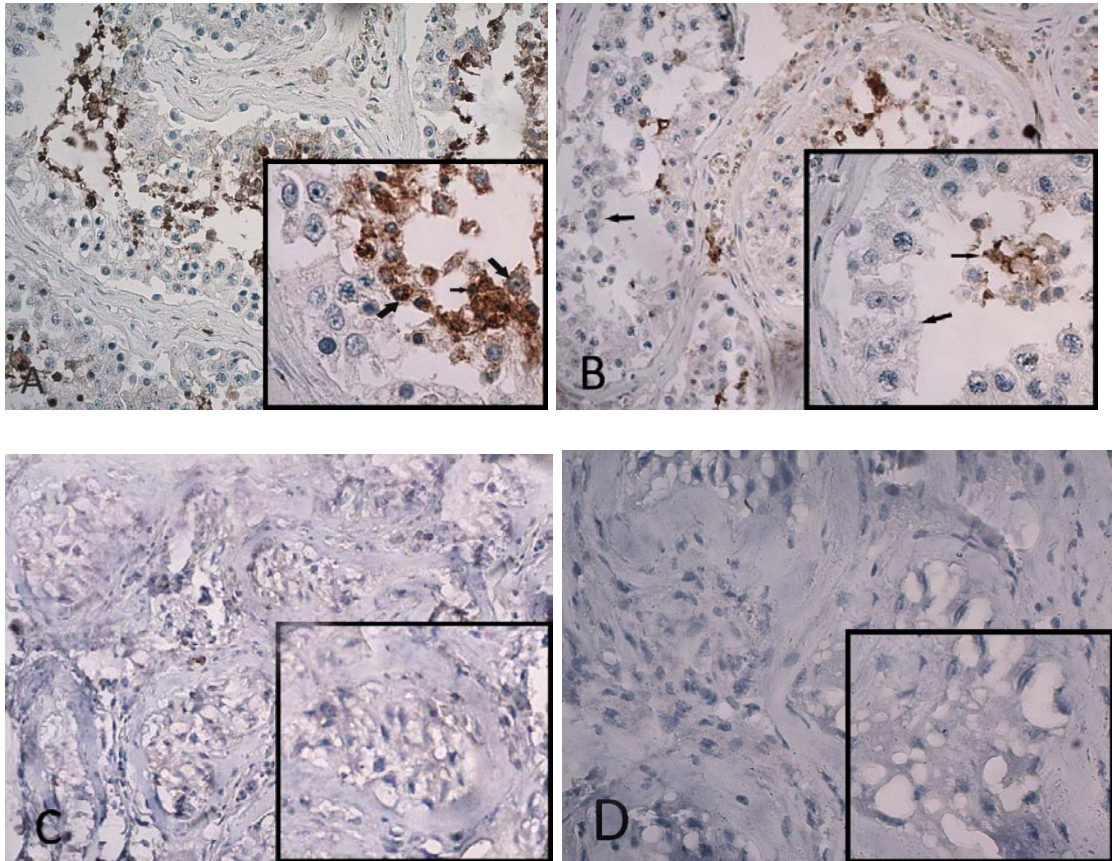
Фигура 5. Имунореактивност за  $\alpha$ -SMA в лamina проприя

На фиг. 5 са представени данните от измерване на дебелината на ЛП, изграждаща стената на семенните каналчета чрез имунореактивността за  $\alpha$ -SMA в четирите групи. Използван е тест на Mann-Whitney,  $**P < 0,05$ .

Получените резултати от измерването показаха статистически значима разлика между измерените стойности в групите при възходящо подреждане. Сравненията между групите показаха сигнификантна разлика ( $p=0,003$ ;  $p=0,004$ ), като между група 1 и група 2 беше отчетено повишение в дебелината на стената на тубулите ( $p=0,004$ ). За група 2 измерената средна стойност, показва увеличаване в дебелината, което вероятно се дължи на умерено задебеляване на ЛП, вследствие на повишена секреция от миофибробластите на колагенови фибрили ориентирани в различни направления. Сравнение на данните от група 3 ( $p=0,003$ ) и група 4 ( $p=0,004$ ), показва тенденция към повишаване на средните стойности на дебелината на стената на семиниферните каналчета в сравнение с група 1.

#### 1.4. Определяне на сперматогенна активност чрез tACE

За прецизиране на нарушенията в сперматогенезата в контекста на експресията на ACE, използваме тестикуларната изоформа на ACE, с доказано участие в процеса на спермиогенеза, зреене, движение и капацитация на зрелите сперматозоиди.



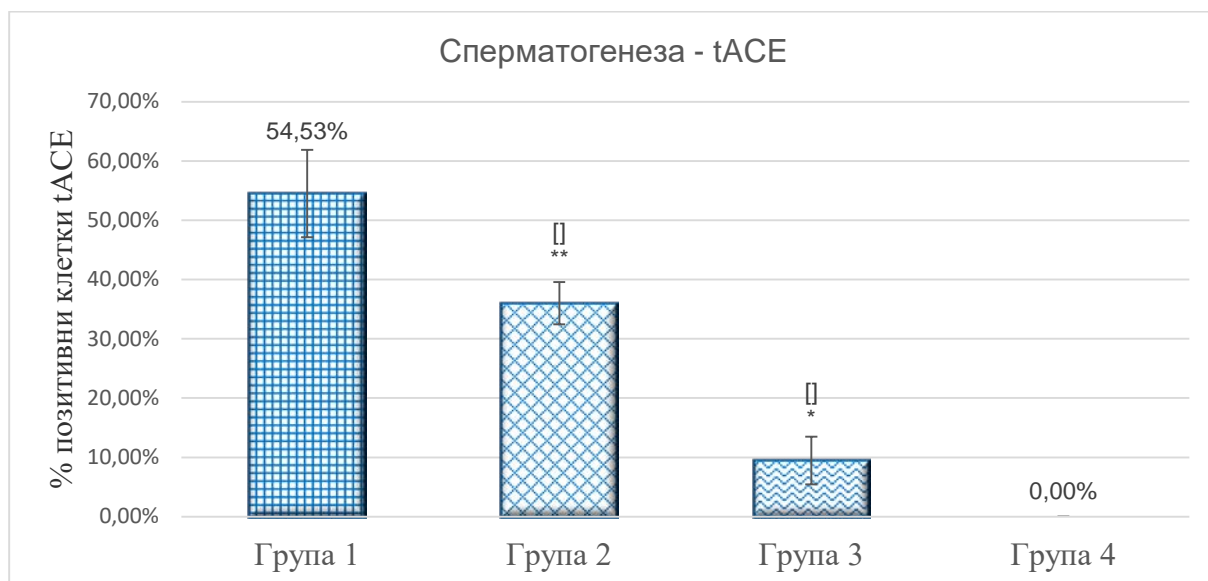
Фигура 6. Имунореактивност за tACE

А - група 1 - tACE се визуализира в кръгли и удължени сперматиди, В - група 2 - намалена tACE експресия в сперматиди в отделни каналчета, С - група 3 - слаба експресия в единични кръгли сперматиди, липса на удължени и зрели сперматозоиди, преобладават само Сертолиеви клетки, D - група 4 - липса на сперматогенни клетки, наличие само на Сертолиеви клетки. x200, x 400.

Имунохистохимичният анализ за група 1 установи експресия на tACE протеина само в герминативния епител на семенните тубули, по-слабо представен в кръгли и с по-силна експресия в издължените сперматиди. В група 2 се регистрира значително по-слаба имунореактивност за tACE, като повечето каналчета не са имунопозитивни. За група 3 и група 4 не установяваме експресия на tACE в семиниферните каналчетата

Таблица 5. Статистически данни за имунопозитивност за tACE

Имунохистохимия tACE	Брой пациенти	Брой измервания	% Позитивни клетки tACE	SD	p-value спрямо Група 1
Група 1	5	259	54,53	7,37	
Група 2	7	171	36,00	3,58	<0,05
Група 3	8	45	9,47	4	<0,05
Група 4	6	0	0	0	



Фигура 7. Разпределение на имунопозитивни сперматозоиди за tACE

На таблица 5 и фигура 7 са отразени процентите на имунопозитивни клетки за tACE получени след измерване на среден брой положителни клетки в семиниферно каналче в четирите групи,  $**P < 0,05$ .

Анализът на резултатите от средното разпределение на tACE в имунопозитивни клетки за семенно каналче показва сигнификантно по-голям брой в сперматогенни клетки за каналче в група 1 в сравнение с група 2 ( $p=0,007$ ) и група 3 ( $p=0,003$ ). Тенденцията е към намаляване на средния % имунопозитивни клетки, като в група 4 е равен на 0 (Фиг. 7). За междугрупово сравнение е използван тест на *Mann-Whitney*.

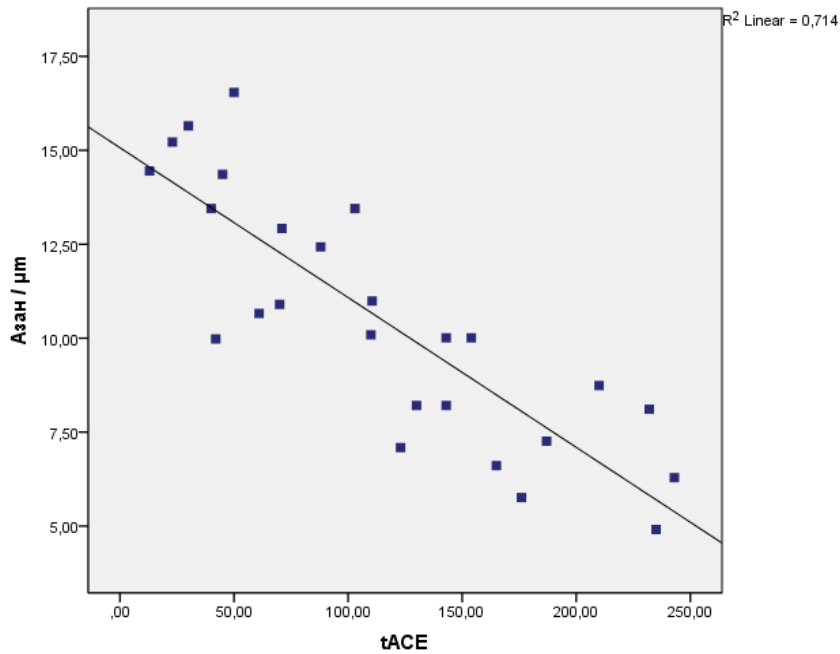
### 1.5. Резултати от измерена дебелина ЛП и връзка с tACE експресия

Направеното сравнение между дебелината на ЛП и процента позитивни клетки за tACE в измерените семиниферни каналчета има за цел да определи наличието на връзка между двата показателя.

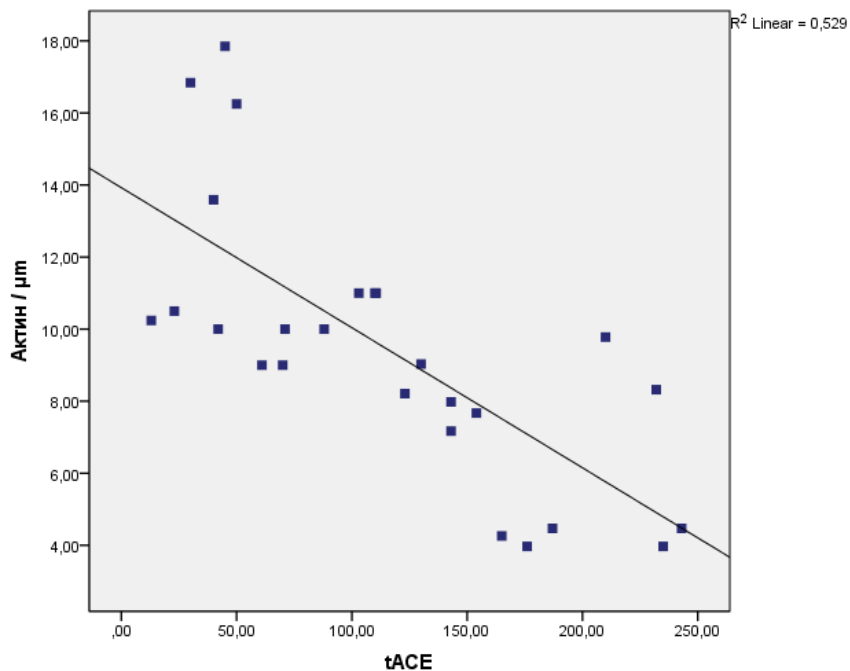
Направеният корелационен анализ показва много силна отрицателна сигнификантна връзка между дебелината на ЛП и процента на позитивните клетки за tACE в изследваните семиниферни каналчета и при двата вида измервания -

азан ( $p=0,01$ ) и  $\alpha$ -SMA ( $p=0,01$ ), които са съпоставими относно изявата на tACE. Нарастване в дебелината на семенните тубули води до нарушение в сперматогенезата, като тя е най-силно изразена в група 3 и особено в група 4.

А



В



Фигура 8. Корелация между морфология на ЛП и имунопозитивни за tACE сперматиди

Таблица 6. Корелация между дебелина на ЛП и tACE експресия в сперматогенни клетки

Морфология ЛП	Сперматогенеза(tACE)
Азан	r=-0,845
	p=0,01
	**
α-SMA	r=-0,728
	p=0,01
	**

На табл. 6. са представени корелационните коефициенти на Spearman определящи степента на влияние на дебелината на ЛП и % имунопозитивни клетки за tACE в сперматогенният епител, \*\* P < 0.01.

На фиг. 8 (А и В) и табл. 6 са представени данните от направената корелационна зависимост между дебелината на стената на семиниферните каналчета и сперматогенезата. При измерване на дебелината на каналчетата се отчита сигнификантно покачване спрямо интакните каналчета в група 1, като при диаметъра на лумена се наблюдава намаление в размера от група 1 към група 4. В същите каналчета процентът на имунопозитивни клетки за tACE, намалява от група 1 към група 4. В група 1 - 54,53% от клетките в тубулите са имуноположителни за tACE, в група 2 - 36,00% , в група 3 - 9,47%, а в група 4 този % е 0, т.е. тубулите не съдържат сперматогенни клетки. При сравнителното измерване между ЛП и нарушението в сперматогенезата в група 4, най-висока е отрицателната корелационна връзка показваща взаимното влияние на двата фактора, дебелина на ЛП (екстрацелуларен матрикс, миофибробластни слоеве) Ж28 и имунопозитивни клетки за tACE в сперматогенния епител (α-SMA r=-0,728, p=0,01, азан r=-0,845, p=0,01).

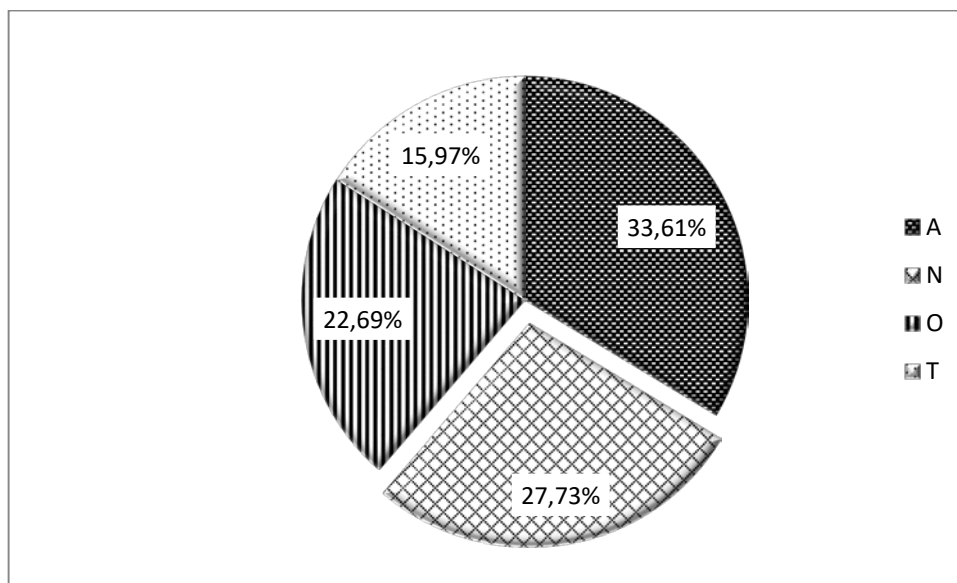
## 2. Резултати от спермален анализ

Рутинен спермален анализ е направен на 111 проби еякулат от пациенти със стерилитет на възраст от 20-51 г., като в зависимост от резултатите са диагностицирани като Нормозооспермия (Н), Астенозооспермия (А), Олигозооспермия (О) и Тератозооспермия (Т), в съответствие със стрикното спазване на изискванията на Световната здравна организация (WHO 5th, 2010). След анализа материала се обработва, описва, надписва и съхранява (подробно описано в гл. Материали и Методи).

Таблица 7. Средни стойности от спермален анализ

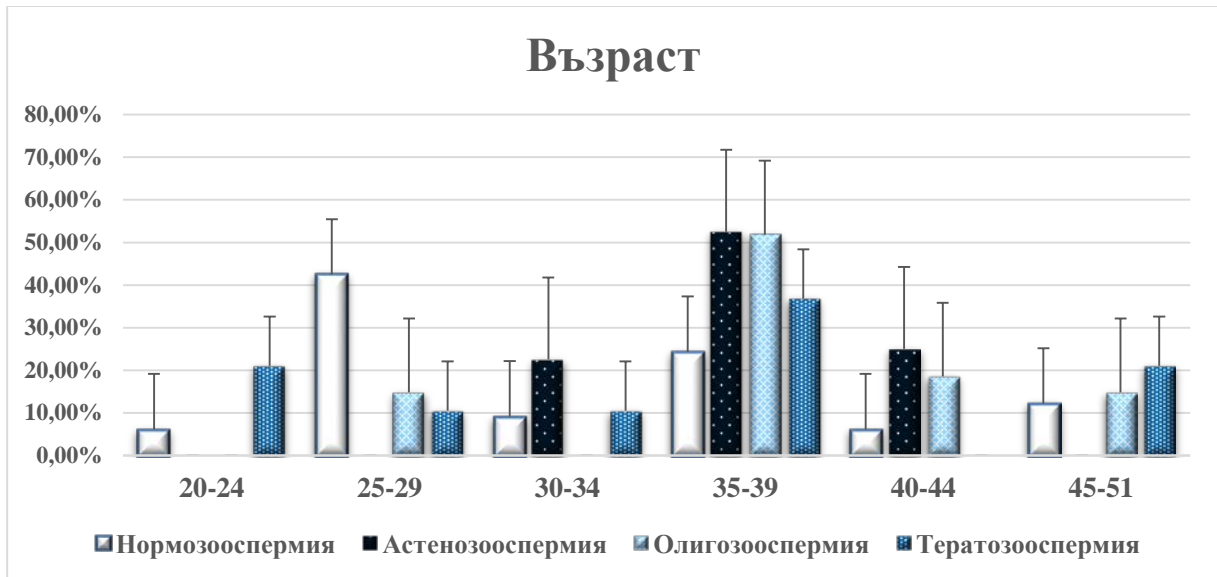
Диагноза	Характеристика	Н	А	О	Т
		n=31	n=31	n=25	n=24
		Mean±SD	Mean±SD P	Mean±SD P	Mean±SD P
Концентрация	Еякулат	86,05±54,1	64,57±72 0,422	22,8±11, 0,047*	53,3±53, 0,237
Подвижност	PR	48,41±13,3	24,18±6, 0,05*	34,62±1, 0,05*	30,04±5, 0,05*
	NP	7,03±1,8	9,17±2,4 0,953	6,63±2,5 0,989	9,41±2,7 0,072
	IM	44,57±13,4	66,65±6, 0,05*	58,75±1, 0,05*	60,55±6, 0,05*
Морфология	Нормални форми	14,9±0,9	5,06±2, 0,031	3,7±1,5 0,05*	4,5±,1 0,05*
	Дефект глава	83,3±1,9	93,3±,7 0,05*	95,8±1, 0,05*	94,5±1 0,05*
	Дефект шийка	27,36±2, Mean %	39,06±5 Mean %	45,4±4, 0,05* Mean %	47,1±5 Mean %
Възраст	20-24	6,06			21,05
	25-29	42,42		14,81	10,53
	30-34	9,09	22,5		10,53
	35-39	24,24	52,5	51,85	36,84
	40-44	6,06	25	18,52	
	45-51	12,12		14,81	21,05
	SD	13,06	19,24	17,34	11,54

Таблица 7. Н - Нормозооспермия; А - Астенозооспермия; О - Олигозооспермия и Т - Тератозооспермия; PR - прогресивно подвижни; NP - непрогресивно подвижни; IM - неподвижни; Mean - средна стойност; (SD) стандартно отклонение; P-value (p<0,05).



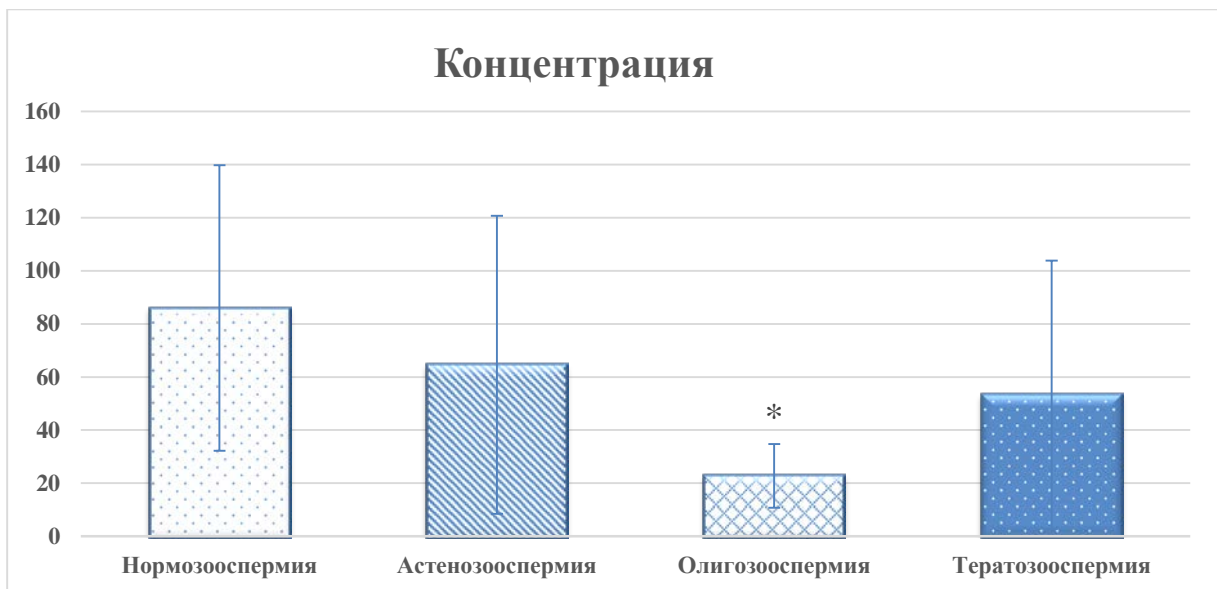
Фигура 9. Разпределение на пациентите по диагноза

На базата на направения спермален анализ определихме процентното разпределение на пациентите в групите - Нормозооспермия (Н), Астенозооспермия (А), Олигозооспермия (О) и Тератозооспермия (Т).



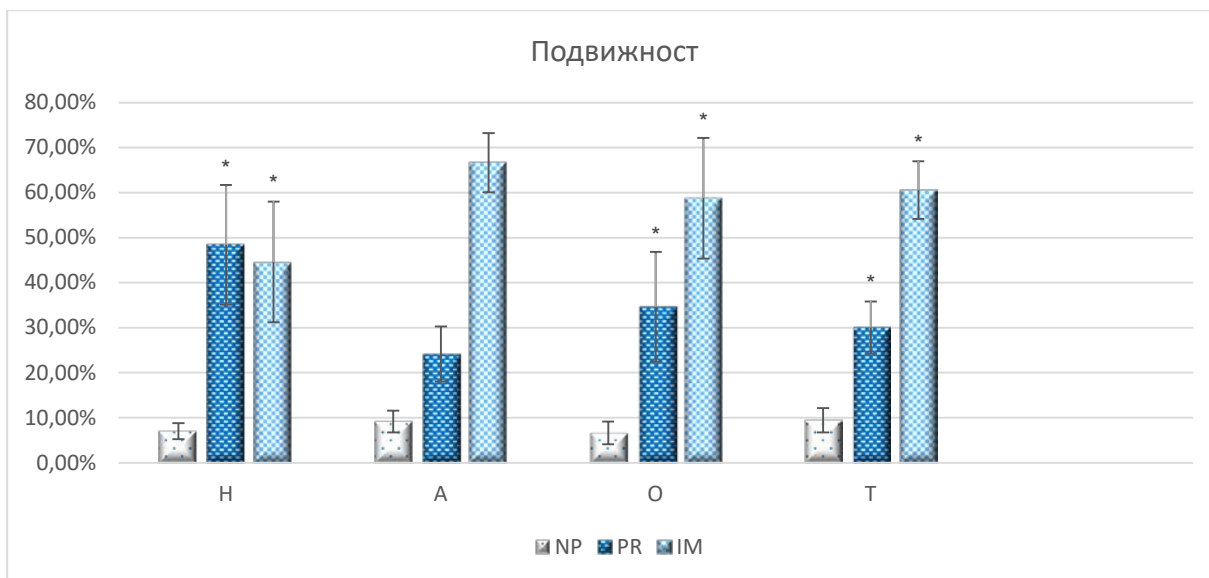
Фигура 10. Възраст на пациентите

При анализ възрастта на пациентите установихме, че най-голям брой мъже са представени във възрастова група 35-39 г., както и във възрастова група 40-44 г. като най-висок е процентът диагностицирани с Астенозооспермия и Олигозооспермия, следвани от Тератозооспермия. Очаквано най-висок е процентът на пациентите с нормозооспермия във групата на 25-29 годишните.



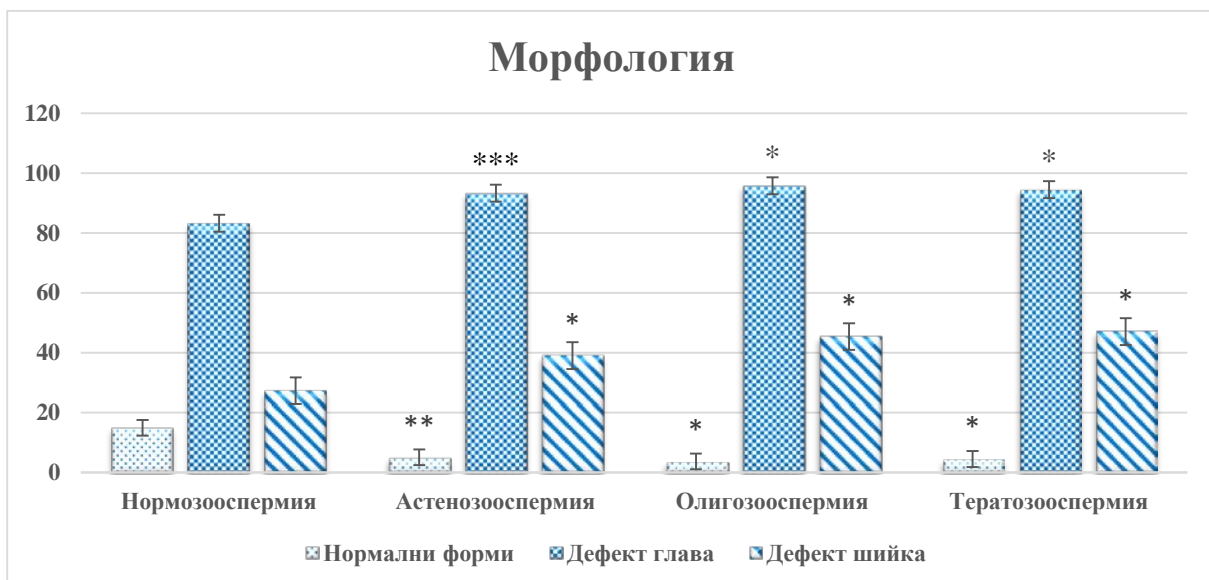
Фигура 11. Спермална концентрация в еякулат

Сравнителното отразяване на спермалната концентрация в групите, показва висока вариабилност, което е видно от стандартното отклонение.



Фигура 12. Подвижност: PR - прогресивно подвижни; NP - непрогресивно подвижни; IM - неподвижни.

Общата подвижност се определя като сума от Прогресивно подвижни, Непрогресивно подвижни и Неподвижни (PR+NP+IM) (%) сперматозоиди в четирите разглеждани групи. При Нормозооспермия процентът на прогресивно подвижните е близо два пъти по-висок в сравнение с Астенозооспермия, Олигозооспермия и Тератозооспермия. При направеното междугрупово сравнение отчитаме най-голямо различие в групата на Астенозооспермия ( $p < 0,001$ ), следвано от Олигозооспермия и Тератозооспермия ( $p < 0,05$ ).



Фигура 13. Морфологична характеристика

Морфологията на сперматозоидите отчита висок процент на дефектни сперматозоиди в главичния отдел във всички изследвани групи. От резултатите се вижда че преобладават дефектите в главовия отдел, следван от промени в шийния отдел като сперматозоидите с нормална морфология според критериите на СЗО са с много нисък процент.

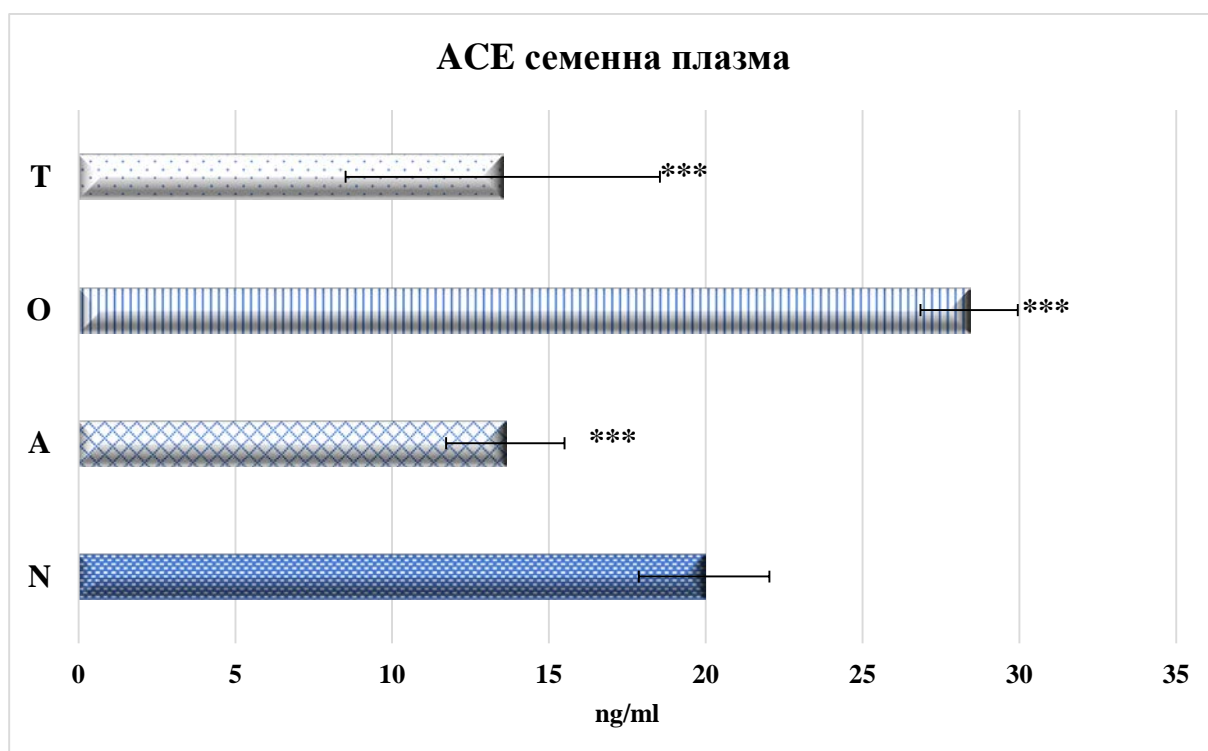


### 3. Количествено определяне на АСЕ чрез метода ELISA

#### 3.1. Резултати АСЕ концентрация в семенна плазма

Таблица 8. Количество АСЕ семенна плазма

АСЕ семенна плазма ng/ml	Брой	Средна стойност	Стандартно отклонение	CI/95%		мин.	макс.
				долна граница	горна граница		
Нормозооспермия	13	19,95	2,08	18,68	21,21	17,32	24,39
Астенозооспермия	13	13,61	1,89	12,47	14,76	10,23	16,11
Олигозооспермия	14	28,4	1,55	27,5	29,29	25,68	30,78
Тератозооспермия	14	13,53	5,01	10,62	16,42	8,34	21,82



Фигура 14. Концентрации АСЕ семенна плазма.

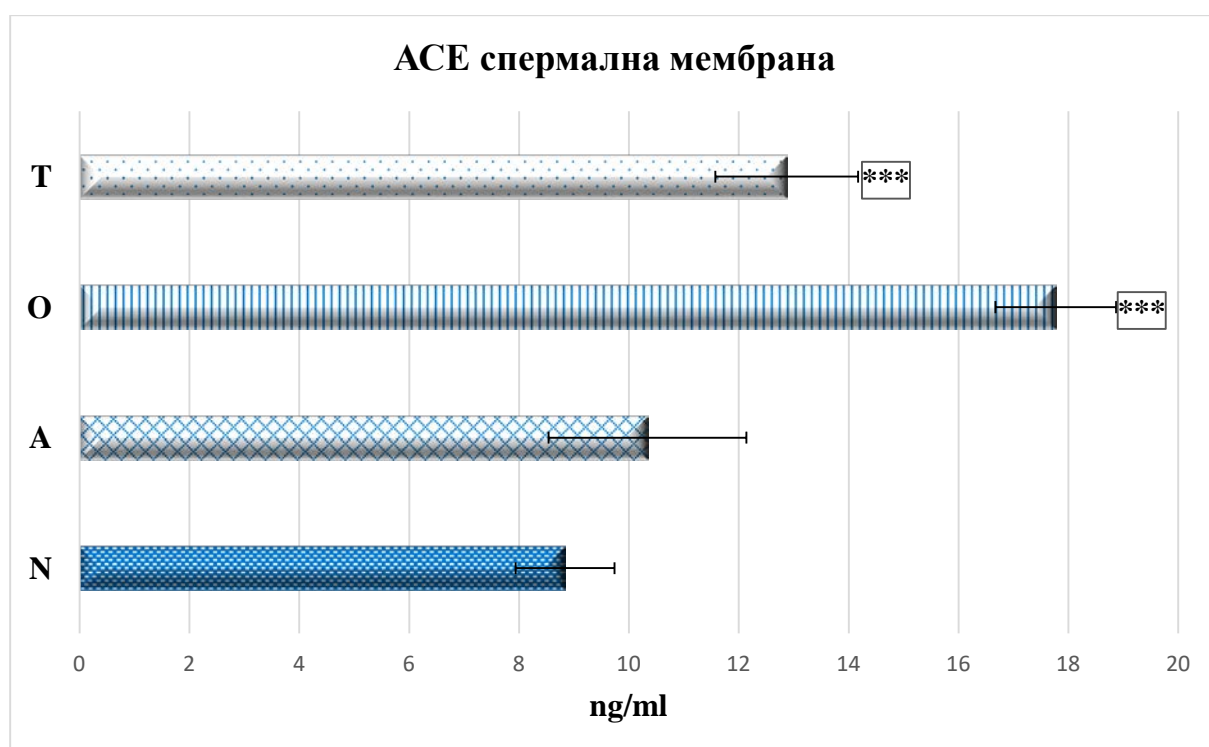
N - Нормозооспермия, А - Астенозооспермия, О - Олигозооспермия и Т - Тератозооспермия. Сравнение в количеството на sАСЕ в четирите групи семенна плазма,  $p < 0,05$ .

При направеното сравнително измерване между групите и статистическия анализ установихме 30% понижение в стойностите на АСЕ в семенна плазма при Тертозооспермия и Астенозооспермия. Значително повишение се отчита в групата на Олигозооспермия. Разликите в средните стойности на отделните групи инфертилните пациенти спрямо контролата са статистически достоверни.

### 3.2. Резултати АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоиди

Таблица 9. Концентрация АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид

АСЕ спермална мембрана ng/ml	Брой	Средна стойност	Стандартно отклонение	CI/95%		мин.	макс.
				долна граница	горна граница		
Нормозооспермия	13	9	1,1	8,32	7,32	7,32	10,63
Астенозооспермия	13	9,22	2,9	7,44	3,54	6,98	13,65
Олигозооспермия	14	8,4	1,5	7,5	5,68	15,68	10,78
Тератозооспермия	14	13,07	1,4	12,24	10,87	10,87	15,65



Фигура 15. Концентрация АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид.

N - Нормозооспермия, А - Астенозооспермия, О - Олигозооспермия и Т - Тератозооспермия.

Концентрацията на АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид беше определена в клетъчен лизат от сперматозоиди и е представена като съотношение между концентрацията на маркера в хомогената спрямо общия белтък в хомогената (mgACE/ mg белтък) и ELISA метод. Измерените нива на tACE клетъчна мембрана на сперматозоид показват по-високи стойности в инфертилни пациенти в сравнение с мъже с нормозооспермия. Олигозооспермия показва двойно по-високи стойности за АСЕ в спермална мембрана, а при тератозооспермия се отчита повишение с 45%, като различията с нормозооспермията са статистически достоверни.

### 3.3. Резултати от спермалния анализ и връзка с АСЕ концентрации

Направеното от нас сравнение между основните показатели от спермалния анализ и концентрацията на АСЕ семенна плазма и АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид има за цел да се определи ролята на двете изоформи АСЕ и влиянието им върху сперматозоидите и спермалните показатели.

Направеният корелационен анализ не показва наличие на сигнификантна връзка с концентрацията на сперматозоидите и количественото представяне на АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид ( $p = -0,356$ ). При анализиране връзката между подвижността ( $p = 0,005$ ) и морфологията ( $p = 0,043$ ) отчитаме отрицателна корелация. При съпоставяне на възрастта с нивата на АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоидите установихме значима положителна корелация ( $p = 0,027$ ).

При корелационния анализ между АСЕ семенна плазма и концентрацията ( $p = 0,004$ ,  $r = -0,309$ ) отчитаме отрицателна връзка. Нивата на АСЕ семенна плазма не оказват влияние върху подвижността ( $p = 0,557$ ) и морфологията ( $p = 0,068$ ), но възрастта оказва сигнификантно положително влияние ( $p = 0,003$ ). Всички данни са поместени в таблица 12.

Таблица 10. Влияние на АСЕ върху спермалните показатели

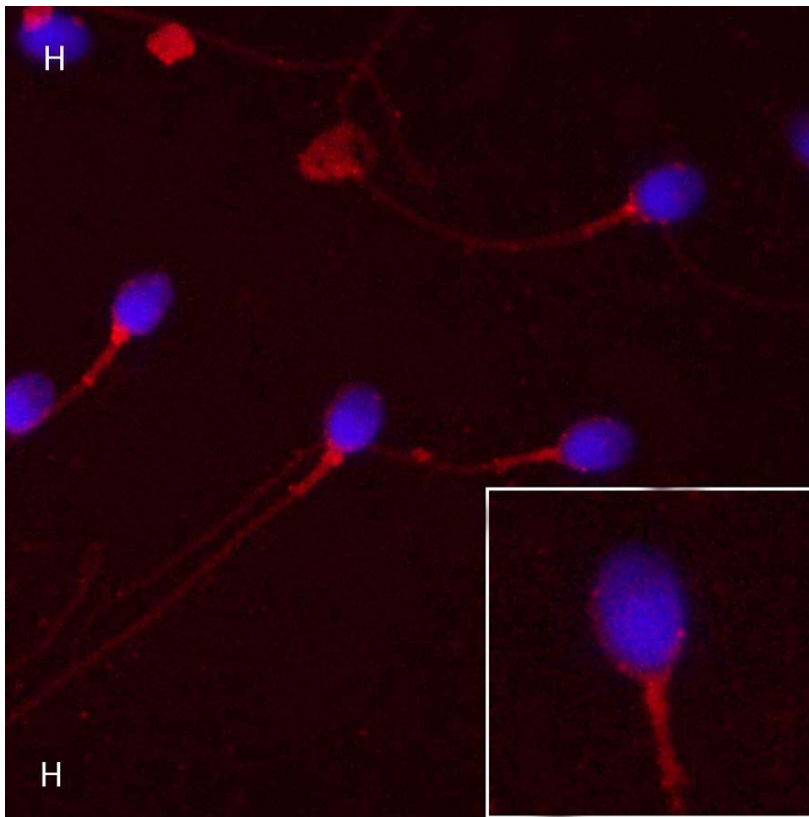
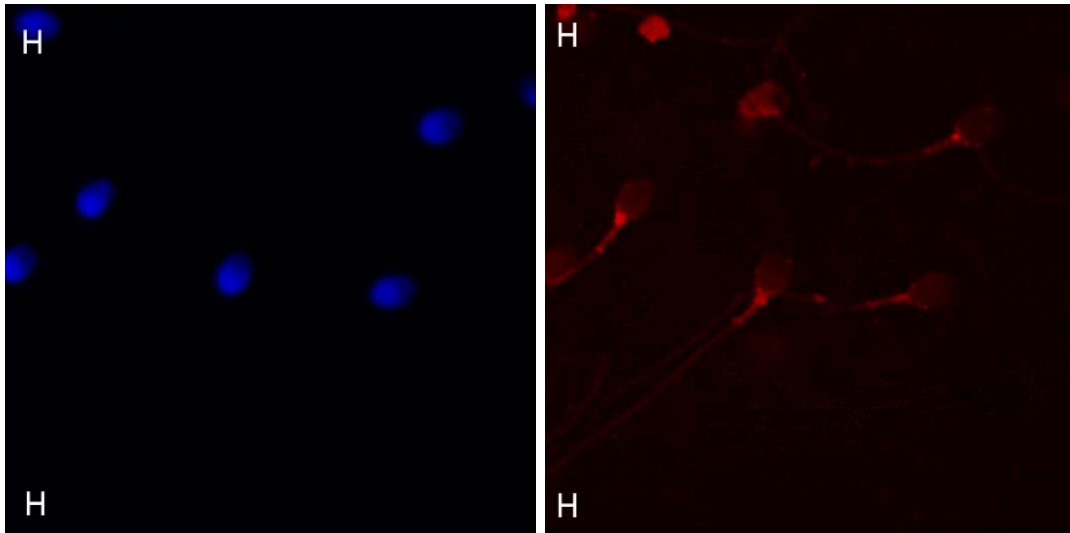
Стойности	Концентрация	Подвижност	Морфология	Възраст
АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид	$r = -0,126$ $p = 0,356$	$r = -0,375$ $p = 0,005$ *	$r = -0,273$ $p = 0,043$ *	$r = 0,225$ $p = 0,027$ *
АСЕ семенна плазма	$r = -0,309$ $p = 0,004$ *	$r = 0,080$ $p = 0,557$	$r = 0,202$ $p = 0,068$	$r = 0,299$ $p = 0,003$ **

Таблица 10. Корелационни коефициенти на Spearman определящи степента на влияние на АСЕ семенна плазма и АСЕ клетъчна мембрана на сперматозоид върху основните спермални характеристики- концентрация, подвижност, морфология и възраст. \*  $P < 0.05$  и \*\*  $P < 0.01$ .

## 4. Индиректна имунофлуоресценция

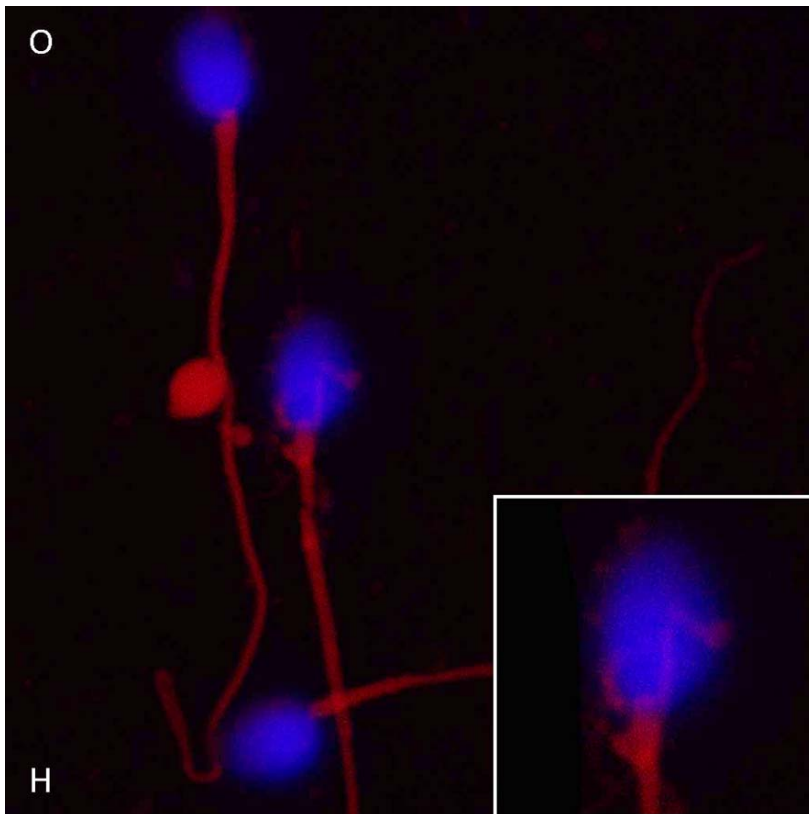
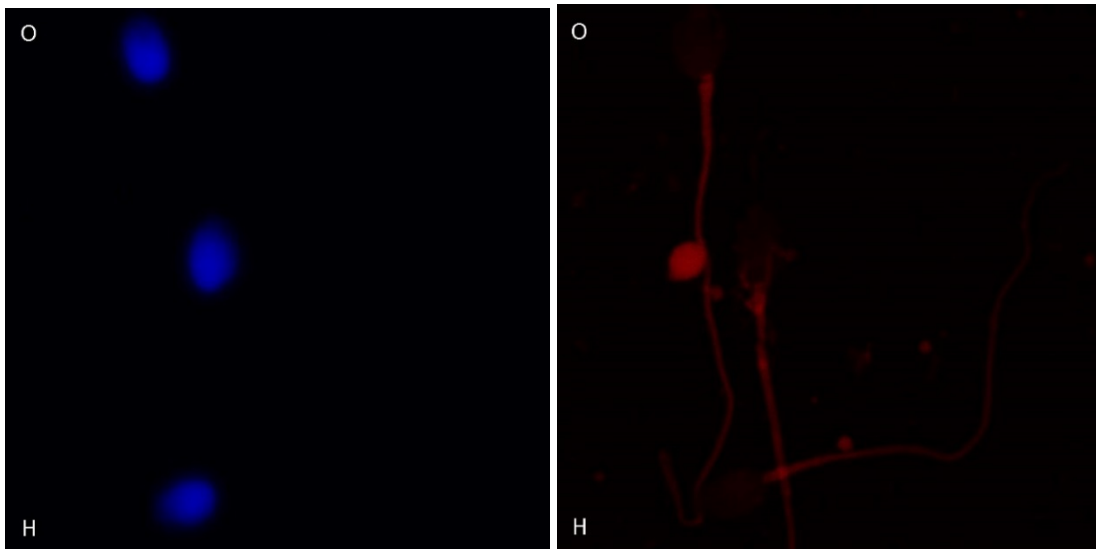
### 4.1. Имунофлуоресцентна визуализация на tАСЕ в нетретирани сперматозоиди

Използвахме специфичен софтуер, за да измерим площта на имуноекспресия на ензима, в трите подгрупи - нетретирани, капацитирани и акрозомно реагирани сперматозоиди в *in vitro* условия с прилагане на лазерно-конфокална система на Leica TCS SPE.



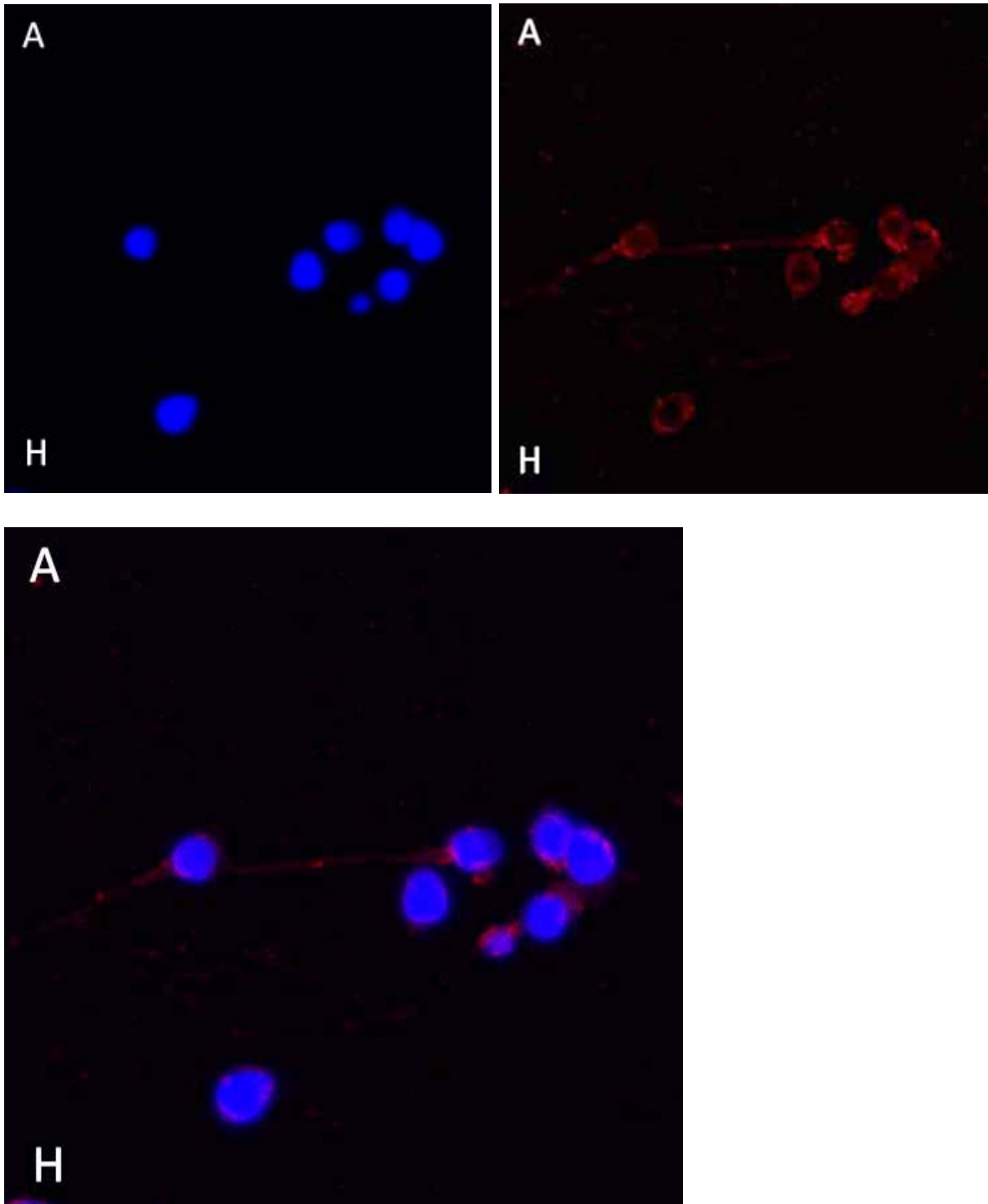
Фигура 16. Нормозооспермия - нетретираны сперматозоиди

H - нормозооспермия, H - нетретираны сперматозоиди; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; оригинално увеличение×600; Bar = 5 μm.



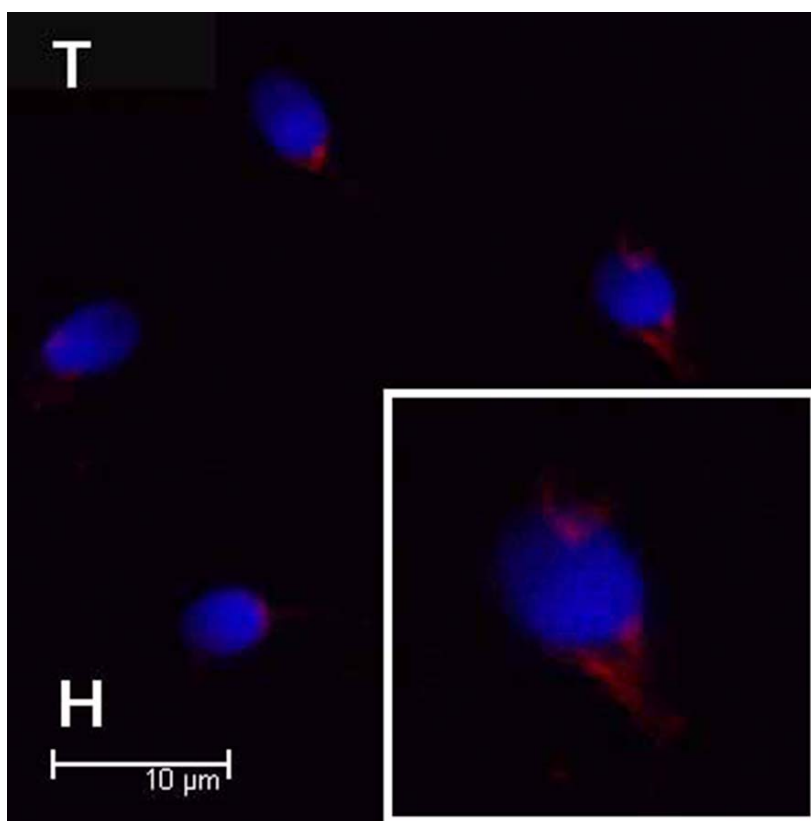
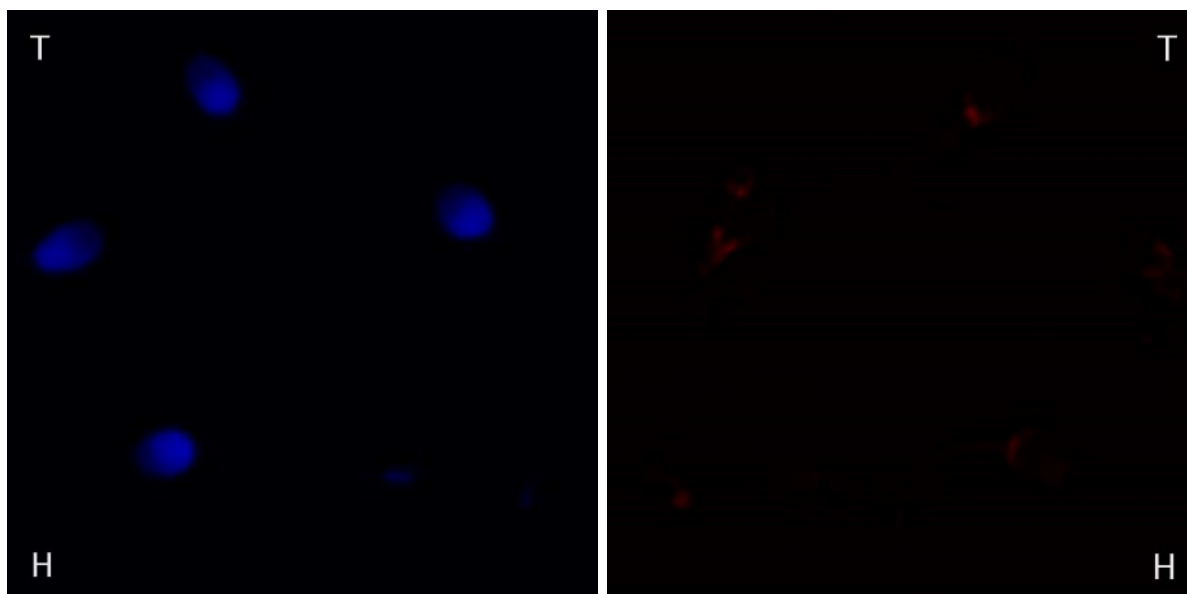
Фигура 17. Олигозооспермия - нетретирани

О - Олигозооспермия; Н - нетретирани; синьо оцв. - АРІ; червено оцв. - анти-tACE; оригинално увеличение×600; Bar=5 μm.



Фигура 18. Астенозооспермия - нетретираны

A - Астенозооспермия; H - нетретираны; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; оригинално увеличение×600; Bar = 5  $\mu$ m.



Фигура 19. Тератозооспермия - нетретираны

T - Тератозооспермия; H - нетретираны; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; оригинално увеличение×600; Bar = 10 μm.

В групата на пациентите с Нормозооспермия-нетретираны сперматозоиди на фиг. 16 е показана равномерната експресията на tACE върху плазмената мембрана в акрозомната и екваториалната област, в шийката и междинната част на опашката. На фиг. 17 е демонстрирана локализацията на tACE в групата на

Олигозооспермия - нетретирани сперматозоиди, на която се вижда, че ензимът е по-слабо представен в главичния сегмент, в сравнение с групата на Нормозооспермия - нетретирани. В шийката и междинната част на опашката, както и в цитоплазмената капчица tACE е с равномерна експресия. В една част от групата с Астенозооспермия - нетретирани сперматозоиди на фиг. 18, tACE се изразява точковидно в акрозомната и екваториалната област, т. е. неговата изява е локализирана в отделни участъци върху плазмалемата на акрозомата. В шийката и междинната част на опашката отново се наблюдава сегментираното в изявата му. При Тератозооспермия - нетретирани сперматозоиди на фиг. 19, tACE се изразява основно в шийката, междинната част на опашката и в цитоплазмената капчица, като единични сперматозоиди имат и локализирана изява на ензима в акрозомната и екваториалната област.

Таблица 11. Площ на изява на tACE - глава ( $\mu\text{m}^2$ )

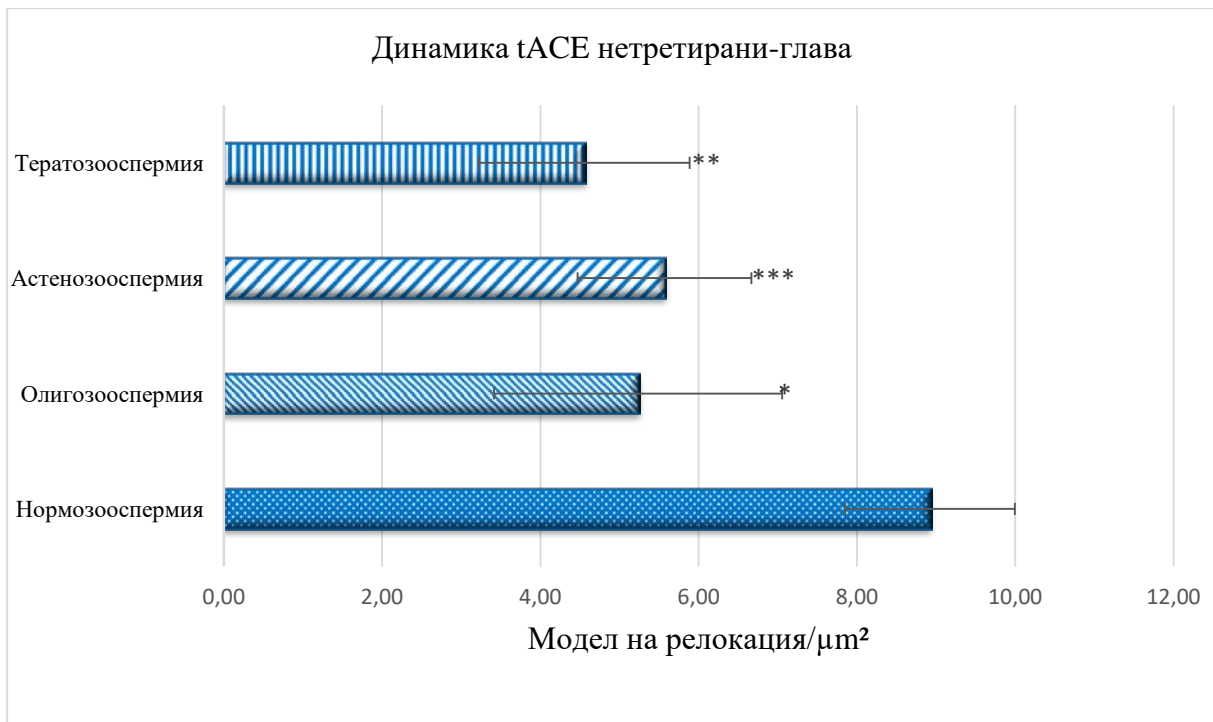
Диагноза	Брой	Нетретирани глава / $\mu\text{m}^2$	SD	Капацитирани глава / $\mu\text{m}^2$	SD	AR глава / $\mu\text{m}^2$	SD
Н	31	8,92	1,07	15,37	1,77	1,58	0,39
А	31	5,57	1,10	5,71	0,85	2,17	0,78
О	25	5,23	1,82	4,55	1,35	1,96	0,44
Т	24	4,56	1,33	4,40	1,10	2,38	0,71

Таблица 12. Площ на експресия на tACE - междинна част, опашка ( $\mu\text{m}^2$ )

Диагноза	Брой	Нетретирани опашка / $\mu\text{m}^2$	SD	Капацитирани опашка/ $\mu\text{m}^2$	SD	AR опашка / $\mu\text{m}^2$	SD
Нормозооспермия	31	8,97	0,90	14,50	1,95	3,75	0,46
Астенозооспермия	31	3,09	0,56	4,54	0,84	4,05	0,80
Олигозооспермия	25	2,56	0,23	3,96	0,59	2,64	0,40
Тератозооспермия	24	3,29	0,47	5,90	1,61	4,76	1,04

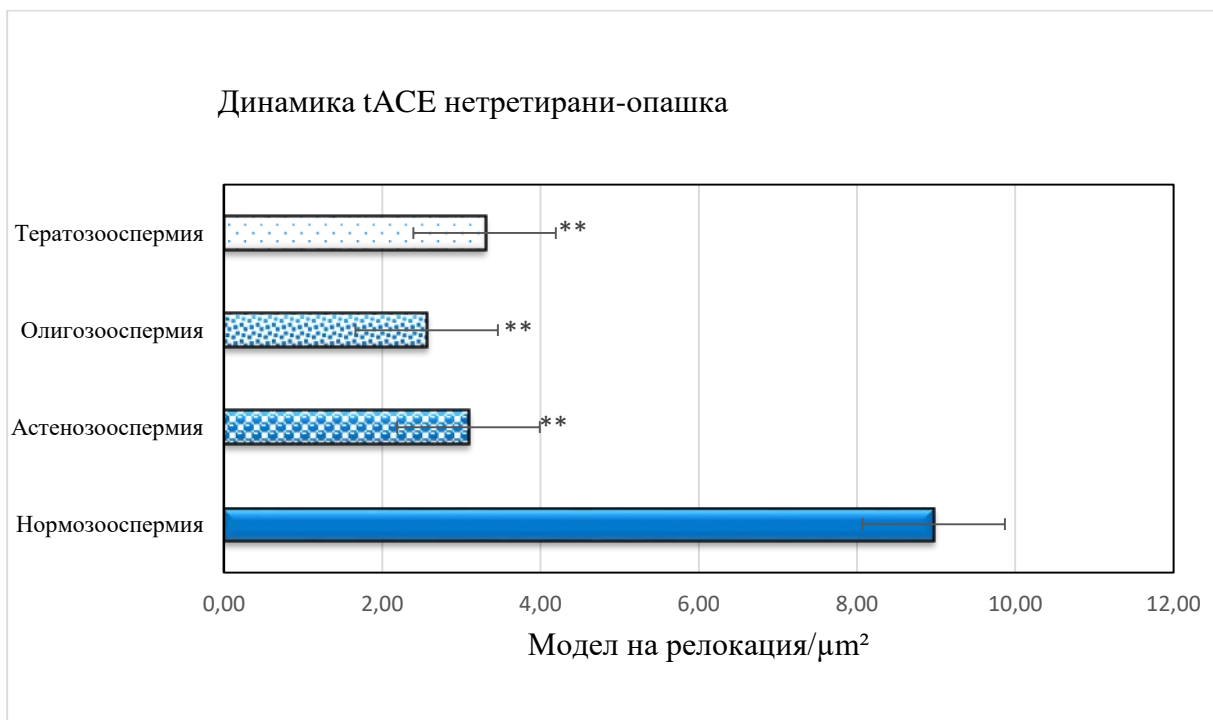
На Таблица 11. и Таблица 12. е представена имунофлуоресцентната експресия на tACE представена като средна стойност от измерените площи за всяка група и стандартно отклонение.





Фигура 20. Експресия на tACE нетретируни - глава

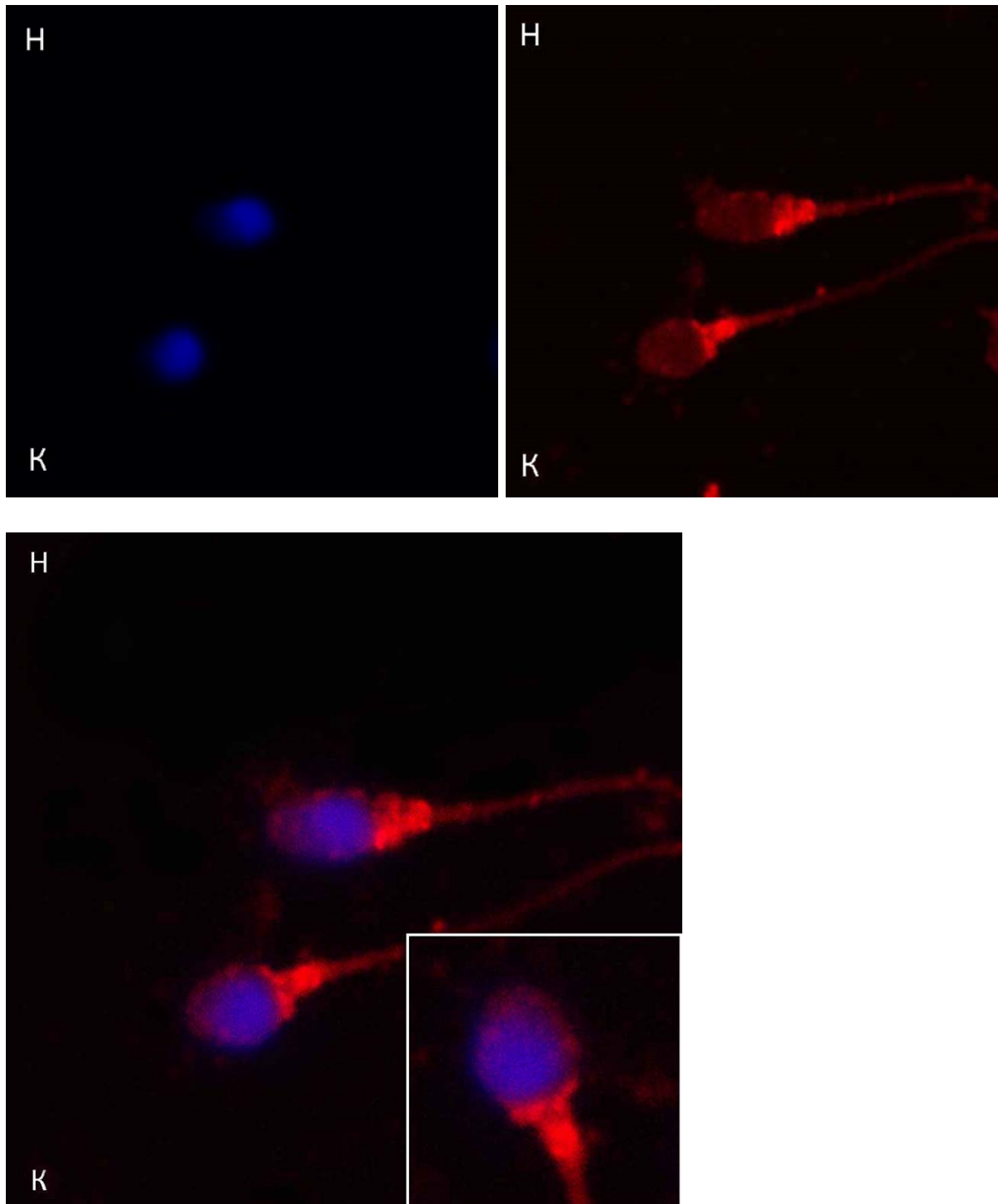
Статистически анализ на площта на изява на tACE в нетретируни сперматозоиди-глава; стандартно отклонение. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



Фигура 21. Експресия на tACE нетретируни - опашка

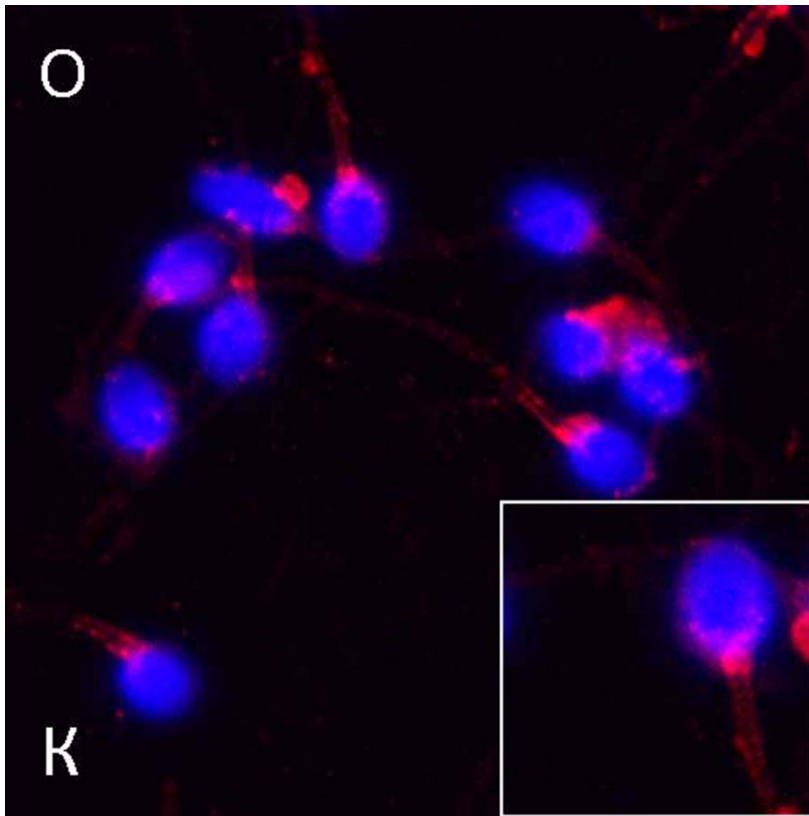
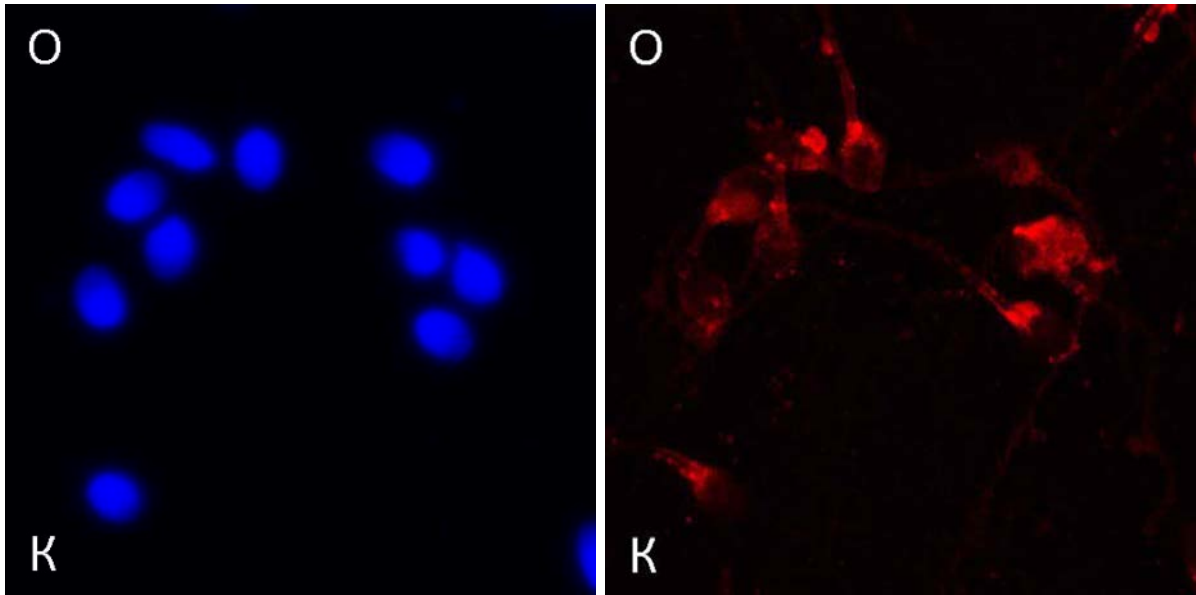
Статистически анализ на площта на изява на tACE в нетретируни сперматозоиди-опашка; стандартно отклонение. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.2. Имунофлуоресцентна визуализация на tACE в капацитирани сперматозоиди



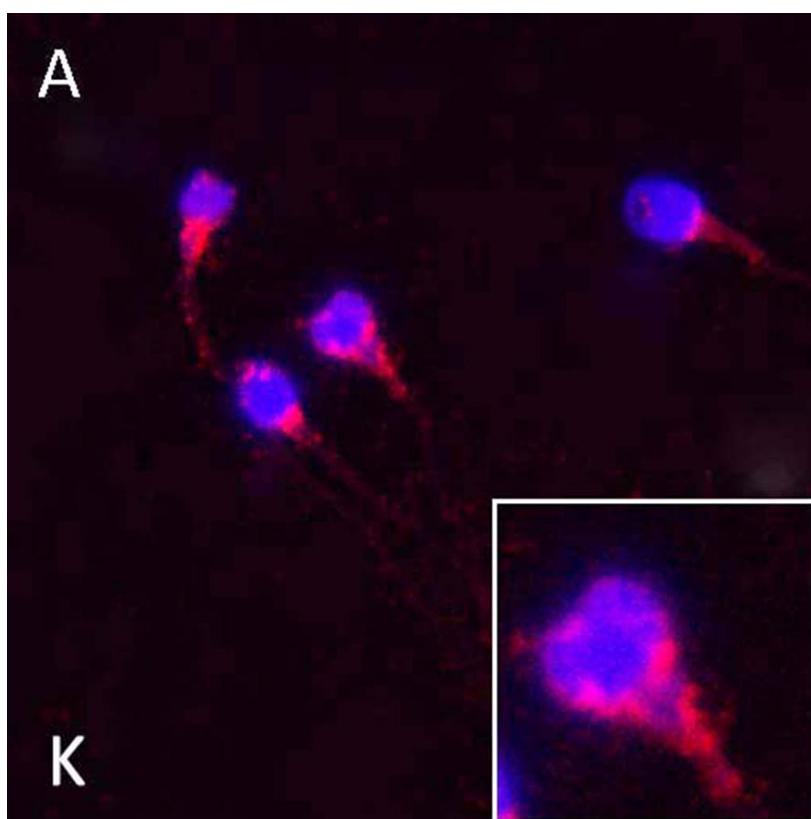
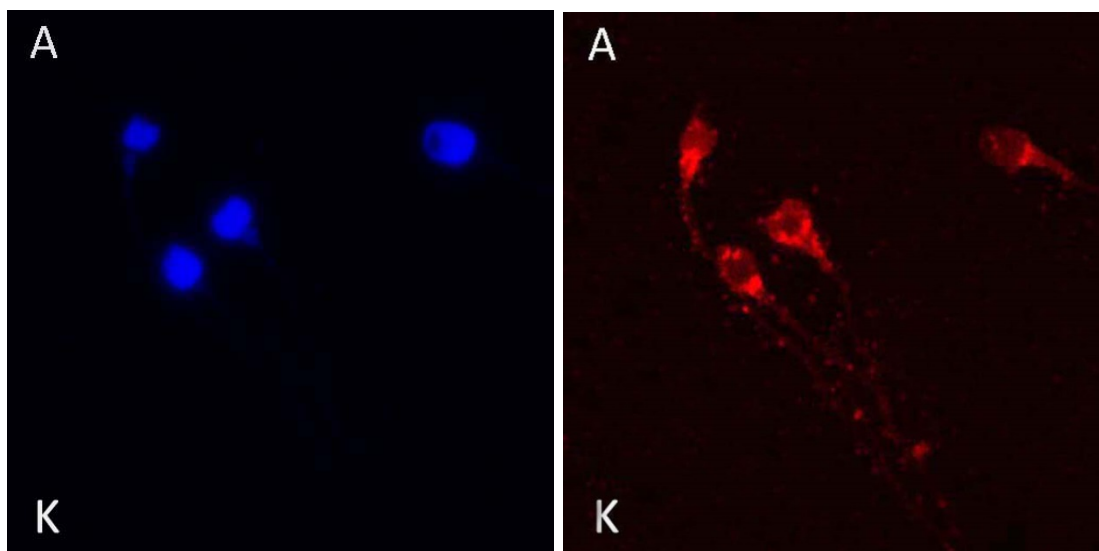
Фигура 22. Нормозооспермия - капацитирани сперматозоиди

Н - Нормозооспермия; К - капацитирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5  $\mu$ m.



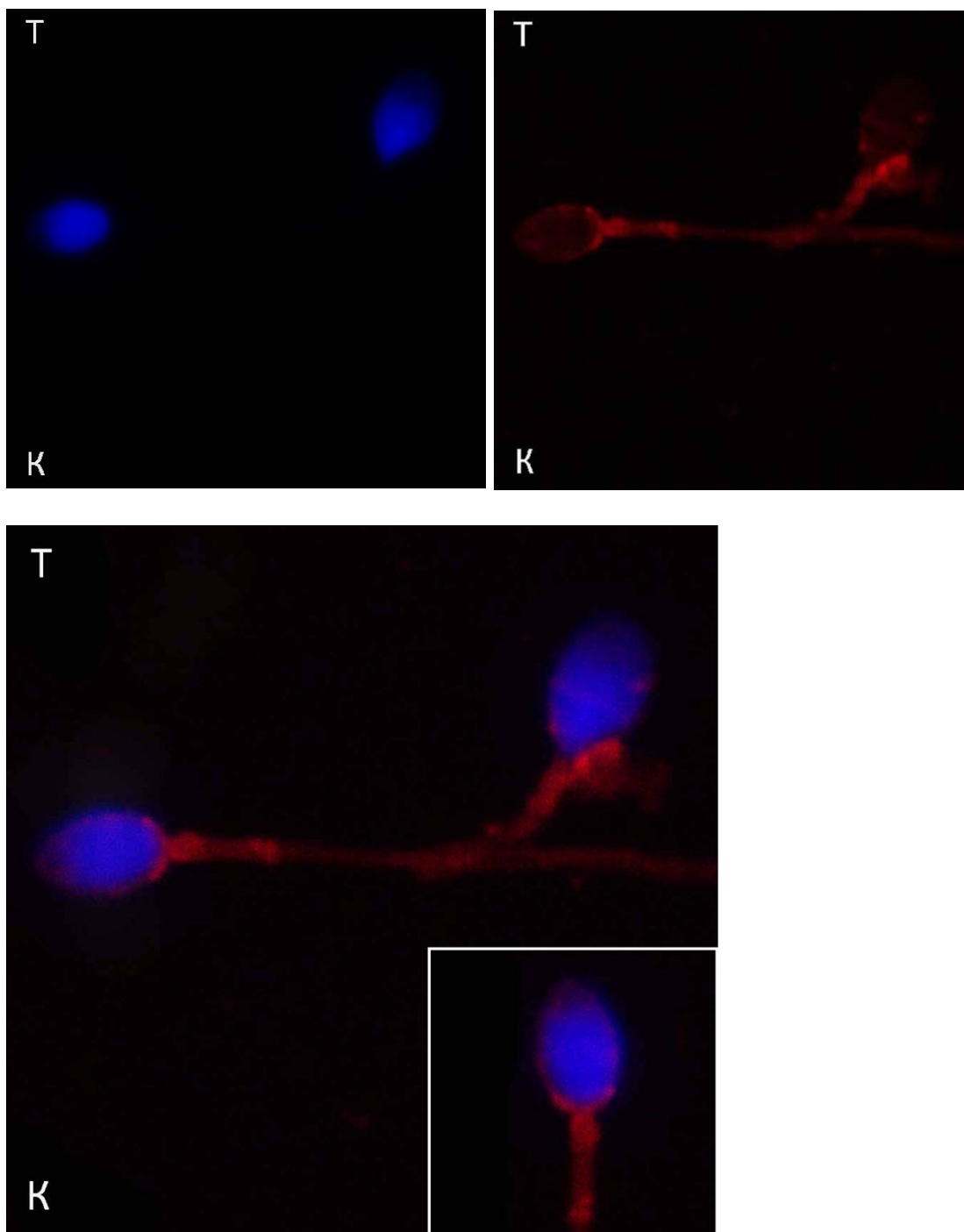
Фигура 23. Олигозооспермия - капацитирани

О - Олигозооспермия; К - капацитирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5 μm.



Фигура 24. Астенозооспермия - капацитирани сперматозоиди

А - Астенозооспермия; К - капацитирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5 μm.

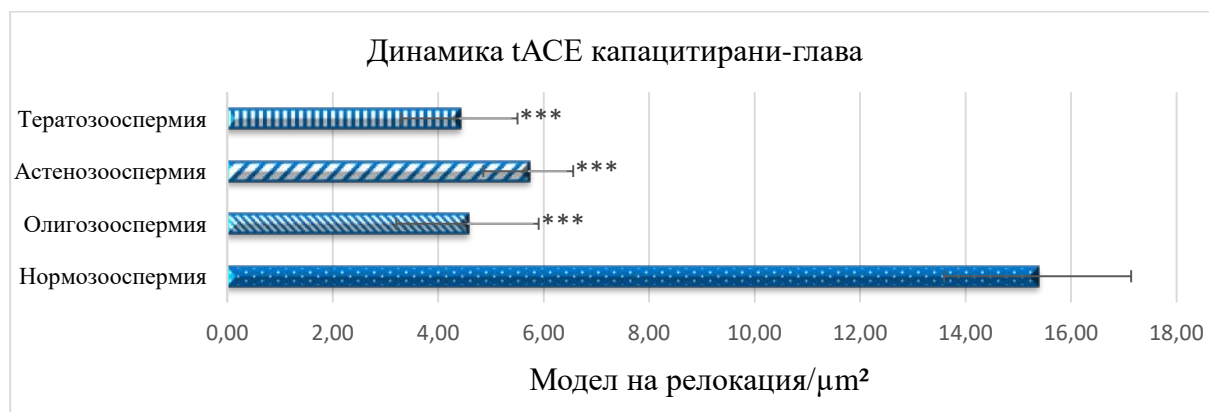


Фигура 25. Тератозооспермия - капацитирани сперматозоиди

Т - Тератозооспермия; К - капацитирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв.- анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5 μm.

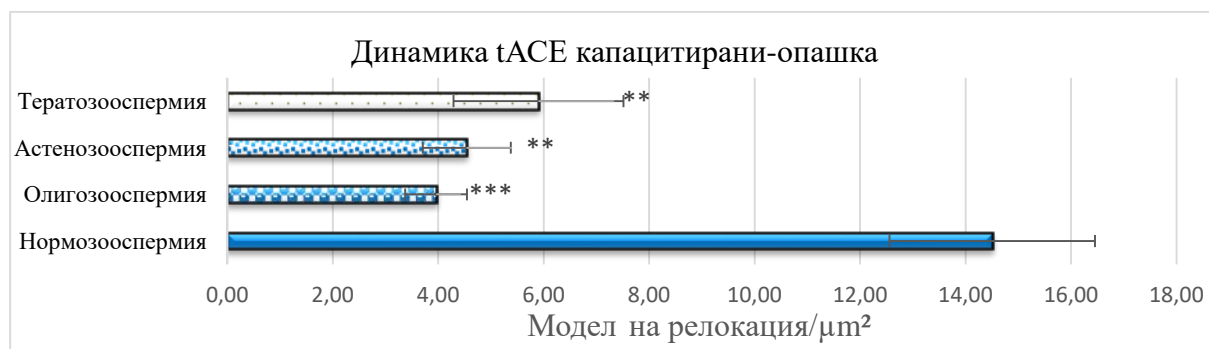
В групата на Нормозооспермия - капацитирани сперматозоиди (фиг. 22) установихме, че tACE се експресираща в по-обширна площ като това е особено добре изразено в акрозомата, шийката и междинната част на опашката, в сравнение с нетретираните сперматозоиди. На фиг. 23 е демонстрирана експресията на tACE в групата на Олигозооспермия - капацитирани сперматозоиди, която се визуализира равномерно (на места с точкова локализация), но със сравнително по-

слабо представяне на ензима върху акрозомния регион, шийката и междинната част на опашката, в сравнение с нормозооспермията. При Астенозооспермия-капацитирани сперматозоиди на фиг. 24 се наблюдава, че въпреки точковидната експресия се отчита увеличение в площта на изява на ензима, както в акрозомната, постакрозомната област, така и в екваториалния сегмент, шийката и междинната област на опашката в сперматозоидите от тази група. В групата на тератозооспермия - капацитирани сперматозоиди tACE е слабо представен в отделни участъци върху акрозомната мембрана, в шийката и междинната част на опашката също се наблюдава сегментираност в изявата му (фиг. 25).



Фигура 26. tACE в капацитирани сперматозоиди - глава

Статистическо сравнение на площта на изява на tACE в капацитирани сперматозоиди-глава; стандартно отклонение. \*\*\*  $p < 0,001$ .



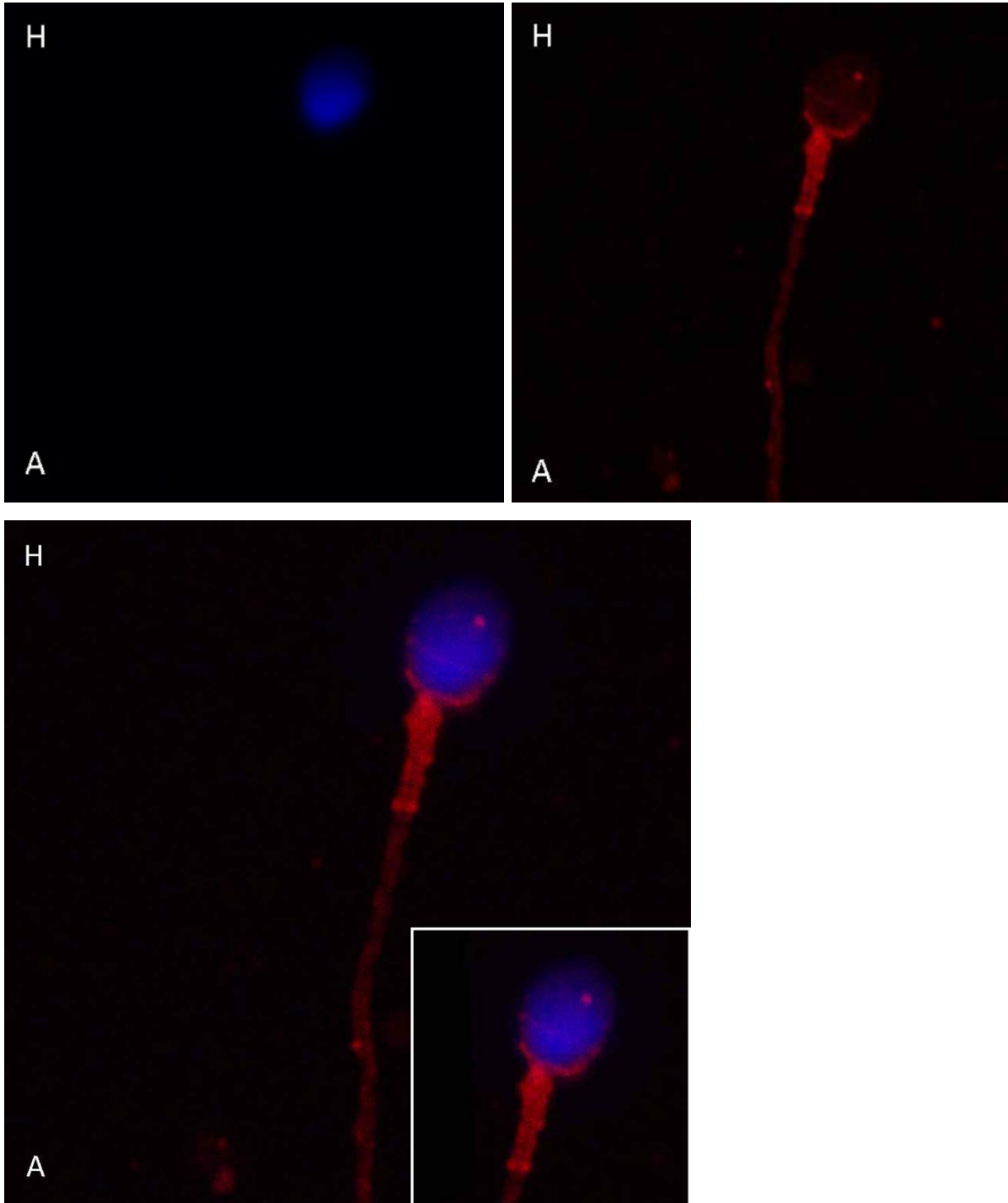
Фигура 27. tACE в капацитирани сперматозоиди - опашка

Статистическо сравнение на площта на изява на tACE в капацитирани сперматозоиди-опашка; стандартни отклонение. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Фиг. 26 и фиг.27 отразяват статистическите данни от проследяването на промяната в площта на експресия на tACE в капацитирани сперматозоиди в четирите групи. От получените резултати след имунофлуоресцентното tACE маркиране на клетъчна мембрана на сперматозоид глава установихме статистическа разлика спрямо контролната група ( $p=0,001$ ). Статистическа разлика отчитаме и при сравнението в междинната част на опашката ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Всички експериментални данни (средна стойност и стандартно отклонение) са представени в табл. 11 и табл. 12.

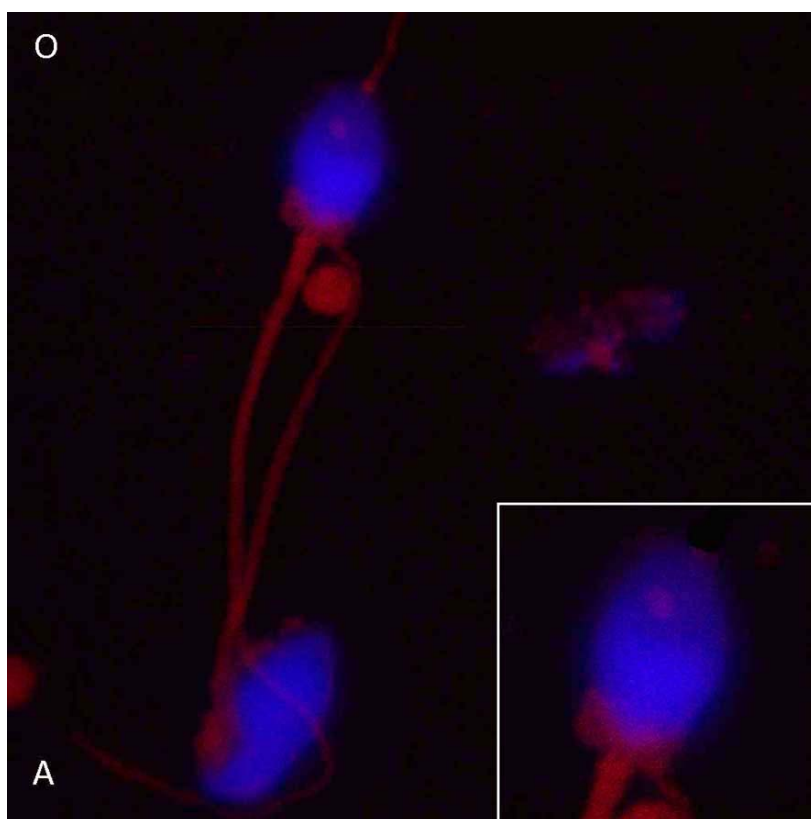
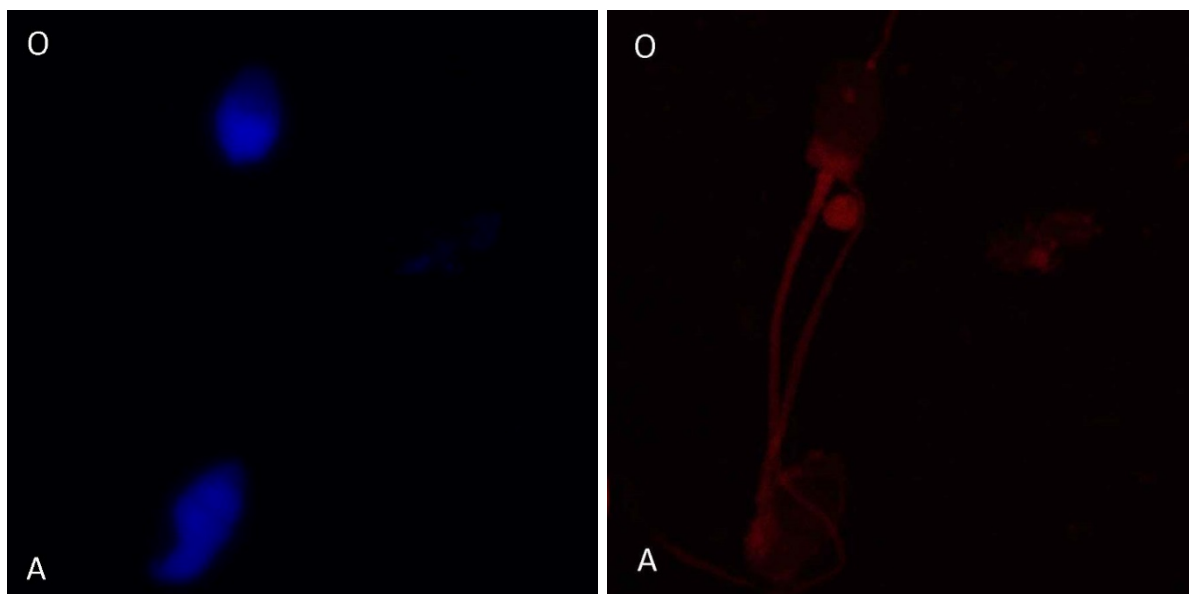
#### 4.3. Имунофлуоресцентна визуализация на tACE в акрозомно реагирани сперматозоиди

На фиг. 28 - 31 са представени резултатите от индиректната имунофлуоресценция на акрозомно реагирани сперматозоиди, които се получават след като към капацитираните сперматозоиди добавим 10 $\mu$ l Ca<sup>2+</sup> йонофор за 1 час на 37°C.



Фигура 28. Нормозооспермия - акрозомно реагирани

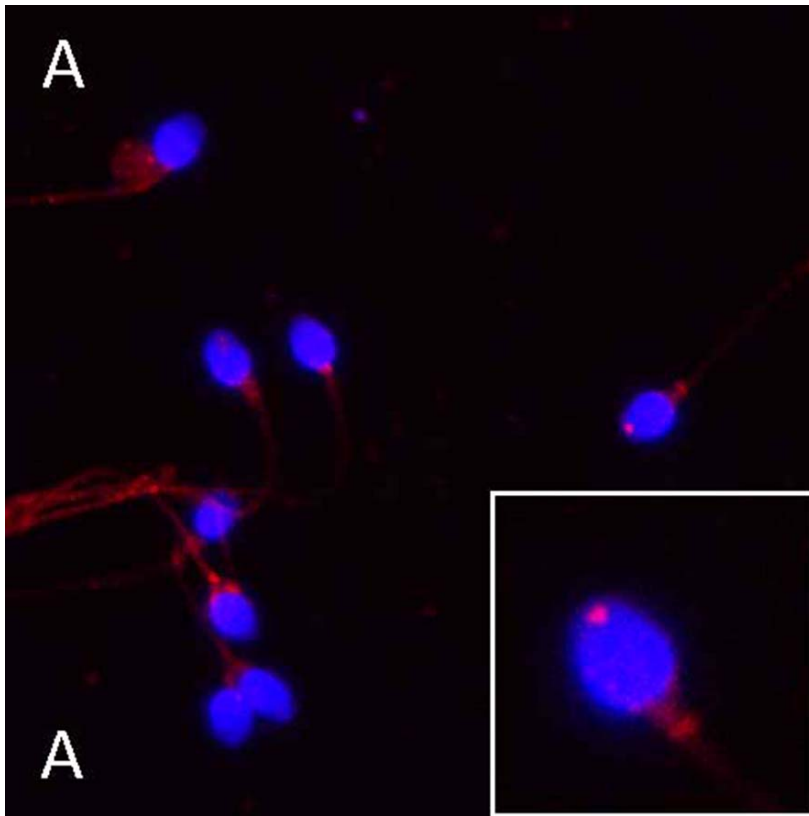
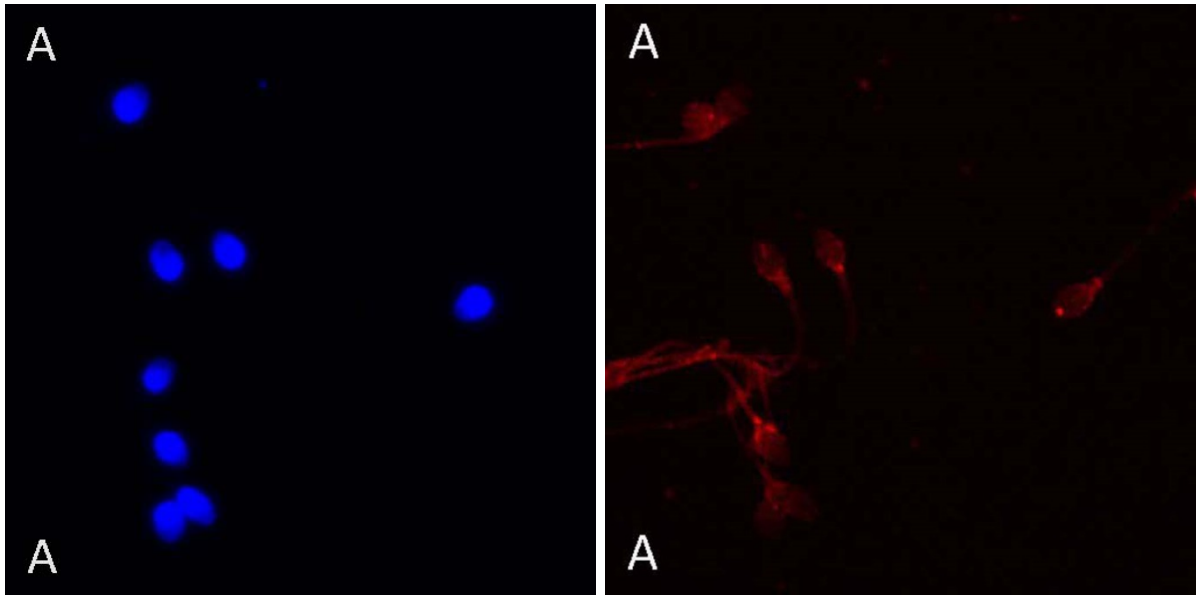
H - Нормозооспермия; A - акрозомно реагирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.  $\times 600$ ; Bar = 5  $\mu$ m.



Фигура 29. Олигозооспермия - акрозомно реагирани

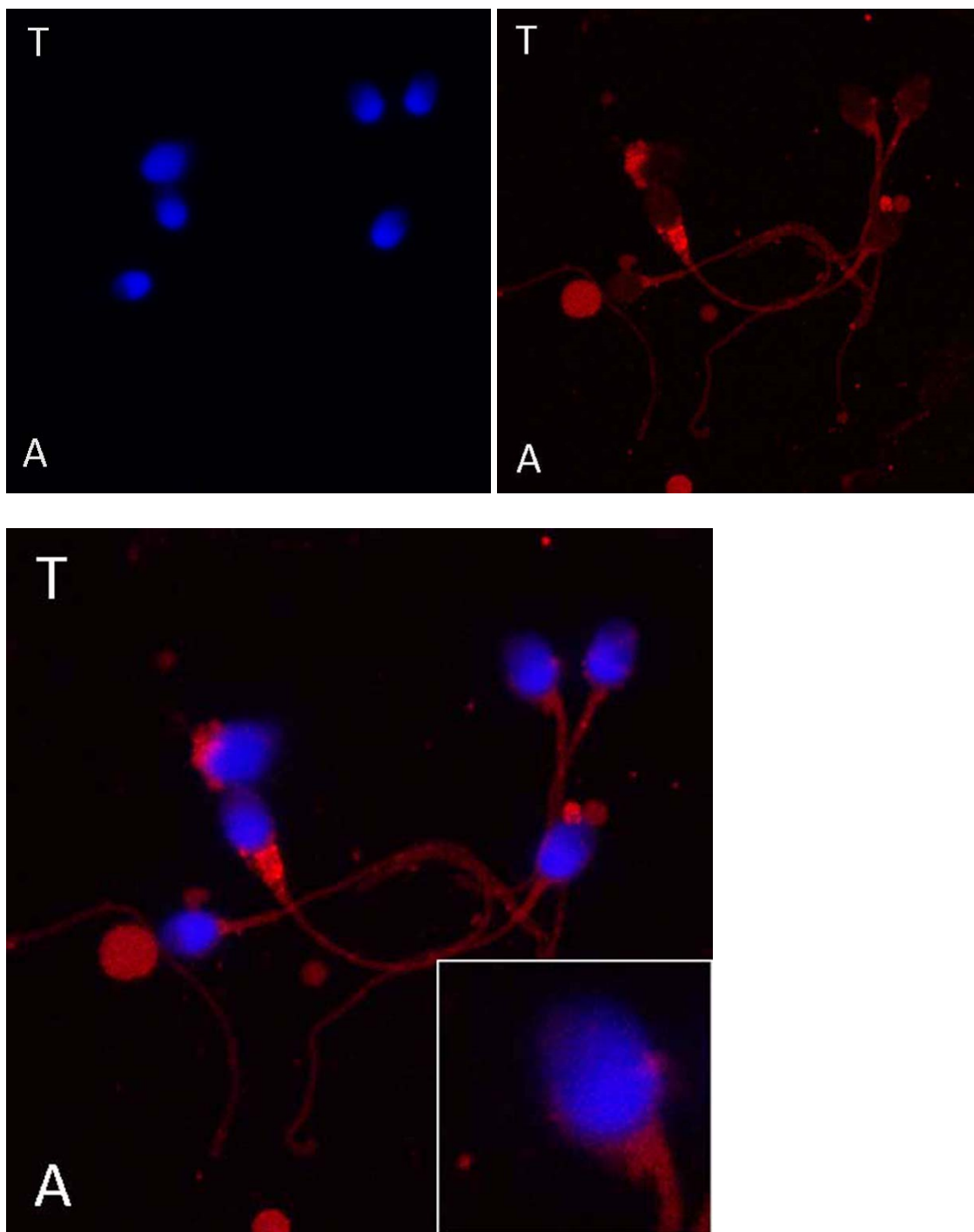
О - Олигозооспермия; А - акрозомно реагирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5 μm.





Фигура 30. Астенозооспермия - акрозомно реагирани

A - Астенозооспермия; A - акрозомно реагирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5  $\mu$ m.

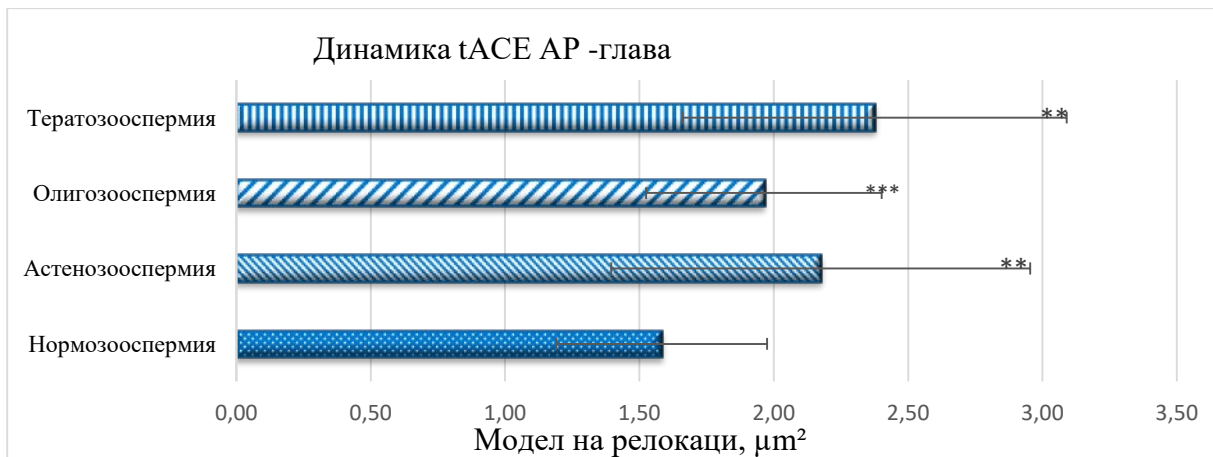


Фигура 31. Тератозооспермия - акрозонмо реагирани

T - Тератозооспермия; A - акрозонмо реагирани; синьо оцв. - DAPI; червено оцв. - анти-tACE; ориг. увел.×600; Bar = 5 μm.

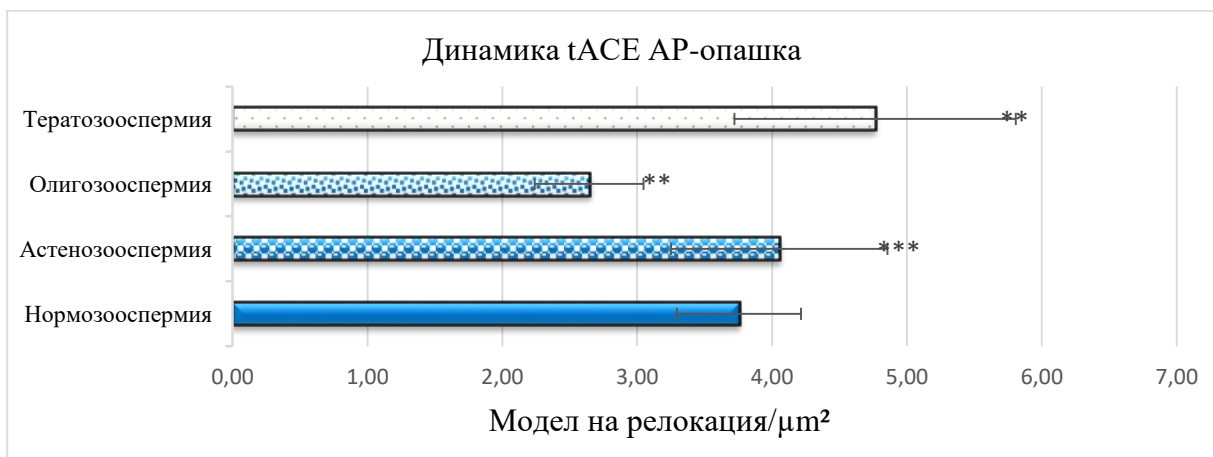
След протичане на акрозонната реакция в групата на нормозооспермия - акрозонмо реагирани сперматозоиди установяваме, че tACE не се открива в акрозонния район, но продължава да се изразява в екваториалната област на главичката, шийката и междинната част на опашката, като е по-слабо представен в сравнение с капцитираните сперматозоиди (фиг. 28). В групата на

тератозооспермия и астенозооспермия - акрозомно реагирали (фиг. 31 и фиг. 30) се наблюдава отделянето на ензима от акрозомната мембрана и включването му в акрозомни везикули получени след протичането на процеса. Ензимът продължава да се експресира в екваториалната област, шийката и междинната част на опашката на сперматозоида. В групата на олигозооспермията локализацията на tACE е предимно изразена в екваториалната област, шийката и междинната част. При Тератозооспермия - акрозомно реагирали сперматозоиди изявата на tACE е представен сегментирано в екваториалната и опашната област, но експресията е много по-ясно и добре изразена в сравнение със същите капациитирани групи (фиг. 29 и фиг. 31).



Фигура 32. tACE акрозомно реагирали сперматозоиди - глава

Статистическо сравнение на площта на изява на tACE в акрозомно реагирали сперматозоиди - глава; стандартно отклонение. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

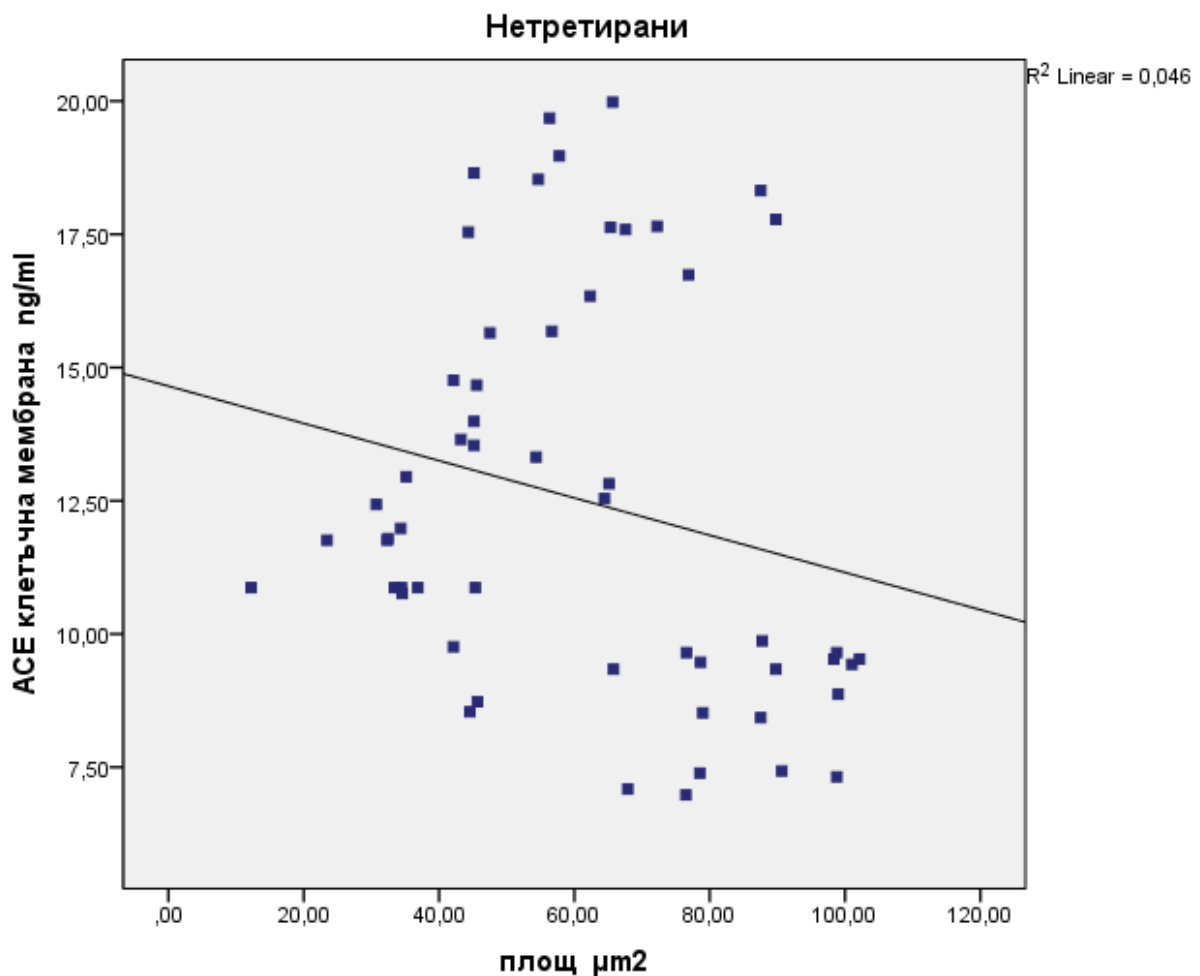


Фигура 33. tACE акрозомно реагирали сперматозоиди - опашка

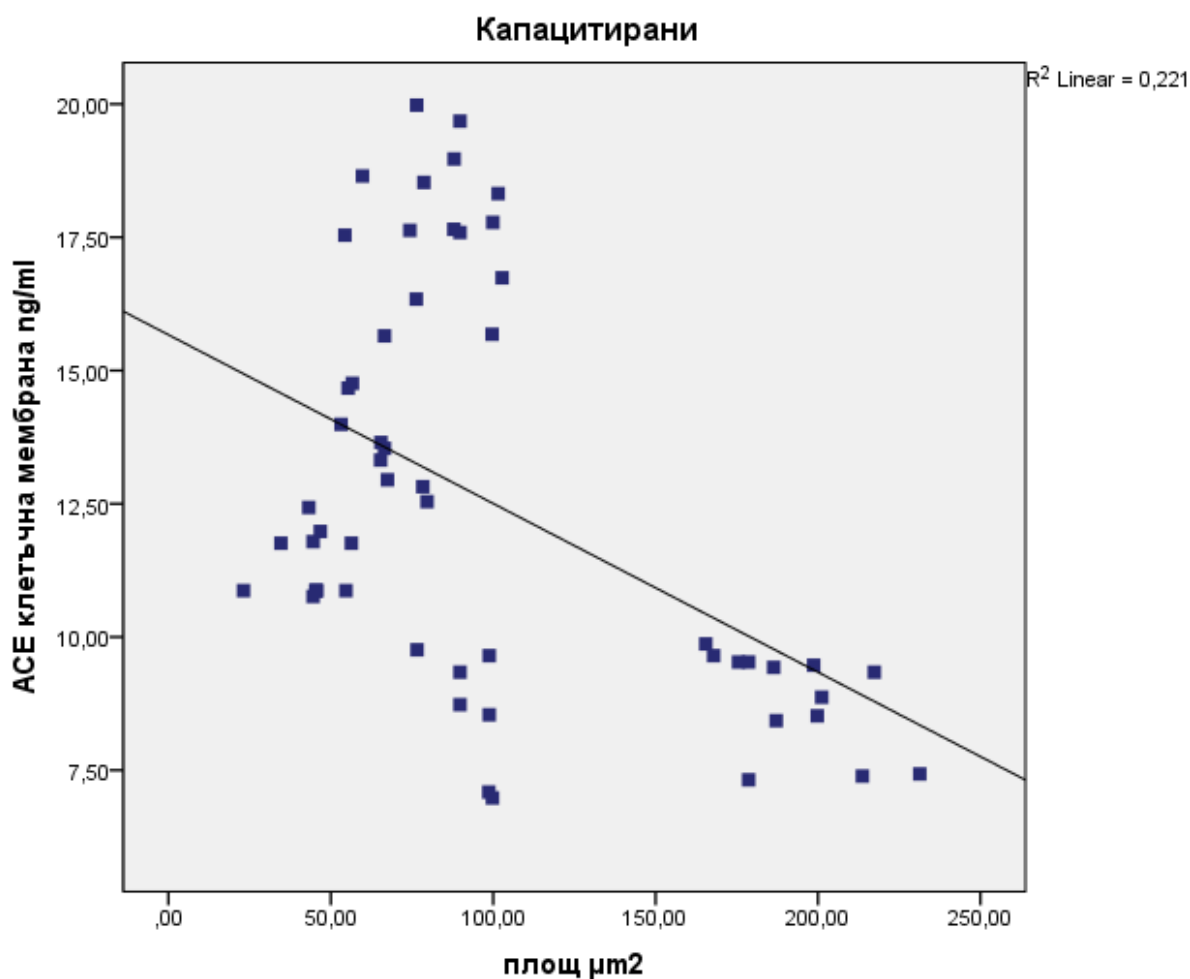
Статистическо сравнение на площта на изява на tACE в акрозомно реагирали сперматозоиди - опашка; стандартно отклонение. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Корелационна връзка между динамичното представяне на tACE и спермални показатели

Получените от нас резултати демонстрират сигнификантна отрицателна, връзка между концентрацията на tACE клетъчна мембрана на сперматозоид с площта на релокация на ензима при нетретиранни ( $p=0,009$ ) и капацитирани сперматозоиди глава ( $p=0,001$ ). Отрицателна, но не значима е връзката в акрозомно реагираните сперматозоиди глава ( $p=0,158$ ). Негативна корелация установяваме и при нетретиранни ( $p=0,041$ ), капацитирани ( $p=0,009$ ) и акрозомно реагиранни ( $p=0,014$ ) сперматозоиди- междинната част на опашката.



Фигура 34. Графично представяне на tACE концентрация и релокация в нетретиранни сперматозоиди



Фигура 35. Графично представяне на връзката между tACE концентрация и релокация в плазмената мембрана в капацитирани сперматозоиди.

Таблица 13. Взаимно влияние на tACE концентрация и релокация

Стойности	Нетретириани глава	Капацитирани глава	AP глава	Нетретириани опашка	Капацитирани опашка	AP опашка
tACE ng/ml	r=-0,313	r=-0,431	r=-0,172	r=-0,247	r=-0,308	r=-0,292
	p=0,009	p=0,001	p=0,158	p=0,041	p=0,009	p=0,014
	**	**		*	**	*

На фиг. 34, фиг. 35 и табл. 13. са отразени корелационите коефициенти на Spearman, tACE концентрация плазмена мембрана и релокацията на tACE върху спермалната мембрана. \* P <0.05 и \*\* P <0.001.

## V. ИЗВОДИ

❖ Резултатите от морфологичните находки в спермата при мъже с фертилни нарушения - астенозооспермия, олигозооспермия и тератозооспермия разкриват намалена оплодителна способност, която е изразена в различна степен в отделните групи. Определянето на основните спермални показатели – подвижност, морфология и концентрация имат важна прогностична стойност, защото само сперматозоиди с добри характеристики имат способност да осъществят оплождане.

❖ Измерването на sACE в семинална плазма чрез ELISA метод показва, че нивата на ензима са редуцирани при групите с инфертилни пациенти с тератозооспермия и астенозооспермия, докато при групата с олигозооспермия се отчитат по-високи стойности в сравнение с контролната. Ниските нива на sACE в семиналната плазма при инфертилни мъже не корелира със спермалните показатели подвижност и морфология на сперматозоидите, а само с тяхната концентрация.

❖ При определянето на нивата на tACE на клетъчната мембрана на сперматозоида се отчетоха сигнификантно по-високи нива на ензима в групите на инфертилни пациенти в сравнение с контролите. Установихме отрицателна корелация между нивата на tACE на клетъчната мембрана на сперматозоида и спермалните показатели подвижност и морфология на сперматозоидите.

❖ Статистическият анализ разкрива отрицателна връзка между релокацията на tACE експресията в сперматозоиди от пациенти с нарушения във фертилността и концентрацията на ензима на клетъчната мембрана на сперматозоидите.

❖ От имунофлуоресцентния анализ и статистическа обработка на данните от трите подгрупи на включения в проучването материал - нетретирани, капациитирани и акрозомно реагирани сперматозоиди установихме специфични модели на експресия на tACE.

❖ При подгрупите на капациитирани сперматозоиди наблюдаваните модели на tACE експресия се запазват, но се отчита увеличение на площта на изява на ензима и характерна релокация в посока на екваториалния сегмент на сперматозоида. При подгрупите акрозомно реагирани сперматозоиди tACE се включва в образувалите се в резултат на AP везикули.

❖ На базата на рутинния морфологичен анализ и морфометричното изследване на биопсичен материал от пациенти с нарушения във фертилността установените находки бяха категоризирани в четири групи в зависимост от промените в ЛП на семиниферните тубули. Формирането на горепосочените групи е основно на базата на морфологичната характеристика на ЛП и е независимо от клиничната история на инфертилността.

❖ Във формираните групи биопсичен материал се установяват три специфични модели на структурни промени на ЛП изразяващи се в нейното задебеляване, увеличен обем ЕЦМ и делокализация на миофибробластите. Морфологичните изменения в ЛП кореспондират на нарастващи по тежест нарушения в сперматогенезата.

❖ Във всички групи биопсичен материал миофибробластите в ЛП на семиниферните тубули експресират  $\alpha$ -гладкомускулен актин - маркер за контрактилната им способност, т.е. не се наблюдава дедиференциация на тази клетъчна популация. Интензитетът на експресия на  $\alpha$ -гладкомускулен актин е независим от степента на нарушения на сперматогенезата.

❖ За прецизиране на нарушенията в сперматогенезата, в контекста на доказаната роля на tACE в процеса на спермиогенеза, ние проследихме имунохистомичний модел на експресия на ензима в групите биопсичен материал. Установихме етапната специфичност в локализацията на tACE по време на сперматогенния цикъл, което характеризира ензима като добър маркер за оценка на стадията на диференциация на сперматидите.

❖ Направеното сравнение чрез корелационен анализ между дебелината на ЛП и процента tACE позитивни клетки в семиниферни каналчета от биопсичния материал показва сигнификантна отрицателна връзка между двата показателя. Нарастване на дебелината на ЛП води до нарушение в сперматогенезата и експресията на tACE респективно. В своята съвкупност, тези данни характеризират tACE като подходящ маркер за оценка на степента на диференциация на семенния епител.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфертилитетът при мъжете представлява сериозен и актуален проблем. Понастоящем това състояние се установява все по-често, като причините са многостранни. От дълго време се търсят подходящи и по-специфични методи за неговото възможно ранно диагностициране. В настоящия труд ние си поставихме задачата да установим сигурен и специфичен маркер, който да бъде използван като метод за ранната диагностика на мъжкото безплодие. Такъв маркер е ангиотензин-конвертирация ензим и по-специално неговата тестикуларна изоформа, специфична единствено за диференциращите се полови клетки. Резултатите от нашето проучване демонстрират, че tACE е по-обективен и специфичен маркер за мъжката инфертилност в сравнение със соматичната изоформа. Установените високи нива на tACE в клетъчната мембрана на мъже с инфертилитет се отразяват негативно на двигателната способност и структурата на сперматозоидите като това е по-силно изразено в случаите с тератозооспермия. Високото съдържание на tACE в мембраната на сперматозоидите най-вероятно блокира възможността за участието им в капацитацията и осъществяването на акрозомната реакция и с това на способността им за оплождане на яйцеклетките.

В своята цялост, получените данни насочват за ключовата роля на tACE в процесите на капацитацията, акрозомна реакция и хиперактивация на сперматозоидите, осигуряващи тяхната оплодителна способност, както и нормалното развитие на ембриона.



## **VII. ПРИНОСИ**

### ***Оригинални:***

1. Настоящата разработка е първото у нас системно проучване чрез рутинни и съвременни морфологични и имунологични методи на тестикуларния ангиотензин-конвертиращ ензим в материал от пациенти с нарушения в оплодителната способност в контекста на потенциалната му роля като биомаркер за фертилитет при мъжа.

2. Високите количества на тестикуларния ангиотензин-конвертиращ ензим в клетъчната мембрана на мъже с инфертилитет се отразяват негативно на двигателната способност и структурата на сперматозоидите. Това е по-силно изразено в случаите с тератозооспермия. При това, соматичната форма на ензима не води до подобни явления.

3. Високото съдържание на тестикуларния ангиотензин-конвертиращ ензим в мембраната на сперматозоидите най-вероятно блокира възможността за участието им в капацитацията и осъществяването на акрозомната реакция и с това на способността им за оплождане на яйцеклетките.

### ***Потвърдителни:***

4. Морфологичните изменения в стената на семиниферните тубули в биопсичен материал от пациенти с фертилни нарушения кореспондират на нарастващи по тежест нарушения в сперматогенезата и експресията на tACE респективно. В своята съвкупност, тези данни характеризират tACE като подходящ маркер за оценка на степента на диференциация на семенния епител.

5. Тестикуларният ангиотензин-конвертиращ ензим е по-обективен и специфичен маркер за мъжката инфертилност в сравнение със соматичната изоформа на ензима.

6. Получените данни насочват за ключовата роля на tACE в процесите на капацитацията, акрозомна реакция и хиперактивация на сперматозоидите, осигуряващи тяхната оплодителна способност, както и нормалното развитие на ембриона.

## VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

**Pencheva M.**, Darmonska P., Aleksandrov A. Sperm analysis of infertility men. Scientific works of the Union of scientists Plovdiv, series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, 2015, 17: 60-63.

**Pencheva M.**, Koeva Y., Atanassova N. Protective role of germinal isoform of angiotensin I converting enzyme (gACE) to sperm and fertilization. Acta Morphologica et Anthropologica, 2015, 22:167-175.

**Pencheva M.**, Koeva Y., Tosheva A., Dimitrov I., Atanassova N. ACE amount and its impact on man fertility. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences 2018; *In press*

## IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

**Pencheva M.**, Darmonska P., Aleksandrov A. Milkov D. Sperm analysis of men with a history of infertility. Folia Med. 2015, 57(1):52.

**Pencheva M.**, Darmonska P., Aleksandrov A., Koeva Y., Shterev A. Effects male age on sperm morphology and fertility. Folia Med. 2015, 57(2):39.

**Pencheva M.**, Y. Koeva, A. Tosheva, I. Dechev, N. Atanassova, G.Nenkova, R. Susurkova. Abnormal sperm morphology and the male fertility. Scripta Sc.Med.2016, 48(2):48.

**Pencheva M.**, Y. Koeva, A. Tosheva, R. Stognova, D. Ankova Lifestyle and environmental factors affecting fertility in men. Scripta Sc.Med.2017, 49(2):28.

**Pencheva M.**, Koeva Y., Tosheva A., Dimitrov I, Ankova, D. Measurement of ACE activity and its impact over men sterility. Scripta Sc.Med.2017, 49(2):29.

Milchev H., **M. Pencheva**, E. Suvandjieva, Y. Koeva. Morfometric change in testis of azoospermic man. Science and youth. 2018,135.

## X. SUMMARY

Sterility affects about 13-15% of couples in the world, with almost half of the cause due to congenital or acquired etiology. Identifying the causes of infertility is a difficult task and requires an in-depth and multifaceted analysis of all possible factors. In a large number of cases, infertility remains with unexplained etiology. Numerous enzymes involved in different stages of sperm differentiation and realization have been isolated in this connection.

One of the enzymes involved in all stages of sperm delivery is Angiotensin I Converting Enzyme (ACE). ACE is a type 1 integral membrane glycoprotein, part of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). In human, ACE is isolated in two isoforms encoded by one gene - a somatic ACE (sACE) and testicular ACE (tACE). The testicular isoform of the enzyme is specific only to differentiating (haploid) germ cells.

The aim of the study was to trace the expression of the enzyme in untreated, capacitated and acrosome reacted spermatozoa in the four diagnosed groups, as well as the ability to determine spermatogenic activity in patients with azoospermia. To achieve the goal, we quantified the somatic isoform in the plasma and the testicular isoform in the cell membrane of spermatozoa in the cell lysate in the four groups. We used a correlation analysis to determine the degree of impact of the two isoforms on sperm counts, finding that only tACE had an effect on morphology and sperm motility.

Used indirect immunofluorescence, we have found consistent expression in untreated sperm, increased expression and relocation to the equatorial region in sperm capacitation, lack of expression in the acrosome region, and continued visualization in the equatorial and intermediate regions in acrosome reacted spermatozoa. The expression described predominates in the normozoospermia group, and for the infertile groups we found point representation and segmentation in the expression of the enzyme.

We performed an immunohistochemical study on paraffin slices of biopsy material of human testis from infertile men with azoospermia. For objectively presenting results, we follow the change in the thickness of the lamina propria, regardless of the reasons that caused it. We used three methods of visualization of lamina propria in biopsies (staining hematoxylin-eosin, azan and immunoreactivity for  $\alpha$ -SMA), and we identified three different types of thickened lamina propria corresponding to the increasing pathology. We used the step-specific localization of tACE during the spermatogenic cycle as a marker to trace the spermatogenesis process and the individual stages of spermatocyte differentiation. We correlated the degree of thickening of lamina propria with the presence and stage in spermatogenesis by immunohistochemical expression for tACE in round and prolonged spermatozoa, taking into account the high level of significance between the two indicators.

The results obtained and statistical measurements showed that the expression of tACE on the surface of the ejaculated sperm can be an important prognostic marker for sperm fertilization ability and for the development of embryos. Our studies have shown that increased or decreased expression of tACE can be used as a marker for idiopathic infertility in human.

*Изказвам своята искрена благодарност на ръководителя на катедрата проф. д-р Стефан Сивков, дм за доверието, подкрепата и предоставената ми възможност да работя в една трудна, но много интересна сфера.*

*Изразявам огромната си благодарност на моя научен ръководител проф. д-р Ивета Коева, дм и научен консултант проф. Нина Атанасова, дбн за възможността да работим съвместно, за грижата и подкрепата, за оказаната ми неоценима помощ в работата над моята дисертация.*

*Благодаря на доц. Павел Рашев за ценните идеи, за направените препоръки относно дисертацията, за оказаната помощ и съвети при обработката на данните.*

*Благодаря на колектива на СБАХЛ „Д-р Малино“, МДЛ „СИНЕВО“, Клиника по урология УМБАЛ „Св. Георги“ за съвместната работа и съдействието при набиране и включване на пациенти в изследването.*

*Благодаря на Илиан Димитров от катедра по химия и биохимия за съдействието и помощта при извършването на количествените изследвания.*

*Благодаря на целия колектив на катедра „Анатомия, хистология и ембриология“ за разбирателството, подкрепата и приятелството.*

*Благодаря на родителите ми и семейството ми, които проявиха търпение, вяра и обич.*

*Благодаря сърдечно на всички, които в една или друга степен ми помогнаха!*

*Мина Пенчева*