

**МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ” – ГР. БУРГАС
ФАКУЛТЕТ ПО ТЕХНИЧЕСКИ НАУКИ
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ**

ЗЛАТИНА РУМЕНОВА БЕЧЕВА

**Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски
анализ на соматични клетки и неутрофили в мляко**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „ДОКТОР” по
научна специалност: 02.11.11. Технология на
биологично активни вещества (вкл. ензими,
хормони, белтъци)

БУРГАС, 2018

**МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р АСЕН ЗЛАТАРОВ” – ГР. БУРГАС
ФАКУЛТЕТ ПО ТЕХНИЧЕСКИ НАУКИ
КАТЕДРА БИОТЕХНОЛОГИЯ**

ЗЛАТИНА РУМЕНОВА БЕЧЕВА

**Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски
анализ на соматични клетки и неутрофили в мляко**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „ДОКТОР” по
научна специалност: 02.11.11. Технология на
биологично активни вещества (вкл. ензими,
хормони, белтъци)

Научен ръководител:
Проф. д-тн Цонка Иванова Годжевъргова

БУРГАС, 2018

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет при катедра Биотехнология, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас, на заседание, състояло се на 27.10.2017г. и е насочен за разкриване на процедура за защита пред жури, определено със заповед на Ректора на Университет „Проф. д-р Асен Златаров”.

Дисертационния труд съдържа 157 страници, 11 таблици и 49 фигури. В библиографията са включени 192 заглавия.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала, ОК, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас.

Материалите за защитата са на разположение на интересуващите се в деловодството на Университет „Проф. д-р А. Златаров” – гр. Бургас

Автор: Златина Руменова Бечева

Заглавие: Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски метод за анализ на соматични клетки и неутрофили в мляко

Използвани съкращения

BETX – високоефективна течна хроматография

ЕДТА – етилендиаминтетраоцетна киселина

ОБСК – общ брой соматични клетки

СК – соматични клетки

EDC – 1-етил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид

ELISA – ензимносвързан имуносорбен анализ

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

IgG – имуноглобулин G

NHS – N-хидроксисукцинимид

PI – пропидиев йодид

PPE – свинска панкреатична еластаза

PVP – поливинилпиролidon

QD – квантови точки

RP-HPLC – високоефективна течна хроматография с обратна фаза

Въведение

Маститът при кравите е причинен от инфекция на млечната жлеза. Млечната секреция намалява и това причинява големи икономически загуби. Възпалението протича в различни форми, но винаги се отразява на клетъчния състав (вида и броя на соматичните клетки) в млякото. При ранното установяване на мастит, могат да бъдат избегнати редица разходи, като време и финанси за лекуване на животното.

Като естествен имунен отговор, количеството на неутрофилите в млякото на кравата драстично се увеличава още от началото на възпалителния процес. Тези клетки осъществяват фагоцитоза чрез ензими, складиращи в цитоплазмени гранули. Ензимът еластаза е специфичен за неутрофилите и участва в обезвреждането на патогените чрез своята ендопептидазна активност. Следователно, и неутрофилите, и еластазата могат да служат като индикатори за диагностика на мастит в ранен стадий.

При наличие на инфекция във вимето на кравата общият брой соматични клетки (ОБСК) нараства и на този ефект са базирани съвременните тестове за мастит. При тях се определя общият брой клетки с неголяма точност, като крайният извод е маститно или немаститно мляко. Тази информация не е достатъчна за проследяване здравето на животното, както и навременното справяне с възникналата инфекция.

Редици автори проучват зависимостта на количеството неутрофили в млякото и ОБСК. Оказва се, че при клетки под 400 000 cell/mL (легалният праг на ОБСК в краве мляко в ЕС) също е възможно вимето да е инфектирано. Това най-често се наблюдава при хронични мастити, някои субклинични мастити и други скрити инфекции. Също така, при ОБСК над допустимия праг е възможно вимето да не е инфектирано, а увеличеното количество на соматични клетки да се дължи на късната лактация, стрес, сезона, както и породата на животното. Това показва, че е необходимо да се разработят допълнителни анализи, чрез които да се направи точна диагностика.

Разработени са редица методи за определяне на количеството соматични клетки в мляко. Публикациите за определяне на неутрофили и на тяхна база на соматични клетки в мляко са малко и се базират на поточна цитометрия. Не съществува разработен имунофлуоресцентен метод за определяне на соматични клетки на базата на анти тяло срещу неутрофилна еластаза. Последните два метода са ценни, тъй като може да

се направи диагностика на мастит в ранна фаза и да се предотвратят значителни икономически загуби. Използването на специфични антитела е най-сигурният метод до момента. Имунологичен тест, на база реакция антияло–антиген, съчетан с флуоресцентна детекция предлага добра основа за бъдещи анализи на количеството неутрофили и соматични клетки.

В дисертационния труд са разработени два имунофлуоресцентни микроскопски анализа за определяне на неутрофили и ОБСК в краве мляко на базата на антитела срещу неутрофили и неутрофилна еластаза. Антителата са конюгирани с флуоресцентни барила (FITC, QD 620 nm, QD 710 nm). Изследвани са свойствата на получените антитела и конюгати, тяхната специфичност, крос-реактивност и стабилност във времето. Получените анализи са приложени в реални млечни проби и са валидирани спрямо комерсиалния Giemsa-метод.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е разработване на имунофлуоресцентен микроскопски метод за определяне на общ брой соматични клетки в краве мляко и определяне на количеството на неутрофилните клетки от тях.

Поставени са следните задачи:

- 1) Изолиране, пречистване и доказване на неутрофили от краве мляко и кръв.
- 2) Изолиране, пречистване и доказване на еластаза от неутрофили.
- 3) Получаване, пречистване и доказване на антитела срещу неутрофили и еластаза.
- 4) Получаване, пречистване и доказване на флуоресцентни конюгати на получените антитела.
- 5) Изследване на активността, специфичността и стабилността на получените антитела и конюгати.
- 6) Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски анализ за определяне на целевите клетки чрез прилагане на конюгатите.
- 7) Изработване на двуцветен имунофлуоресцентен микроскопски анализ за едновременно определяне на общ брой соматични клетки и количество неутрофили в краве мляко.

II. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски анализ на базата на анти-неутрофил антитяло.

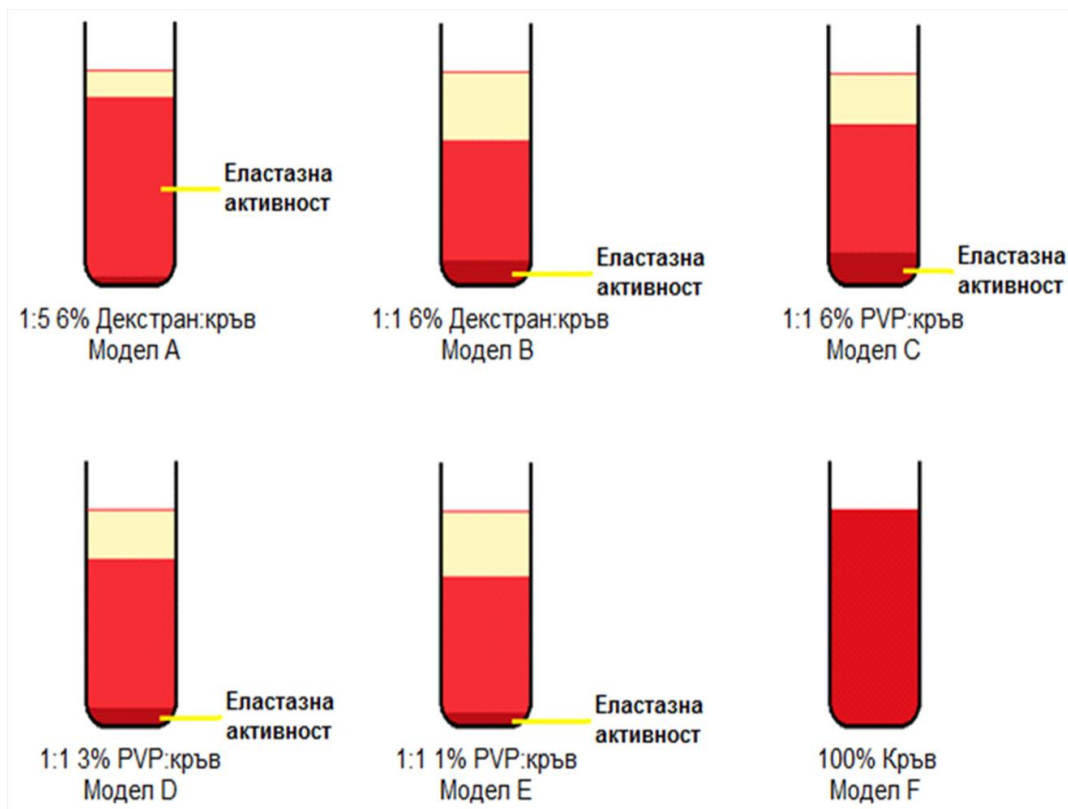
1.1. Изолиране и доказване на кръвни неутрофили от крава.

За изолиране на неутрофили от кръв на крава са използвани водоразтворими полимери. Необходимо е избраните полимери да бъдат нетоксични, разтворими във водни разтвори и да осигуряват запазването на клетките непроменени. Често използвани полимери за тази цел са поливинилпиролidon (PVP) и Декстран.

PVP се получава чрез полимеризация на N-винил-2-пиролidon. Той е биосъвместим полимер с добри адхезивни свойства. **Декстранът** е неутрален полизахарид, биосъвместим, широко използван в медицината за възстановяване на кръвния обем.

Изследват се пет модела за утаяване на кръвни клетки, с утаяващи агенти – PVP 29 kDa и Декстран 500, в определени концентрации, посочени на **Фигура 1**. След времето за инкубация моделите (A, B, C, D и E) имат по три образувани слоя. Горният слой е светложълт, средният – светлочервен, а долният – тъмночервен. Процентът на тези слоеве, спрямо общия обем, е различен. Например, светложълтият слой е: 12% в модел A, 28.87% в модел B, 21.51% в модел C, 22.51% в модел D, 28.14% - модел E. Слоевете при модели B и E са видими още на шестия час от инкубацията, но при другите модели е необходимо повече време за разделянето им (24 часа). За сравнение се използва кръв от крава без добавен утайтел. На **Фигура 1** са представени схематично моделите.

След еритроцитния лизис на всеки слой, получените бели пелети се определят тегловно. В **Таблица 1** са представени резултатите от тегловния анализ. Различията се дължат на различните утаяващи агенти и на различните съотношения утайтел : кръв. В някои случаи се забелязва групирането на всички клетки (включително и неутрофилите) в един общ слой и затова теглото му е много по-голямо от това на останалите два слоя на анализирания модел. Например, в модел D долният слой е 4.6151 g, а горният и средният са по-малко от 1 g. Наличието на различни клетъчни видове в слоевете е проверено и чрез плътностно градиентно центрофугиране с реагента Ficoll ($\rho = 1.077 \text{ g/mL}$).



Фиг. 1. Пет различни метода за разделяне на кръвни клетки с утайтели (модели А, В, С, D и E) и без утайтел (модел F).

Таблица 1. Пелети изолирани от трите слоя в моделите (А, В, С, D и E) с утаяващи агенти и в модел F без утайтел.

Модел	Слой	Пелети, g
A	Горен	0.0765
	Среден	3.4138
	Долен	0.4571
B	Горен	0.1979
	Среден	2.3628
	Долен	1.7885
C	Горен	0.0863
	Среден	1.2580
	Долен	3.6490
D	Горен	0.0775
	Среден	0.8532
	Долен	4.6151
E	Горен	0.0970
	Среден	1.7866
	Долен	1.3130
F	–	1.3620

Цветна ензим-субстратна реакция се използва за доказване наличието на неутрофилна еластаза, респ. неутрофили, в клетъчните пелети. Целевите клетки се откриват в долните слоеве на модели В, С, D и Е, и в средния слой на модел А. Стойностите, получени от цветната реакция, са от 0.254 до 0.946 AU. Най-висока стойност показва долният слой на модел Е (1:1 = 1% PVP : кръв). Най-голямо съдържание на неутрофили, с минимално замърсяване с други клетки, показват долните слоеве на модел Е (1:1 = 1% PVP : кръв) и модел В (1:1 = 6% Декстран : кръв). След това, наличието на неутрофилни клетки в долния слой се потвърждава и чрез микроскопски метод.

Модел Е (1:1 = 1% PVP : кръв) е с най-добро разделяне на неутрофилите от останалите кръвни клетки и показва най-високи стойности за еластазна активност. Този модел е най-подходящ от анализиранияте пет утаяващи методи за получаване на неутрофили.

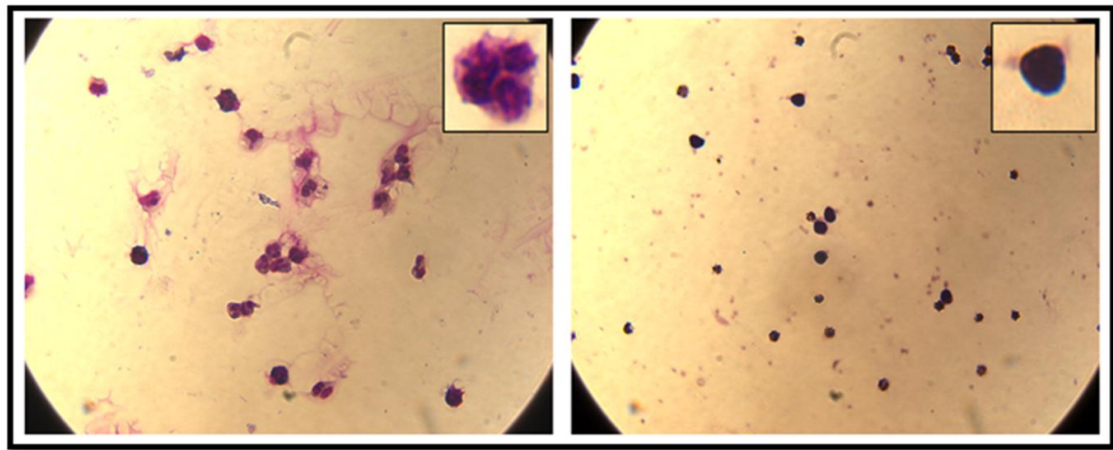
По-широко използван реагент за разделяне на кръвни клетки е **Ficoll-Paque PREMIUM (Ficoll)**. Той съдържа захарозен полимер (Ficoll PM400), натриев диатризоат и ЕДТА. Молекулите са силноразклонени и с високо съдържание на хидроксилни (-ОН) групи, което осигурява добра разтворимост във водни разтвори. Натриевият диатризоат осигурява частично преразпределение на свързани мембранни протеини на цитоплазмата в отделения единичен слой от клетки. А ЕДТА е хелатен агент на тежките метали в кръвта. Тези три компонента, съчетани в един разтвор Ficoll, осигуряват плътностно градиентно центрофугиране и успешно разделяне на кръвните клетки и запазването им неповредени.

При директно разделяне на клетките от антикоагулирана кръв с Ficoll, се получават четири ясно обособени слоя. Първият (горен) слой е плазмата, след него са разположени мононуклеарните клетки, след това е Ficoll, а на дъното са гранулоцитите (в това число са неутрофилите) и еритроцитите. След лизис на еритроцитите се получават неутрофилните клетки.

Микроскопски се анализират клетките от мононуклеарния слой и тези от гранулоцитния чрез оцветяването им с Giemsa и Eosin-Methylene blue (**Фигура 2**). При тези условия гранулоцитите имат цитоплазма, съдържаща множество светлорозови цитоплазмени гранули (**Фигура 2 – ляво**). Характерно за неутрофилите е, че клетките са с размер 10 – 14 μm и сегментирано ядро. Те са интензивно оцветени и съдържат гранули в

цитоплазмата. Зрелите неутрофили имат полиморфосегментирани ядра. Ядрените лобове са свързани с къси нишки.

Изолираните кръвни мононуклеарни клетки имат по-малък размер от неутрофилите (**Фигура 2 – дясно**). Мононуклеарните клетки се идентифицират по тяхната кръгла форма (5 – 10 μm) и типичното им ядро, което почти изпълва клетката, оставяйки тънък пръстен от цитоплазма.



Фиг. 2. Гранулоцити (**ляво**) и мононуклеарни клетки (**дясно**) от кръв на крава, оцветени с Giemsa и Eosin-Methylene blue.

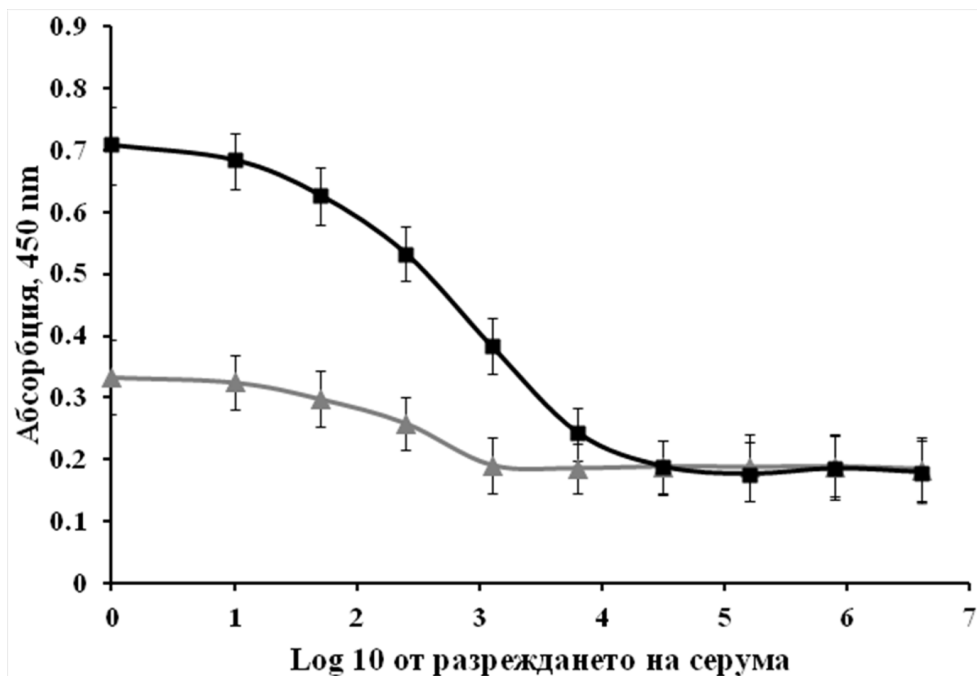
1.2. Получаване и доказване на анти-неутрофил антитяло.

1.2.1. Получаване на серум, съдържащ анти-неутрофил антитяло и определяне на титъра му.

Цели неутрофили и неутрофилни фрагменти, получени от кръв на крава, се използват за имунизирането на овца. Периодично се вземат проби от кръв на животното и се определя титъра на целевите антитела в кръвния серум чрез индиректен ELISA метод.

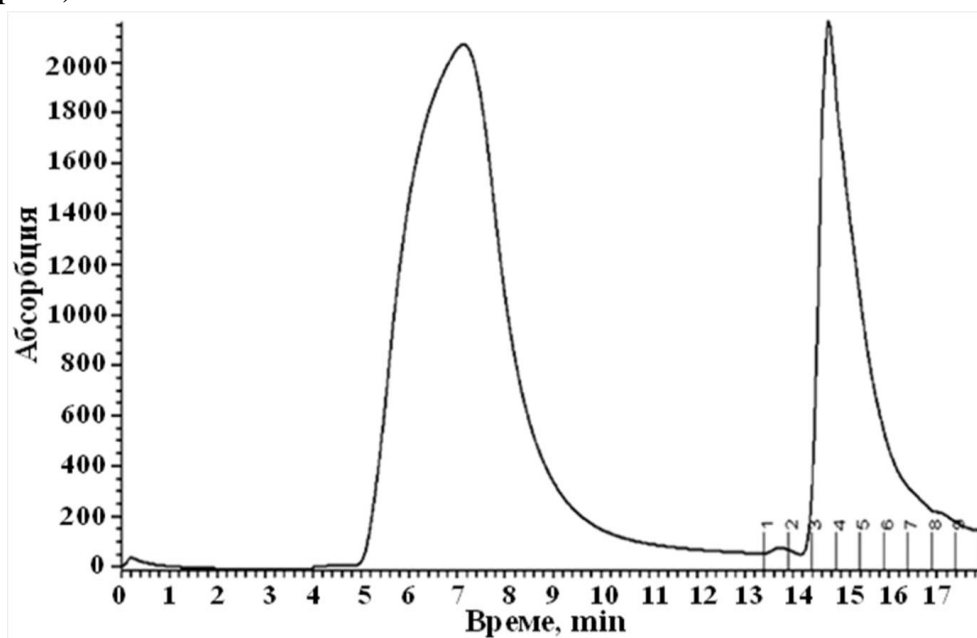
Титърът на антитяло се използва за определяне количеството на антитялото в кръвта. Този параметър показва най-ниската концентрация (пъти разреждане), при която антитялото произвежда забележим сигнал, при свързването си с антигена.

Титърът на получения овчи антисерум се определя на 75-тия и 105-тия ден от периода на инжектиране (**Фигура 3**). Първият титър е 1 250 пъти разреждане на серума, а този след края на инжекционния период е 31 250 пъти разреждане на серума. Високата стойност на титъра показва, че времето за инжектиране е оптимално и че полученото антитяло в серума е активно.



Фиг. 3. Титър на серума, съдържащ антитяло срещу неутрофили от крва, преди (▲) и след края (■) на инжекционния период.

Полученото антитяло е имуноглобулин тип G (IgG). То се извлича от кръвния серум чрез афинитетна хроматография (HiTrap Protein G HP) (Фигура 4).



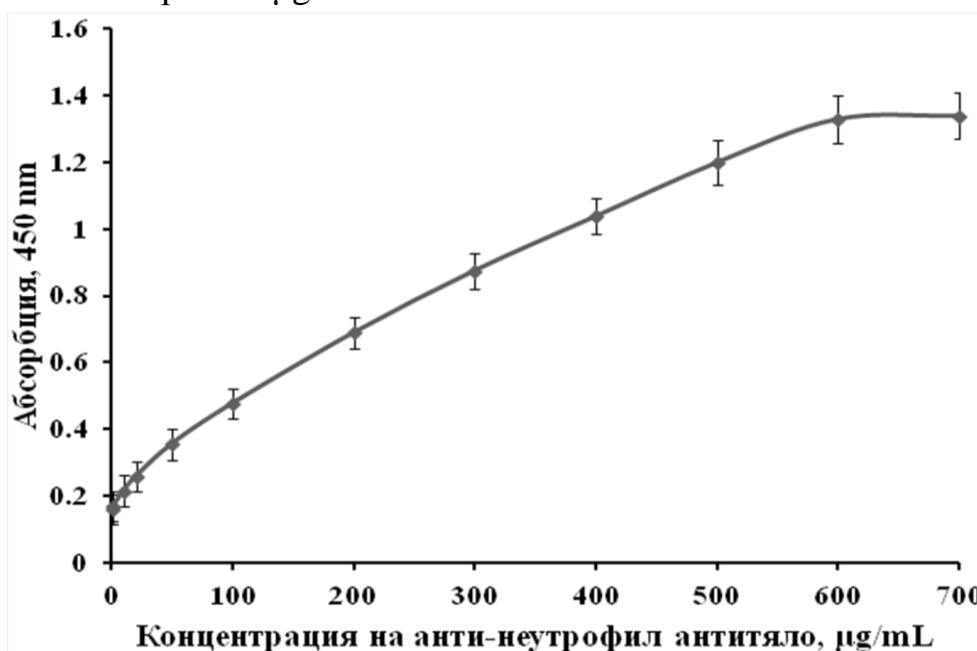
Фиг. 4. Афинитетна хроматограма на анти-неутрофил антитяло IgG тип от кръвен серум.

Разреденият антисерум със *свързващ буфер* се пропуска през хроматографската колона. *Свързващият буфер* осигурява свързването на

IgG-молекулите от серума към протеин G, намиращ се върху гранулите на пълнежа, а останалите компоненти от пробата напускат колоната. Така се получава първият пик от хроматограмата. След това през колоната преминава *елуиращ буфер*, който осигурява разкъсване на създадената връзка между IgG и протеин G. Така се събира фракцията на пречистеното антитяло. Целевото антитяло напуска колоната, формирайки втория пик от хроматограмата, във фракции от 3 до 7. Антитялото се лиофилизира след смяна на буфера с 20 mM натриев фосфат, рН 7.0, чрез HiPrep™ 26/10 Desalting колона.

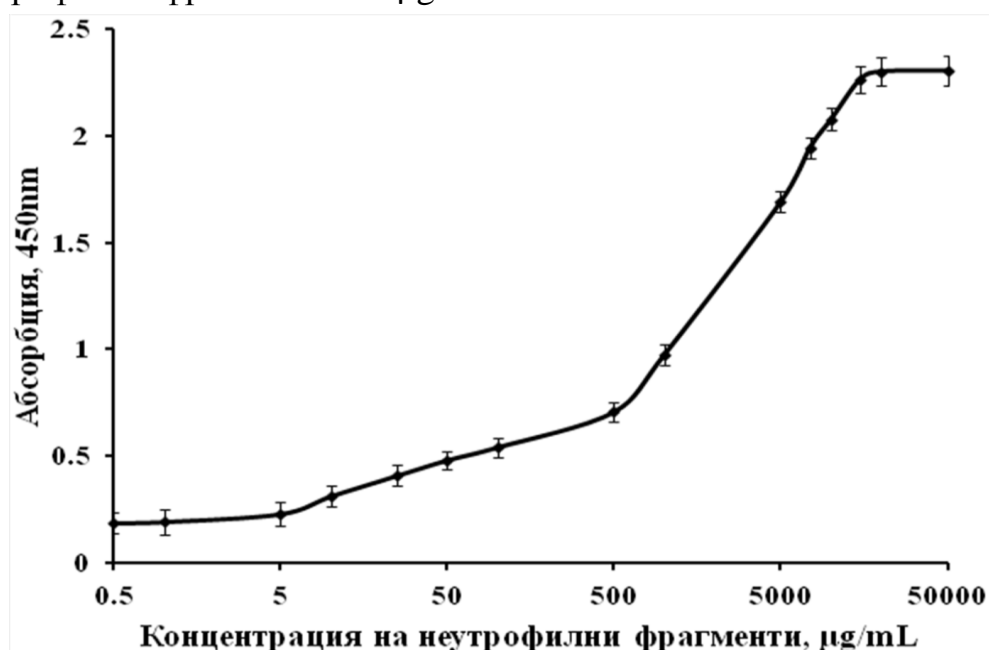
1.2.2. Индиректен ELISA метод с анти-неутрофил антитяло.

Определя се активността на произведеното анти-неутрофил антитяло чрез индиректен ELISA метод. За целта първо е определена оптималната работна концентрация на лиофилизираното анти-неутрофил антитяло. Използвани са различни концентрации на антитялото (0.7 – 700 µg/mL) и константна концентрация на неутрофилни фрагменти (5 µg/mL). На **Фигура 5** са представени графично резултатите. Получава се линейна област при концентрации на лиофилизираното антитяло от 20 µg/mL до 600 µg/mL, с уравнение: $y = 0.0018x + 0.2438$ и корелационен коефициент: $R^2 = 0.9703$. Като оптимална работна концентрация за анти-неутрофил антитяло се избира 500 µg/mL.



Фиг. 5. Индиректен ELISA метод с различни концентрации на анти-неутрофил антитяло (0.7 – 700 µg/mL) при константна концентрация на неутрофилни фрагменти (5 µg/mL).

Изследва се специфичността на полученото антитяло с различни концентрации на имуногена (неутрофилни фрагменти). Провежда се индиректен ELISA метод с концентрации на неутрофилни фрагменти от 0.5 до 50 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ с установената оптимална работна концентрация на анти-неутрофил антитяло (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (**Фигура 6**). При тези условия има две линейни области. Първата е от 10 до 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, а втората е от 5 000 до 15 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ неутрофилни фрагменти. Съответно линейните уравнения и корелационните коефициенти са: $y = 0.0006x + 0.4080$, $R^2 = 0.9356$ и $y = 0.00005x + 1.4821$, $R^2 = 0.9389$. При тези условия границата на откриване на неутрофилни фрагменти е 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Фиг. 6. Индиректен ELISA метод на различни концентрации на неутрофилни фрагменти (0.5 – 50 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) и константна концентрация на анти-неутрофил антитяло (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Провежда се индиректен ELISA метод на цели кръвни и млечни неутрофили. Чрез плътностно градиентно центрофугиране с Ficoll са получени две групи клетки – неутрофилни клетки и мононуклеарни клетки. Установени са линейните интервали за цели кръвни неутрофили (от 2 000 до 2 000 000 cells/mL) и за млечни неутрофили (от 20 000 до 2 000 000 cells/mL), **Таблица 2**. Изследвана е и крос-реактивността на анти-неутрофил антитялото. Определена е 100% селективност на антитялото спрямо кръвните и млечни неутрофили, а спрямо мононуклеарни клетки от кръв и мляко, то показва много малка активност

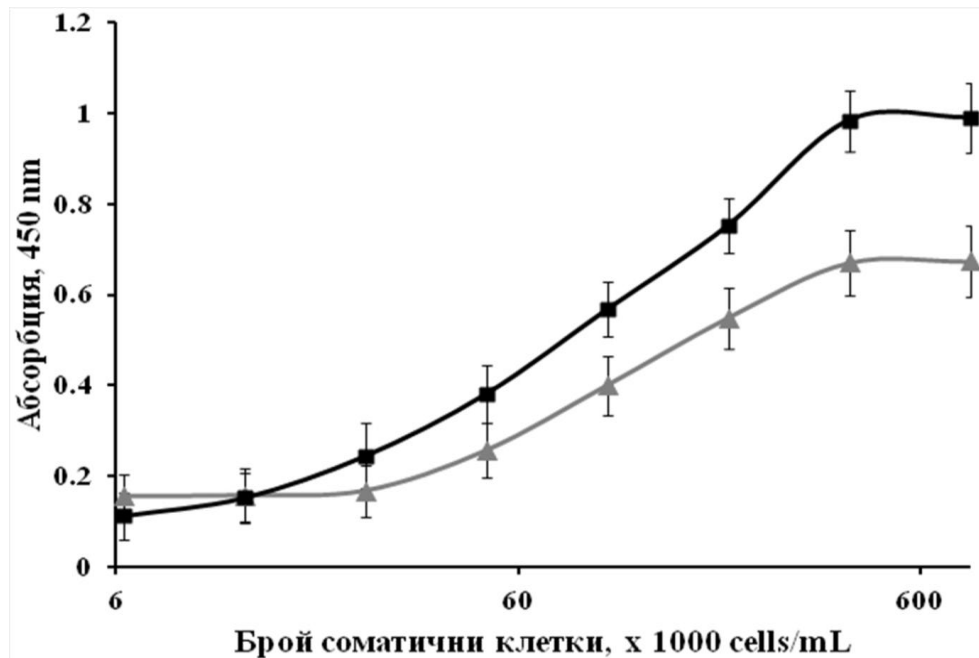
с тези неспецифични за него клетки. Този резултат убедително показва потенциалните възможности на полученото анти-неутрофилно антитяло за определяне на количеството неутрофили в краве мляко, което ще позволи проследяване на здравословния статус на вимето. Резултатите са представени в **Таблица 2**.

Таблица 2. Активност на полученото анти-неутрофилно антитяло с неутрофили и крос-реактивност спрямо мононуклеарни клетки от кръв и мляко на крава, разделени с Ficoll.

Брой клетки, cells/mL	Кръвни неутрофилни клетки, AU	Кръвни мононуклеарни клетки, AU	Млечни неутрофилни клетки, AU	Млечни мононуклеарни клетки, AU
2 000	0.40	0.00	0.00	0.00
20 000	0.70	0.05	0.30	0.00
200 000	0.90	0.10	0.45	0.13
2 000 000	1.00	0.15	0.55	0.20

Както се вижда от **Таблица 2** резултатите, получени с клетки от мляко, са малко по-ниски от тези с кръвни клетки. Затова се провежда индиректен ELISA метод с анти-неутрофилно антитяло и соматични клетки в буфер и в мляко, за изследване влиянието на матричния ефект на млякото, дължащ се на млечните мазнини и протеини.

На **Фигура 7** е представена графика на получените резултати. Получена е линейна област на калибрационната крива от 25 000 до 400 000 cells/mL соматични клетки в мляко и от 12 500 до 400 000 cells/mL соматични клетки в буфер. Резултатите на абсорбция на пробите с мляко са по-ниски от тези в буфер, което потвърждава, че веществата в млякото оказват матричен ефект. Соматичните клетки в мляко имат линейно уравнение: $y = 0.0013x + 0.1940$ и корелационен коефициент: $R^2 = 0.9638$, а соматичните клетки в буфер: $y = 0.0015x + 0.2310$ и $R^2 = 0.9707$. Установено е, че независимо от наличието на матричен ефект, анализът е достатъчно чувствителен за определяне на различни концентрации на целевите клетки.



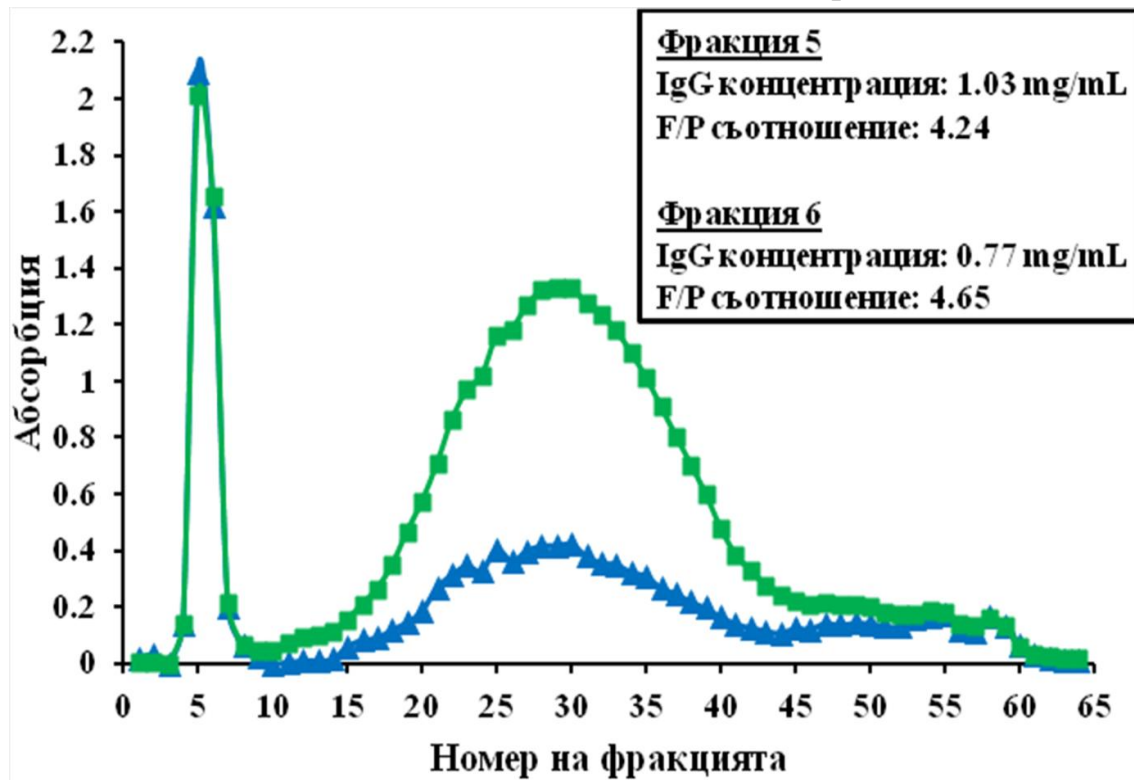
Фиг. 7. Индиректен ELISA метод на соматични клетки в мляко (▲) и соматични клетки в буфер (■), при константна концентрация на анти-неутрофил антитяло (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

1.3. Получаване, пречистване и доказване на конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC.

Флуоресцеин изотиоцианатът (FITC) се конюгира към молекули с белтъчен характер (като антителата) чрез своята изотиоцианатна група. Тя се свързва с аминокислотните групи на протеините, образувайки тиокарбамидна връзка. След свързването на компонентите, конюгатът се пречиства от нереагиралите вещества чрез молекулно-ситова хроматография.

При пречистването на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC се използва колона с пълнеж Sephadex G25 Medium. Измерва се абсорбцията на получените фракции при 280 nm (характерен абсорбционен максимум за антитялото) и при 495 nm (характерен абсорбционен максимум за FITC). Полученият конюгат има най-голяма молекулна маса, в сравнение с останалите компоненти на реакционната смес, затова се открива в първия пик на графиката, т.е. фракция 5 и фракция 6 (**Фигура 8**). Чрез получените резултати от абсорбциите на тези фракции са изчислени: концентрация на IgG (анти-неутрофил антитяло) в конюгата и съотношение FITC/антитяло (F/P). Определено е, че фракция 5 съдържа IgG 1.03 mg/mL и F/P 4.24. Фракция 6 има IgG 0.77 mg/mL и F/P 4.65. Резултатите са показателни за

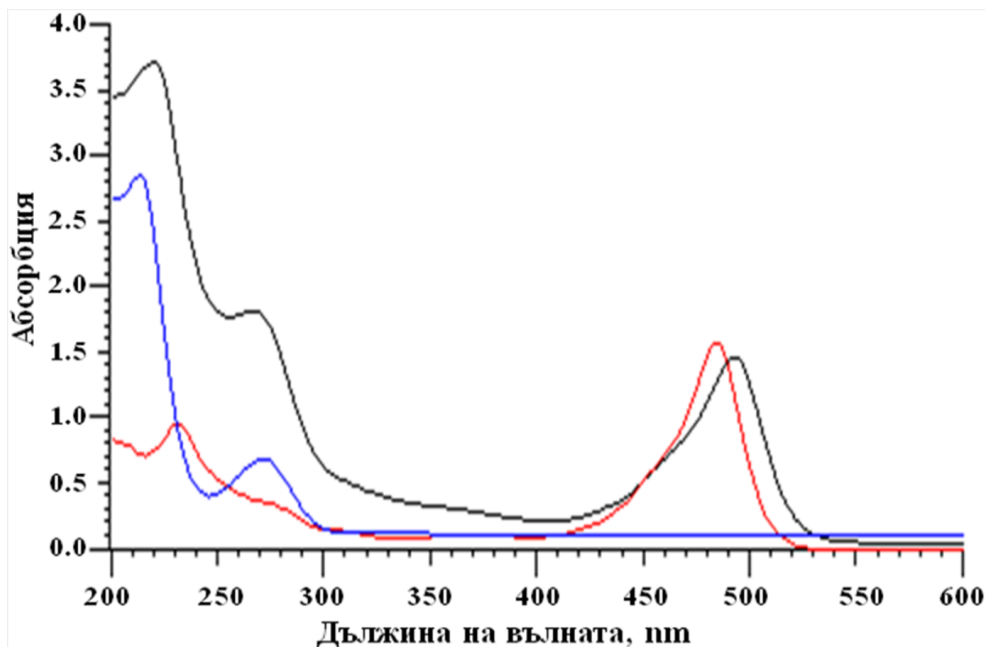
качеството на получения конюгат и неговите флуоресцентни свойства, тъй като се счита, че оптимално съотношение F/P е в интервала 3 – 10.



Фиг. 8. Гел-филтрационна хроматограма на конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC. Абсорбция при 280 nm (▲) и 495 nm (■).

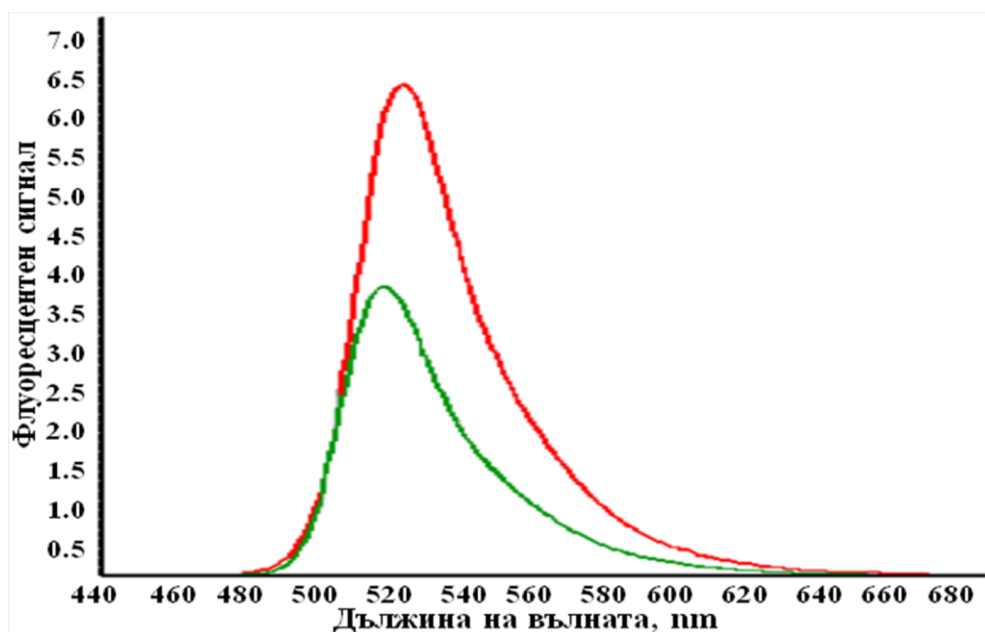
За доказване на успешното свързване на антитялото с флуоресцентния маркер се проследява абсорбционния спектър на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC в областта от 200 nm до 600 nm на UV/Vis спектрофотометър JENWAY 6900. Този спектър е сравнен с абсорбционните спектри на несвързани анти-неутрофил антитяло и FITC, при същите условия.

На **Фигура 9** са представени резултатите от абсорбционните анализи. Конюгатът има два абсорбционни максимума: първият при 265 nm и вторият при 492 nm. Забелязва се леко изместване на максимумите на конюгата в сравнение на тези на свободно антитяло (от 270 nm до 265 nm) и несвързан FITC (от 484 nm до 492 nm), което е показателно за свързването на двата компоненти.



Фиг. 9. UV-Vis спектри на конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC (черно), FITC (червено) и антитяло (синьо).

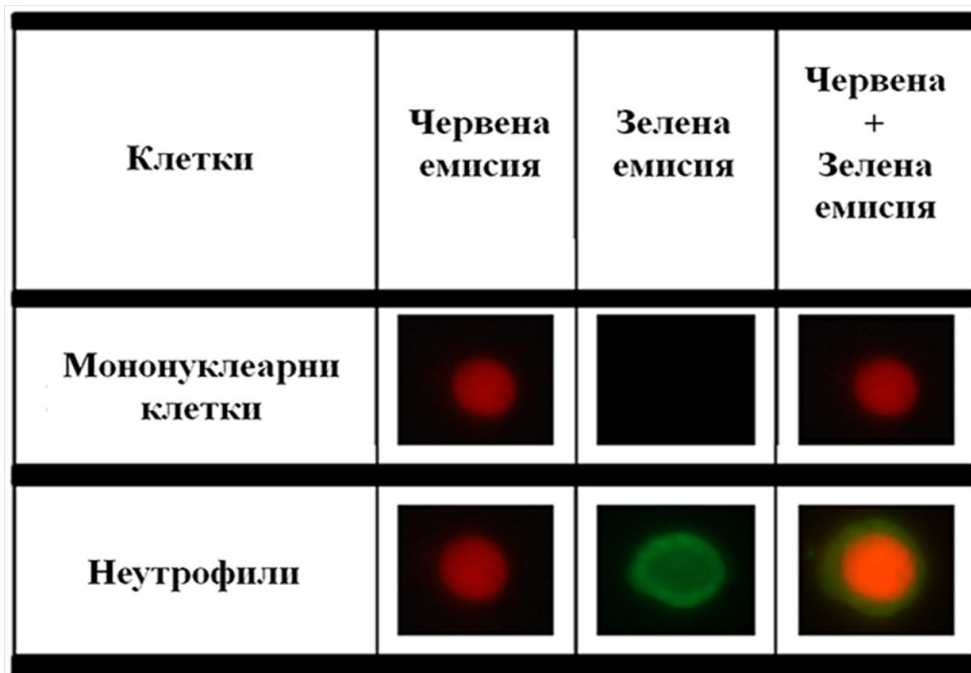
Изследвани са и емисионните (флуоресцентните) свойства на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC. Направено е сравнение на емисионните спектри на конюгата и несвързан FITC, направени на флуоресцентен спектрофотометър F96Pro (**Фигура 10**). Свободният FITC има флуоресцентен максимум при 518 nm, а конюгатът антитяло-FITC при 528 nm. Това изместване се дължи на свързването на багрилото с антитялото.



Фиг. 10. Флуоресцентни спектри на конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC (червено) и свободен FITC (зелено).

1.4. Валидиране на имунофлуоресцентен микроскопски анализ с конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC и прилагането му в реални проби.

Полученият флуоресцентен конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC се прилага за микроскопско визуализиране на кръвни клетки от крава, разделени с Ficoll. Анализира се крос-реактивността на конюгата с неутрофили (от гранулоцитния слой) и мононуклеарни клетки. Прилагат се към клетките конюгираното анти-неутрофил антитяло с FITC и флуоресцентното багрило пропидиев йодид (PI). Пропидиевият йодид (PI) е за недиференциално оцветяване на всички клетки. Багрилото се интеркалира между базите на нуклеиновите киселини и ядрата на клетките светят в червено. Конюгираното анти-неутрофил антитяло с FITC се свързва с епитопи, лежащи на повърхността на неутрофилите и цялата клетка свети в зелено. При този анализ (**Фигура 11**), вътрешността на неутрофилните клетки се оцветява в червено от PI, а повърхността в зелено от конюгата. Вътрешността на мононуклеарните клетки също е червена от PI, но повърхността им не е зелена. Това доказва високата специфичност на получения конюгат при анализ на кръвни клетки от крава.

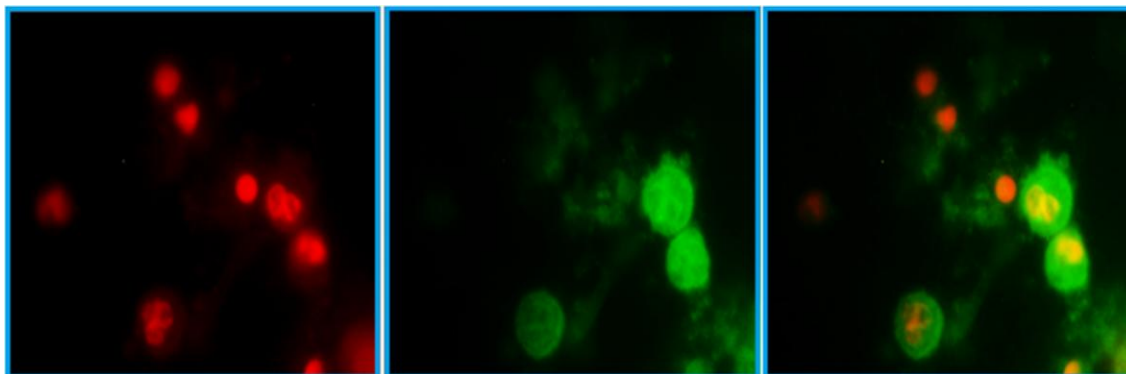


Фиг. 11. Имунофлуоресцентен микроскопски анализ на кръвни клетки от крава – неутрофили и мононуклеарни клетки, с PI (червена емисия), анти-неутрофил антитяло – FITC (зелена емисия) и комбинация от двете снимки (червена + зелена емисия).

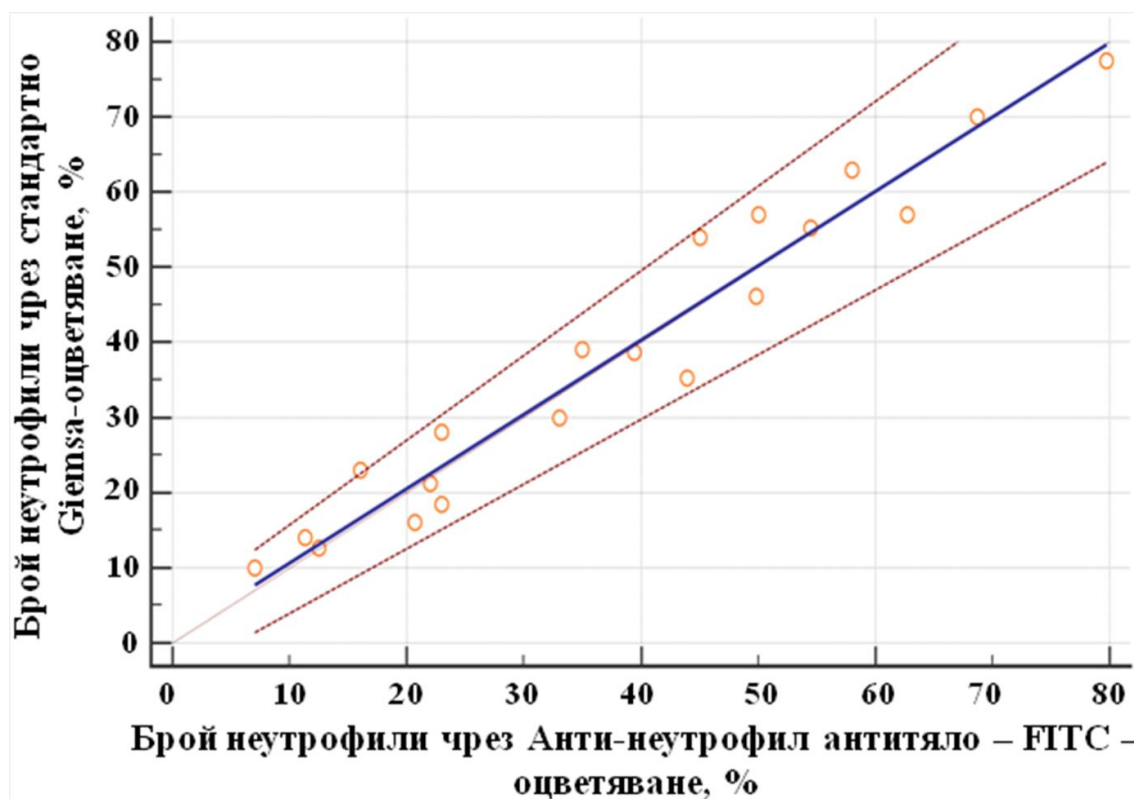
Експериментът се извършва и със соматични клетки от краве мляко. При използването на PI (червено) се установява общият брой соматични клетки (ОБСК), а с добавяне на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC (зелено) се изброяват неутрофилите. Така става възможно проследяването на процента неутрофили, спрямо ОБСК, който е индикатор за здравословния статус на млечната жлеза още в началото на развитието на мастита. На **Фигура 12** са представени снимки на оцветените млечни клетки.

Създаденият имунофлуоресцентен микроскопски анализ с конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC е сравнен с комерсиален микроскопски метод за диференциално броене на клетките с багрилото Giemsa. Изследвани са проби, при които концентрацията на неутрофилни клетки в мляко варира от 7 – 80%, спрямо ОБСК. Забелязва се много добро съответствие между двата метода (**Фигура 13**). При анализ на неутрофили от 7% до 80% в мляко, корелационният коефициент е 0.974, изчислен чрез програма MedCalc, Passing-Bablok regression. Предимства на изработения имунофлуоресцентен анализ са ясното оцветяване на клетките и краткото време за анализ (70 min), сравнено с метода Giemsa (2 часа).

Извършен е анализ на различни проби мляко, които имат ОБСК от 100 000 до 800 000 cells/mL. ОБСК е установен чрез комерсиален брояч на фирма Милкотроник ООД, а броят неутрофили чрез имунофлуоресцентен микроскопски анализ с конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC. Резултатите са представени в **Таблица 3**. Забелязва се, че при ОБСК 100 000 cells/mL (здрaво мляко), неутрофилите са 30%. При ОБСК от 400 000 cells/mL (легален праг за приемане на мляко в България), неутрофилите са 70%. При ОБСК 800 000 cells/mL (маститно мляко), неутрофилите достигат до 88%.



Фиг. 12. Имунофлуоресцентен микроскопски анализ на соматични клетки от краве мляко с PI (червена емисия), анти-неутрофил антитяло – FITC (зелена емисия) и комбинация от двете снимки (червена + зелена емисия).



Фиг. 13. Корелация на резултатите, получени от броенето на неутрофилни клетки в мляко с изработения имунофлуоресцентен микроскопски метод (с анти-неутрофил антитяло – FITC) и стандартен Giemsa-метод.

Таблица 3. ОБСК и брой неутрофили в реални проби от краве мляко, изследвани с анти-неутрофил антитяло – FITC конюгат.

Номер на пробата	ОБСК, x 1000 cells/mL	Брой неутрофили, x 1000 cells/mL	Брой неутрофили, %	Стандартно отклонение, Брой неутрофили, x 1000 cells/mL
1	420	285	68	57.375
2	800	686	86	88.363
3	100	33	33	4.074
4	500	390	78	5.000
5	200	90	45	12.000
6	400	280	70	58.333

Тези резултати се препокриват с получените от други автори. Сиссиги и колеги (1997) откриват, че в проби от мляко на крава, неутрофилите достигат между 30 – 40%, когато ОБСК е по-малко от 100 000 cells/mL, но се покачва до 70% когато достигне 400 000 cells/mL. При макрофагите се

наблюдава обратната тенденция, т.е. тяхният брой намаля когато се увеличава броят на неутрофилите.

Други автори описват, че броят на неутрофилите се покачва до 90% в маститно мляко. Alhussien и колеktiv (2015) докладват, че в мляко от здрави крави (ОБСК 255 000 cells/mL) неутрофилите са 18.5%, при субклиничен мастит (ОБСК 597 000 cells/mL) са 43.29%, а при клиничен (ОБСК 1 219 000 cells/mL) достигат до 77.4%. Други изследвания показват, че при нормални млека с ОБСК от 110 000 cells/mL до 137 000 cells/mL неутрофилите представляват ~ 18% от общия брой. При установен субклиничен мастит в млека с ОБСК 216 000 – 289 000 cells/mL, тяхното количество значително се увеличава (~ 55%), а при доказан клиничен мастит (ОБСК 388 000 – 614 000 cells/mL) неутрофилите стигат до ~ 92%.

Всички тези резултати отново потвърждават необходимостта от удобен метод за изчисляване количеството на неутрофилите спрямо ОБСК и за диагностициране на мастита в ранен стадий. Определяне само на общото клетъчно съдържание може да причисли заразено мляко към групата на здравите, затова в последните години специалистите считат, че е необходимо да се извършва диференцирано броене на клетките и се търси подходящ практичен метод за тяхното диференциране. Предлаганият от нас метод за дифиренциално определяне на неутрофили е подходящ практичен метод, който с успех може да задоволи тези потребности. Разработеният имунофлуоресцентен микроскопски анализ чрез флуоресцентен конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC е надежден метод за определяне на неутрофилите спрямо общия брой на СК.

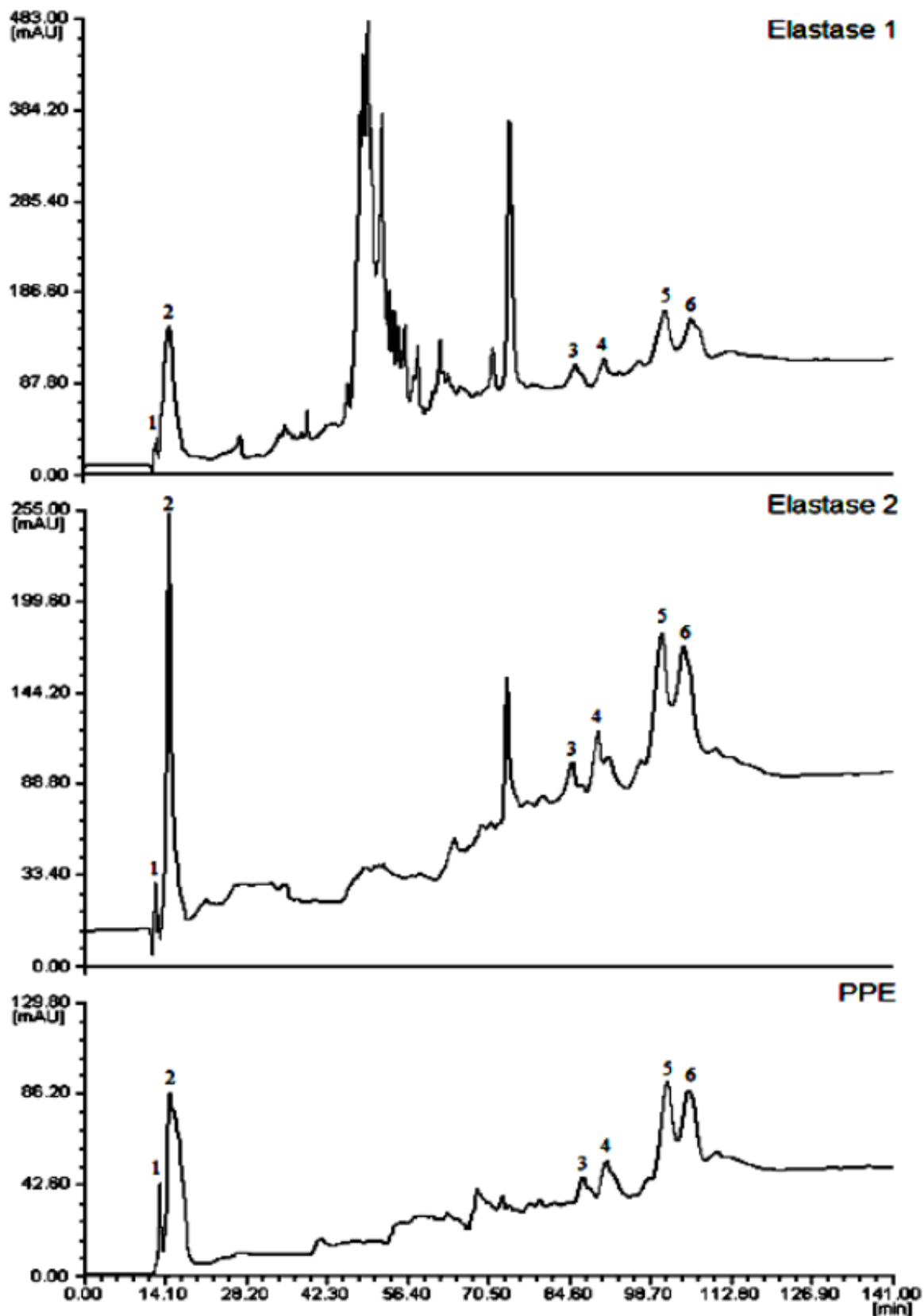
2. Разработване на имунофлуоресцентен микроскопски анализ на базата на анти-еластаза антитяло.

Еластазата е протеолитичен ензим, присъщ за неутрофилите. Притежава защитна функция при възпаление на млечната жлеза. При наличие на мастит се увеличава количеството на неутрофили в кравето мляко, респ. количеството на еластаза. В маститното мляко ОБСК се увеличава (над 400 000 cells/mL, според ЕС) и някои от клетките са цели, а други – разкъсани. Затова при наличие на възпаление на вимето, еластазата се намира както в неутрофилните клетки, така и в свободно състояние в млякото. Следователно, подобно на неутрофилите, еластазата може да бъде използвана като маркер за определяне на състоянието на млечната жлеза. При повишено количество на ензима в млякото се счита, че организъмът на животното се бори с инфекция на млечната жлеза.

2.1. Изолиране на неутрофилна еластаза.

Наличието на неутрофилна еластаза извън клетките и в неутрофилите е доказано при анализ на маститно краве мляко. Първо се отделят клетките от млякото. Получената супернатанта без соматични клетки се запазва за анализ. Отделените соматични клетки са основно неутрофили, поради инфекцията в млечната жлеза на кравата. Затова след разкъсване на клетките, се освобождава голямо количество неутрофилна еластаза. Извършва се анализ за наличие на еластаза в получената супернатанта (*Elastase 1*) и в неутрофилните клетки (*Elastase 2*) чрез високоефективна течна хроматография с обратна фаза (RP-HPLC). Като свидетел се използва сертифицирана свинска панкреатична еластаза (*PPE*). При сравнение на хроматограмите на трите еластази се забелязват шест подобни пика, които имат еднакво време на задържане, респ. при еднаква концентрация на метанол в елуента (**Фигура 14**).

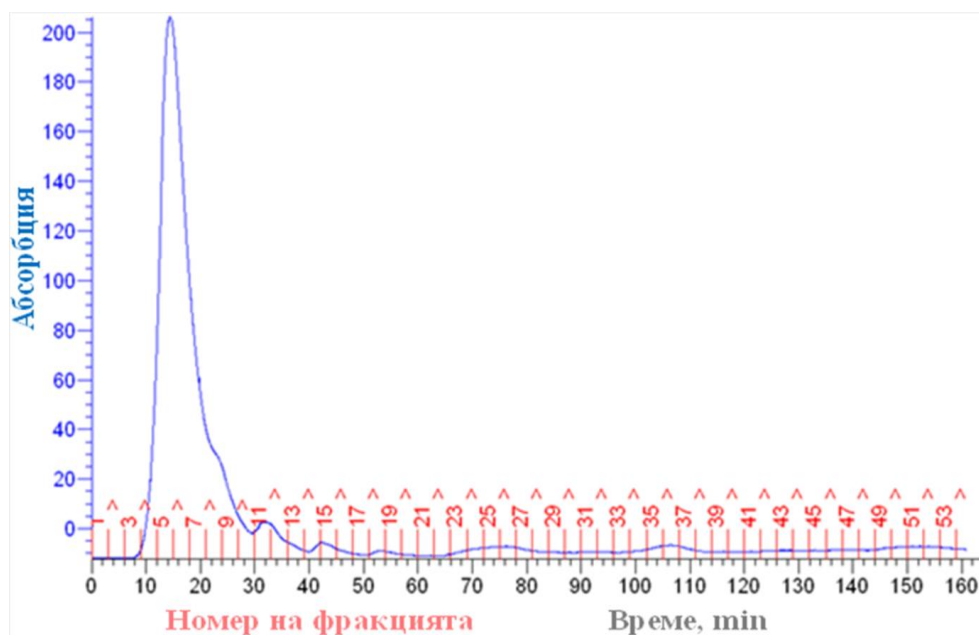
Поради еднаквата полярност на фракциите от пикове 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, спрямо момента на напускане на колоната и използвания елуент, те се събират в три фракции. Извършва се анализ за ензимна активност със специфичен субстрат на еластазата (N-сукцинил-аланин-аланин-аланин-р-нитроанилид). Най-висока активност показват първите два пика (1 и 2).



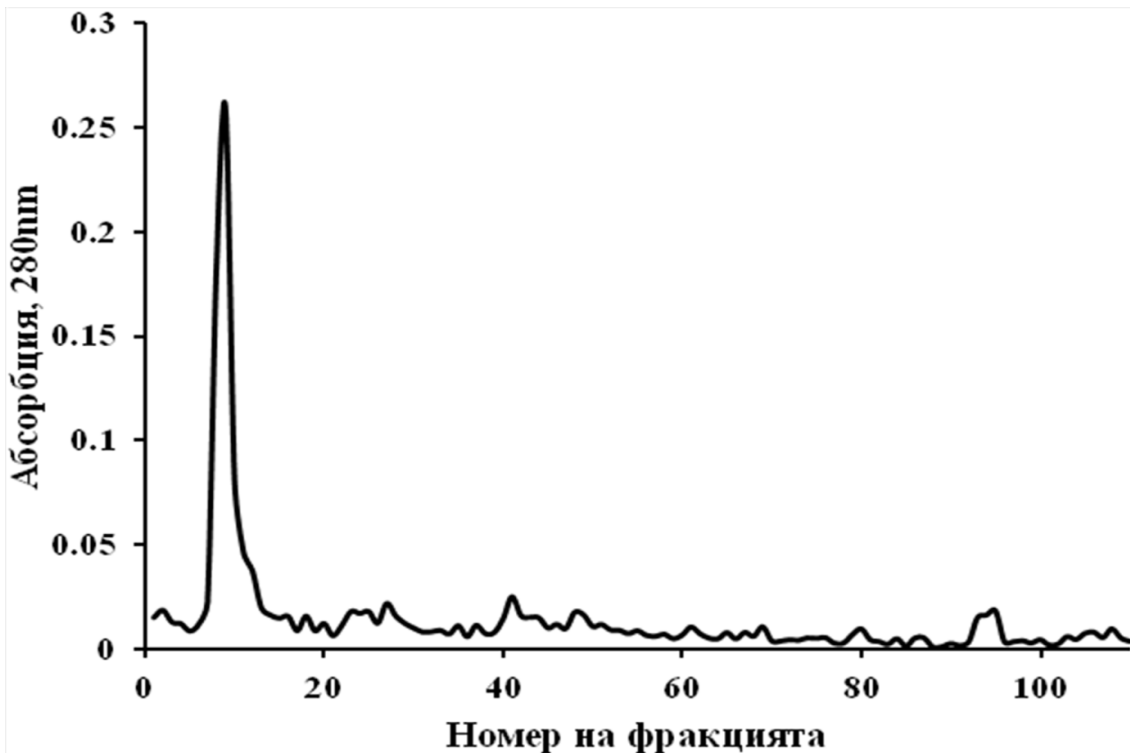
Фиг. 14. RP-HPLC хроматограми на неутрофилна еластаза от супернатантата на маститно краве мляко (**Elastase 1**) и от неутрофили от маститно краве мляко (**Elastase 2**), сравнени със свинска панкреатична еластаза (**PPE**).

Еластаза е изолирана и от неутрофили от кръв, необходима като имуноген за получаване на анти-еластаза антитяло. Използват се неутрофили от кръв на здрава крава, а не маститно мляко, за да се избегне загубата на еластазата, която е извън клетките като имунен отговор, и за по-голям добив на целевия ензим. Кръвните клетки се разделят спрямо тяхната плътност с Ficoll и след серия от процедури неутрофилите се разкъсват и еластазата се освобождава от тях. Ензимът е високо катионен гликопротеин и се пречиства чрез йонообменна колона SP Sepharose и градиент на концентрацията на NaCl в елуента (**Фигура 15**).

В първия пик на хроматограмата се елуират всички отрицателно заредени протеини (фракции от 4 до 8, при концентрация на NaCl 0.20M), а след тях напускат колоната положителните протеини. Във всяка фракция се следи за наличие на ензима чрез цветната ензим-субстратна реакция с N-сукцинил-аланин-аланин-аланин-р-нитроанилид. Най-висока активност показват фракциите от 14 до 17 (при концентрация на NaCl 0.45M и 0.52M) и се събират. Допълнително се пречистват чрез гел-филтрация на Sephadex G75, поради възможното наличие на други катионни белтъчни молекули (**Фигура 16**). След разделянето на присъстващите молекули по размер, еластазата се открива в първия и най-голям пик (фракция 8 и 9). Молекулно-ситовата хроматография и осъществената ензим-субстратна реакция потвърждават, че изборът на йонообменна колона е подходящ и е постигнато изолиране на еластазата с незначително количество странични примеси.



Фиг. 15. Йънообменна хроматограма (SP Sepharose) за изолиране на неутрофилна еластаза от кръв на здрава крава.



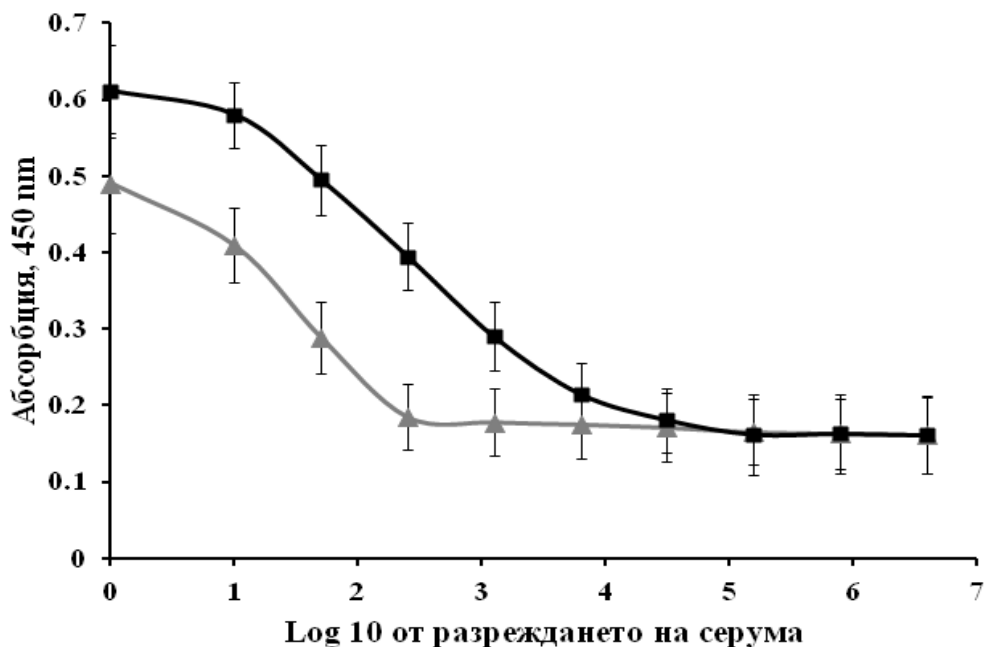
Фиг. 16. Гел-филтрационна хроматограма (Sephadex G75) на фракциите с еластазна активност, получени след йонообменна хроматография.

2.1. Получаване и доказване на анти-еластаза антитяло.

2.1.1. Получаване на серум, съдържащ анти-еластаза антитяло и определяне на титъра му.

Пречистена неутрофилна еластаза от кръв на здрава крава се използва за инжектиране на овца. Индиректен ELISA метод се прилага за проследяване на продукцията на анти-еластаза антитялото (**Фигура 17**). Преди края на инжекционния период (75-ти ден) титърът стига до 1 250 пъти разреждане на серума, а след края на периода (105-ти ден) е до 31 250 пъти разреждане, което доказва успешното получаване на антитялото.

Полученото антитяло е от IgG тип и се пречиства от серума чрез афинитетна хроматография с колона HiTrap Protein G HP. След това се провежда смяна на буфера с 20 mM натриев фосфат, pH 7.0, чрез HiPrep™ 26/10 Desalting колона. Процедурите се извършват при същите условия, както при пречистването на анти-неутрофил антитялото. Полученото анти-еластаза антитяло се лиофилизира.

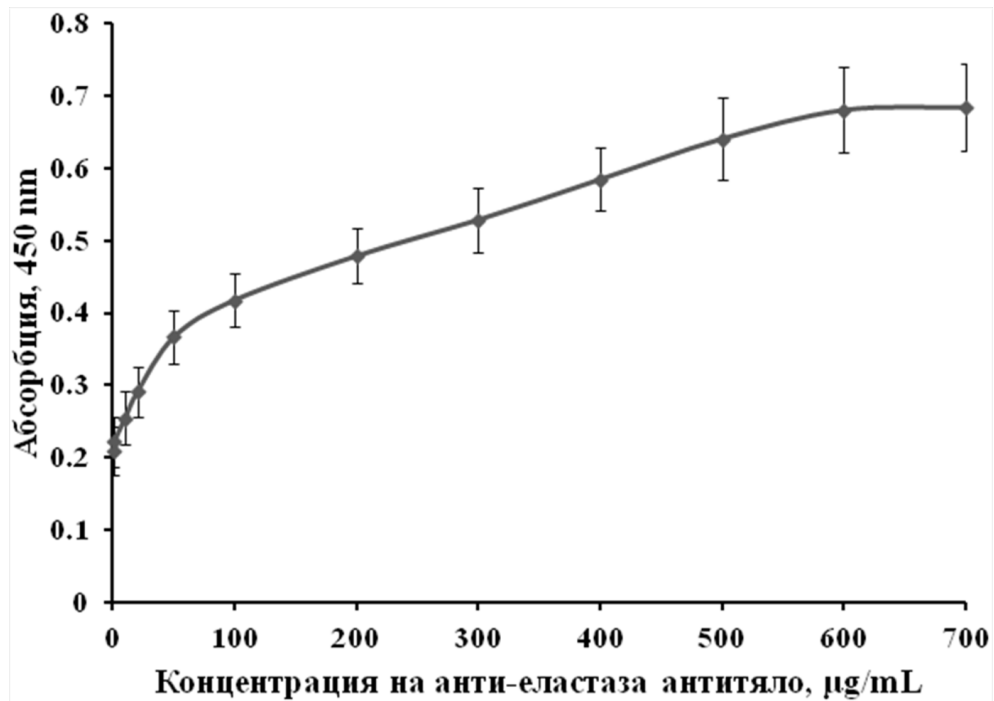


Фиг. 17. Титър на серума, съдържащ анти тяло срещу неутрофилна еластаза от крава, преди (▲) и след края (■) на инжекционния период.

2.1.2. Индиректен ELISA метод с анти-еластаза анти тяло.

Определя се активността на произведеното анти-еластаза анти тяло чрез индиректен ELISA метод. За целта първо се провежда анализ за установяване на оптималната работна концентрация на лиофилизираното анти-еластаза анти тяло. Използва се константна концентрация на имуногена – неутрофилна еластаза (5 $\mu\text{g/mL}$) и различни концентрации на анти тялото (0.7 – 700 $\mu\text{g/mL}$). Резултатите са представени на **Фигура 18**. Получава се линейна област при концентрации на лиофилизираното анти тяло от 50 $\mu\text{g/mL}$ до 700 $\mu\text{g/mL}$, с уравнение: $y = 0.0005x + 0.3686$ и коефициент на корелация: $R^2 = 0.9708$. За оптимална работна концентрация за анти-еластаза анти тялото е избрана 600 $\mu\text{g/mL}$.

Провежда се индиректен ELISA метод на различни концентрации неутрофилна еластаза (0.1 – 1 500 $\mu\text{g/mL}$) с установената оптимална работна концентрация на анти-еластаза анти тяло (600 $\mu\text{g/mL}$) (**Фигура 19**). Получават се две линейни области. Първата е от 1 до 50 $\mu\text{g/mL}$, а втората е от 300 до 1 000 $\mu\text{g/mL}$ неутрофилна еластаза. Съответно линейните уравнения и корелационните коефициенти са: $y = 0.0079x + 0.3597$, $R^2 = 0.9831$ и $y = 0.0001x + 0.7658$, $R^2 = 0.9362$. Границата на откриване на неутрофилна еластаза е 1 $\mu\text{g/mL}$.



Фиг. 18. Индиректен ELISA метод на различни концентрации антитяло срещу кравешка неутрофилна еластаза (0.7 – 700 $\mu\text{g/mL}$) и константна концентрация на неутрофилна еластаза от крва (5 $\mu\text{g/mL}$).



Фиг. 19. Индиректен ELISA метод на различни концентрации на неутрофилна еластаза (0.1 – 1 500 $\mu\text{g/mL}$) и константна концентрация на анти-еластаза антитяло (600 $\mu\text{g/mL}$).

Провежда се ELISA с целевите клетки (неутрофили) и оптималната работна концентрация на полученото антитяло. Изследва се специфичността и крос-реактивността на анти-еластаза антитялото чрез индиректен ELISA метод с кръвни и млечни (соматични) клетки от крава, разделени с Ficoll. Резултатите са представени на **Таблица 4**.

Анти-еластаза антитялото показва висока активност (0.38 AU) дори при ниски концентрации на кръвни неутрофили (2 000 cells/mL) и слаба крос-реактивност (0.15 AU) при изключително голям брой мононуклеарни клетки (2 000 000 cells/mL). Подобна тенденция се забелязва и при анализ на соматични клетки от крава мляко (0.20 AU при 20 000 cell/mL млечни неутрофили и 0.00 AU при 2 000 000 cells/mL мононуклеарни клетки). Това доказва високата специфичност на полученото анти-еластаза антитяло спрямо целевите неутрофилни клетки и пренебрежимо малка крос-реактивност с мононуклеарни клетки.

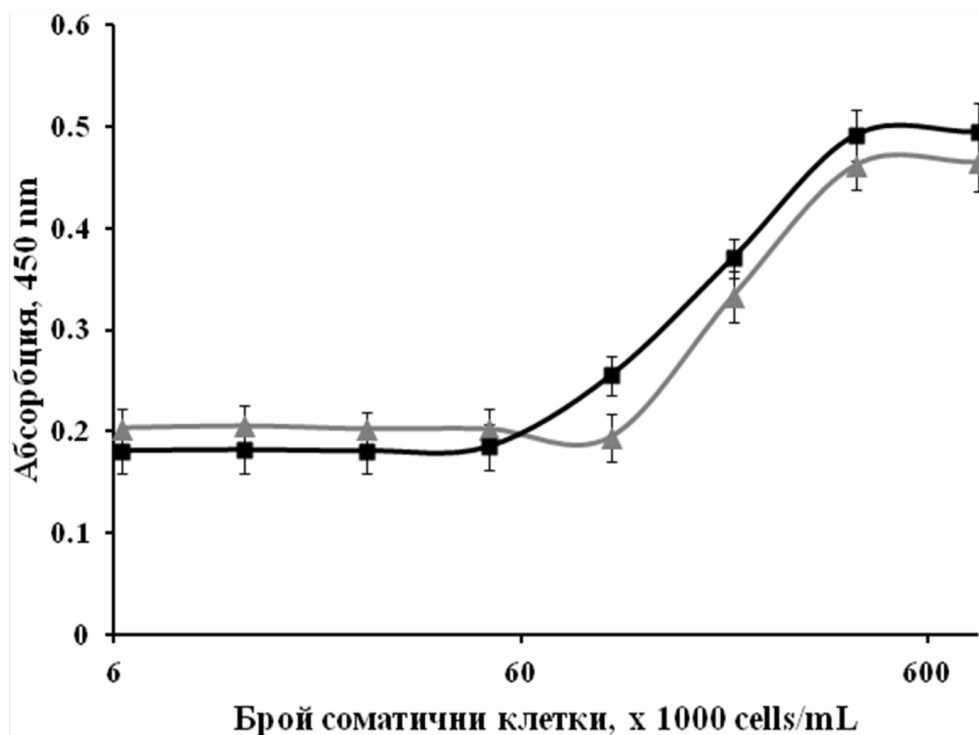
Таблица 4. Активност на полученото анти-еластаза антитяло с неутрофили и крос-реактивност спрямо мононуклеарни клетки от кръв и мляко на крава, разделени с Ficoll.

Брой клетки, cells/mL	Кръвни неутрофилни клетки, AU	Кръвни мононуклеарни клетки, AU	Млечни неутрофилни клетки, AU	Млечни мононуклеарни клетки, AU
2 000	0.38	0.00	0.00	0.00
20 000	0.45	0.00	0.20	0.00
200 000	0.72	0.00	0.31	0.00
2 000 000	0.78	0.15	0.47	0.00

При анализа на анти-еластаза антитяло със соматични клетки от мляко се забелязват по-ниски стойности. Това най-вероятно се дължи на матричния ефект на компонентите в млякото. Влиянието на този ефект се изследва чрез провеждане на индиректен ELISA метод на соматични клетки от крава в мляко и в буфер. Резултатите са представени на **Фигура 20**.

При използването на анти-еластаза антитяло за определяне на соматични клетки в мляко се получава линейна област от 100 000 до 400 000 cells/mL. А при анализа на соматични клетки в буфер, линейната

област е малко по-голяма (50 000 – 400 000 cells/mL). Също така се забелязва, че резултатите от абсорбцията на пробите в мляко са по-ниски от тези в буфер, което е доказателство за наличие на матричен ефект на млякото. Соматичните клетки в мляко имат линейно уравнение: $y = 0.0009x + 0.1295$ и корелационен коефициент: $R^2 = 0.9559$, а соматичните клетки в буфер: $y = 0.0009x + 0.1655$ и $R^2 = 0.9635$.



Фиг. 20. Индиректен ELISA метод на соматични клетки в мляко (▲) и соматични клетки в буфер (■), при константна концентрация на анти-еластаза антитяло (600 $\mu\text{g/mL}$).

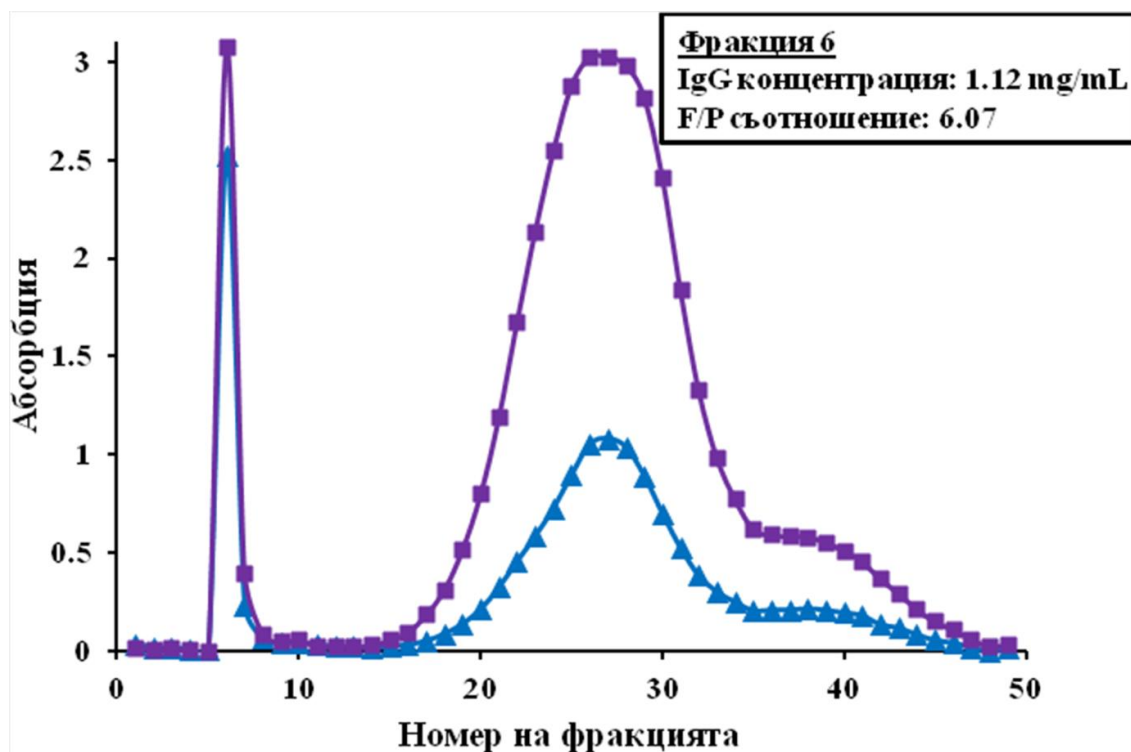
След проучване свойствата на полученото анти-еластаза антитяло, се приготвят флуоресцентни конюгати с него, за да се разработи имунофлуоресцентния анализ за определяне на неутрофили в краве мляко.

2.2. Флуоресцентни конюгати на анти-еластаза антитяло.

2.2.1. Получаване, пречистване и доказване на конюгат анти-еластаза антитяло – FITC.

Анти-еластаза антитялото се бележи с флуоресцентното багрило флуоресцеин изотиоцианат (FITC). Пречиства се от nereагиралите компоненти чрез гел-филтрация (Sephadex G25 Medium). В сместа за

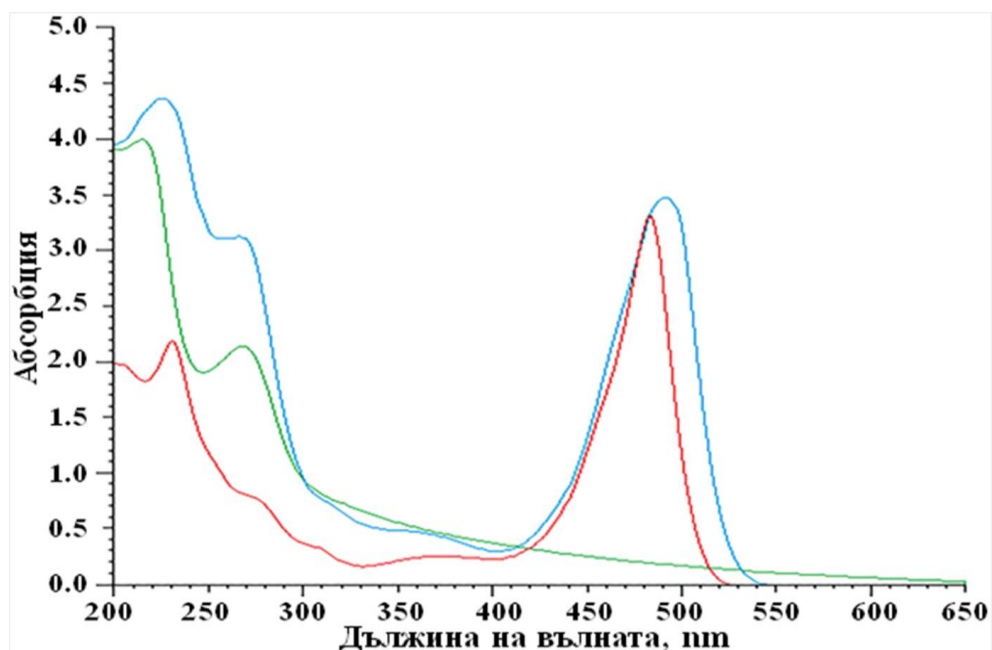
разделяне конюгатът има най-голяма молекулна маса и напуска първи хроматографската колона (**Фигура 21**). Конюгатът се открива в първия пик (фракция 6). Концентрацията на IgG (антитялото) в тази фракция е 1.12 mg/mL, а съотношението флуоресцентно багрило/антитяло (F/P) е 6.07, което осигурява добри флуоресцентни характеристики на конюгата.



Фиг. 21. Гел-филтрационна хроматограма на конюгат анти-еластаза антитяло – FITC. Абсорбция при 280 nm (▲) и 495 nm (■).

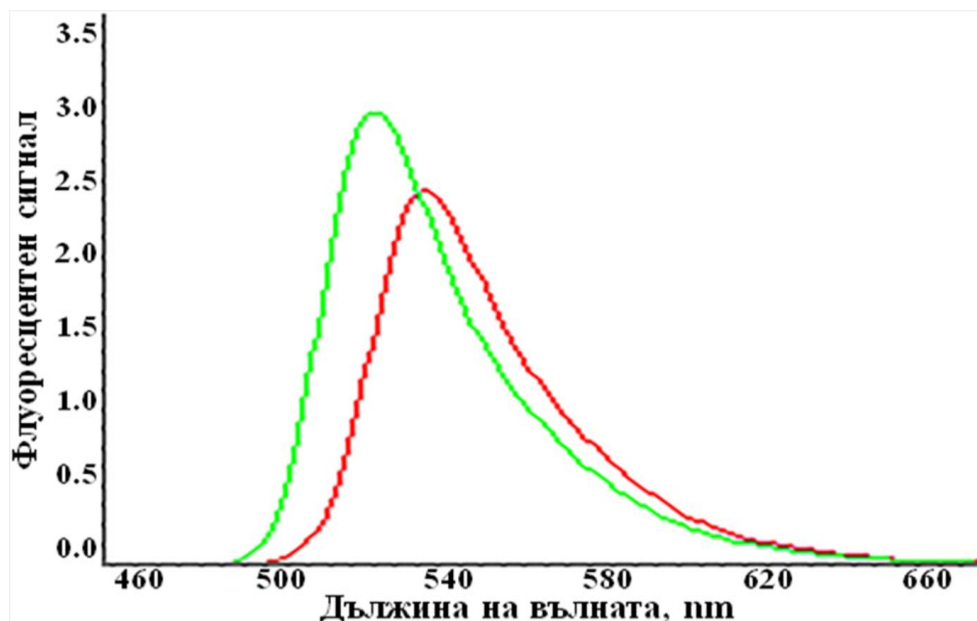
За доказване на свързването на антитялото с флуоресцентното багрило, се провеждат спектофотометрични анализи (UV-Vis и флуоресцентен) като получените спектри се сравняват с тези на несвързано анти-еластаза антитяло и свободен FITC.

На **Фигура 22** е представен UV-Vis спектофотометричен анализ на конюгата анти-еластаза антитяло – FITC, сравнен с анализа на чисто анти-еластаза антитяло и свободен FITC. От спектъра на конюгата се вижда, че той има два абсорбционни максимуми при 266 nm и 492 nm, които отговарят на характерните максимуми на антитялото (270 nm) и FITC (483 nm). Следователно, при конюгата се забелязват измествания на характеристичните пикове отговарящи на свободно антитяло и несвързан FITC, което се дължи на създадената връзка между тях.



Фиг. 22. UV-Vis спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – FITC (синьо), FITC (червено) и антитяло (зелено).

След проучване на абсорбционните свойства на получения конюгат анти-еластаза антитяло – FITC се изследват и флуоресцентните му свойства. За сравнение се използва свободен FITC. На **Фигура 23** е представен флуоресцентния анализ на конюгата. Забелязва се, че пикът на конюгата запазва формата присъща за свободен FITC, но се наблюдава изместване с ~ 12 nm (от 518 nm до 530 nm), дължащо се на конюгирането на компонентите.



Фиг. 23. Флуоресцентни спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – FITC (червено) и FITC (зелено).

Приготвят се конюгати на анти-еластаза антитяло и с други флуоресцентни маркери. Избрани са квантови точки поради високия флуоресцентен сигнал и добра стабилност при съхранение, които са описани в литературата.

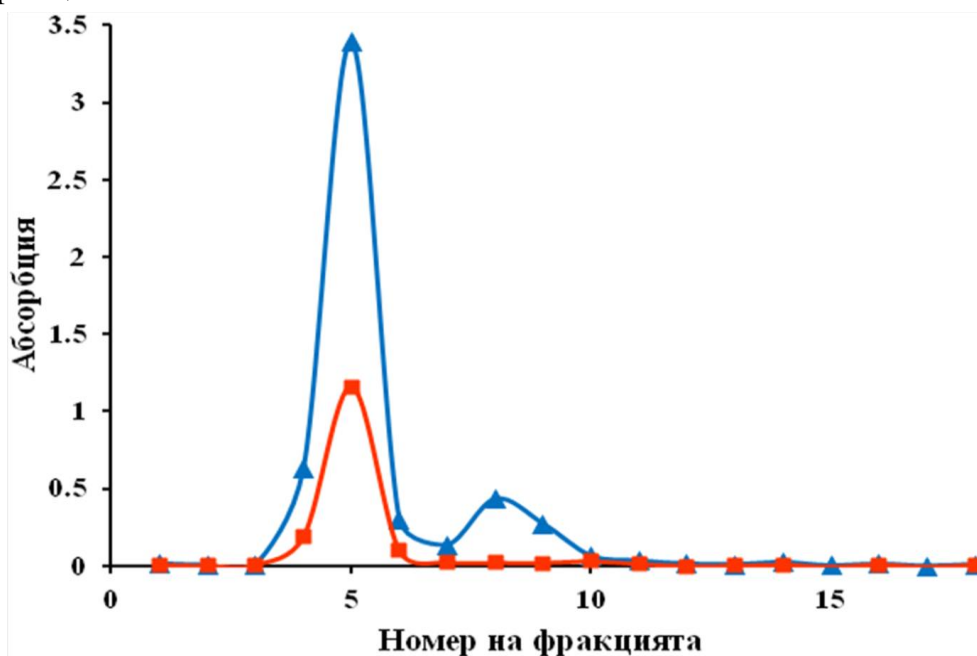
2.2.2. Получаване, пречистване и доказване на конюгат анти-еластаза антитяло – QD.

Хидрофилните Cadmium-Tellurium (CdTe) квантови точки (QD) имат карбоксилни групи на повърхността си. Те са биосъвместими, не са токсични и са подходящи за белязване на антитела за идентифициране на антиген. Свързването на квантовите точки към антителата се осъществява между карбоксилните групи на наночастиците и аминокислотните групи на антитялото чрез карбодиимидния метод. Карбодиимидът (EDC) е водоразтворим, лесно се премахва чрез промиване с вода и реакцията може да бъде извършена във физиологични разтвори, без да се добавят органични разтворители. Молекулите, съдържащи карбоксилни групи, могат да реагират директно с аминокислотните групи, с помощта на EDC. Активирането чрез EDC заменя негативния заряд на карбоксилните групи с положителен, което води до отблъскване на молекулите на протеина. Също така е установено, че карбодиимидните естери са нестабилни и не са способни бързо да реагират с аминокислотните групи, което води до хидролиза и регенериране на карбоксилните групи. Затова по-ефективно свързване се получава чрез добавянето на N-хидроксисукцинимид (NHS). Активиране със смес от EDC и NHS води до неутрализиране на негативния заряд, което увеличава ефективността и свързването на молекулите на протеина. Установено е, че активността на конюгат, получен само с EDC (0.6 AU), е по-ниска от активността на конюгат, получен с EDC и NHS (0.95 AU). Активността на двата конюгата е измерена чрез индиректен ELISA метод при еднакви условия. Именно затова, конюгатите на квантови точки (QD) се приготвят чрез първоначално активиране с EDC и NHS.

2.2.2.1. Анти-еластаза антитяло – QD 620 nm.

Свързването на анти-еластаза антитяло – QD 620 nm се извършва по описания карбодиимиден метод. Hezínová и колеги (2009) предлагат използването на антитяло да се добави в излишък, за да се гарантира оптимално свързване на компонентите и да се улесни пречистването на конюгата. При получаване на конюгат антитяло-QD ключова стъпка е

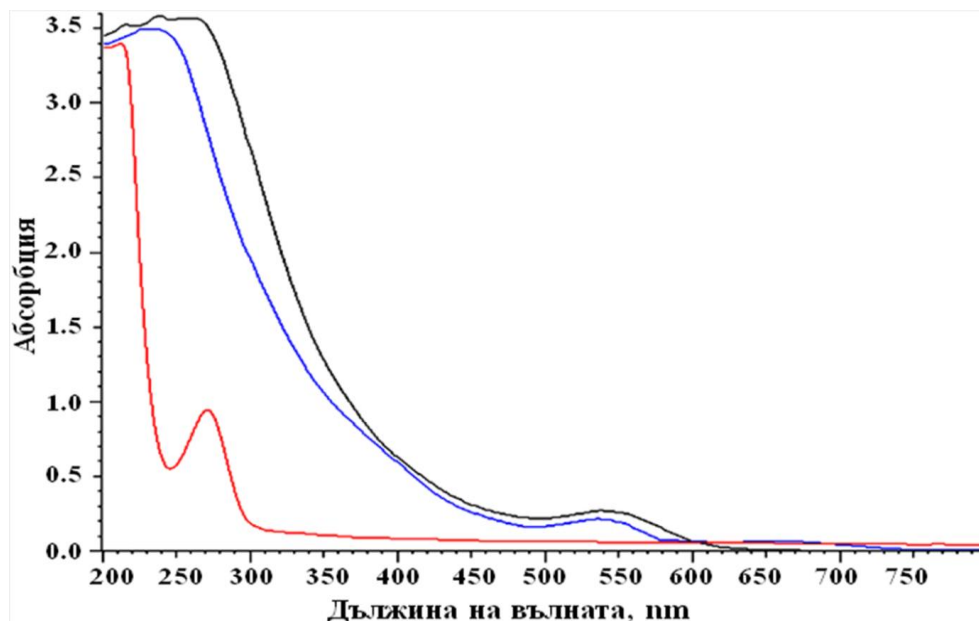
пречистването на конюгата, поради много по-голямата молекулна маса на квантовите точки, в сравнение с комерсиалните флуоресцентни багрила. Yun Xing и колеги (2007) предлагат използване на молекулно-ситова хроматография с пълнеж, способен да задържи големи молекули. На **Фигура 24** е представена хроматограма от гел-филтрация (Sephadex G25 Medium) на получения конюгат анти-еластаза антитяло – QD 620 nm. Конюгатът се намира във фракция 5, а излишъкът от антитяло се елуира като фракция 8.



Фиг. 24. Гел-филтрационна хроматограма на конюгат анти-еластаза антитяло – QDs 620 nm. Абсорбция при 280 nm (▲) и 360 nm (■).

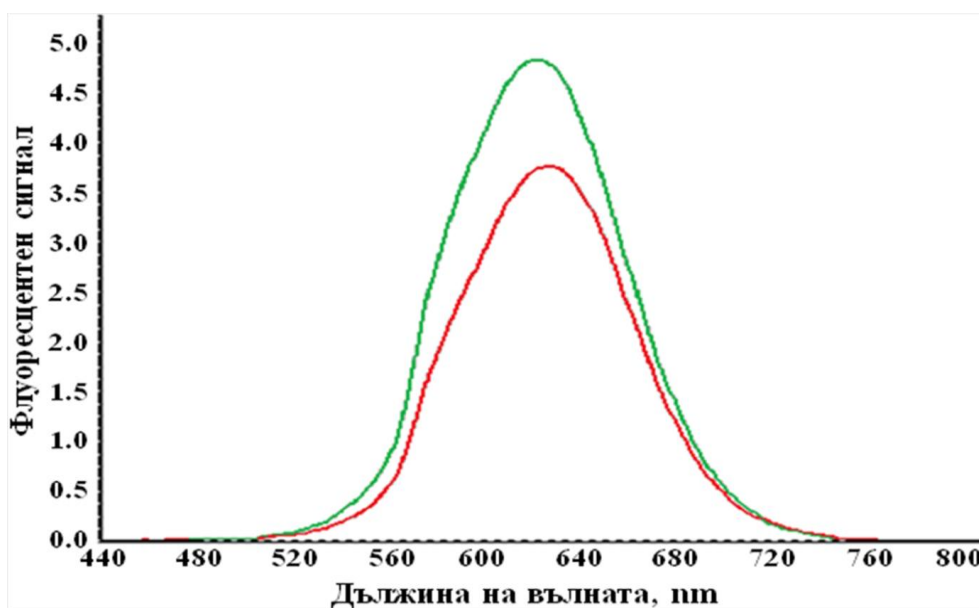
Изследват се спектралните характеристики на получения конюгат. При UV-Vis спектъра на конюгата (**Фигура 25**) се забелязва изместване на максимумите, присъщи за свободните квантови точки QD 620 nm и несвързаното антитяло, дължащо се на свързването на компонентите. Свободното анти-еластаза антитяло показва абсорбционен максимум при 270 nm, дължащ се на ароматните аминокиселини в съставлящата го полипептидна верига. Квантовите точки QD 620nm имат два абсорбционни максимума – при 250 nm и при 540 nm. Конюгатът анти-еластаза антитяло – QD 620 nm има широк максимум обединяващ характерните максимуми на антитялото при 270 nm и на QD 620 при 250 nm, поради свързването на компонентите. Също така се забелязва повишен абсорбционен сигнал на конюгата при 540 nm, който е характерен за QD 620nm и убедително

доказва образуването на конюгата. Това явление е забелязано и от други автори.



Фиг. 25. UV-Vis спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – QD 620 nm (черно), QD 620 nm (синьо) и антитяло (червено).

Конюгатът анти-еластаза антитяло – QD 620 nm се подлага и на флуоресцентен анализ (Фигура 26). Забелязва се, че след конюгирането на компонентите, формата на емисионният пик остава същата, каквато е на свободните квантови точки (QD 620 nm), но се наблюдава изместване на максимума с ~ 10 nm, дължащ се на връзката на QD 620 nm с анти-еластаза антитялото.

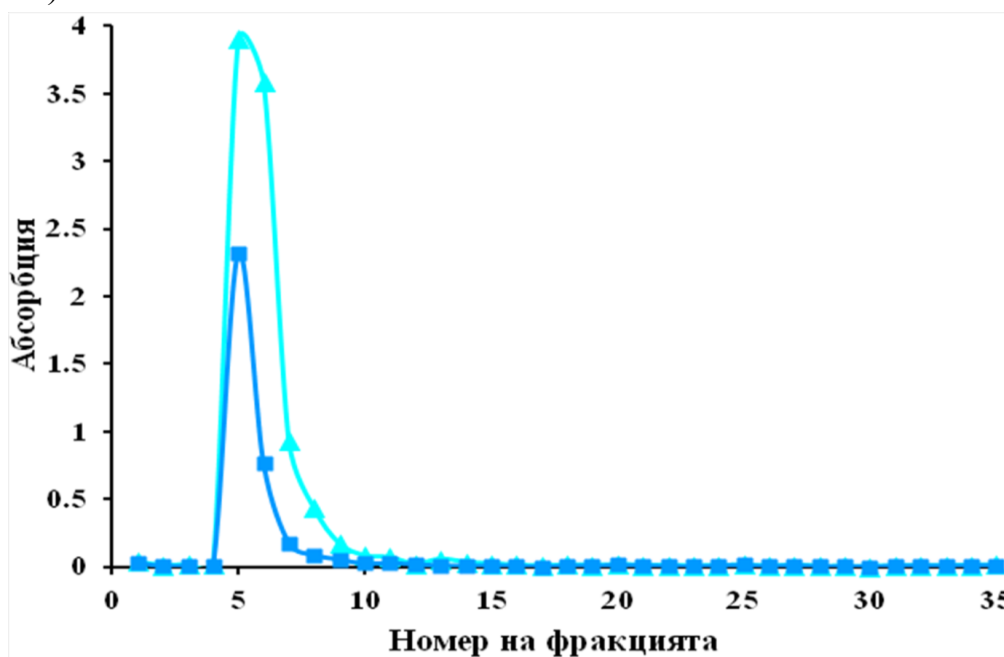


Фиг. 26. Флуоресцентни спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – QD 620 nm (червено) и QD 620 nm (зелено).

Полученият конюгат анти-елазаза антитяло – QD 620 nm осигурява оранжево-жълт флуоресцентен сигнал. За получаване на наситено червен флуоресцентен сигнал, се извършва конюгиране на антитялото с квантови точки с по-голям размер (QD 710 nm).

2.2.2.2. Анти-елазаза антитяло – QD 710 nm.

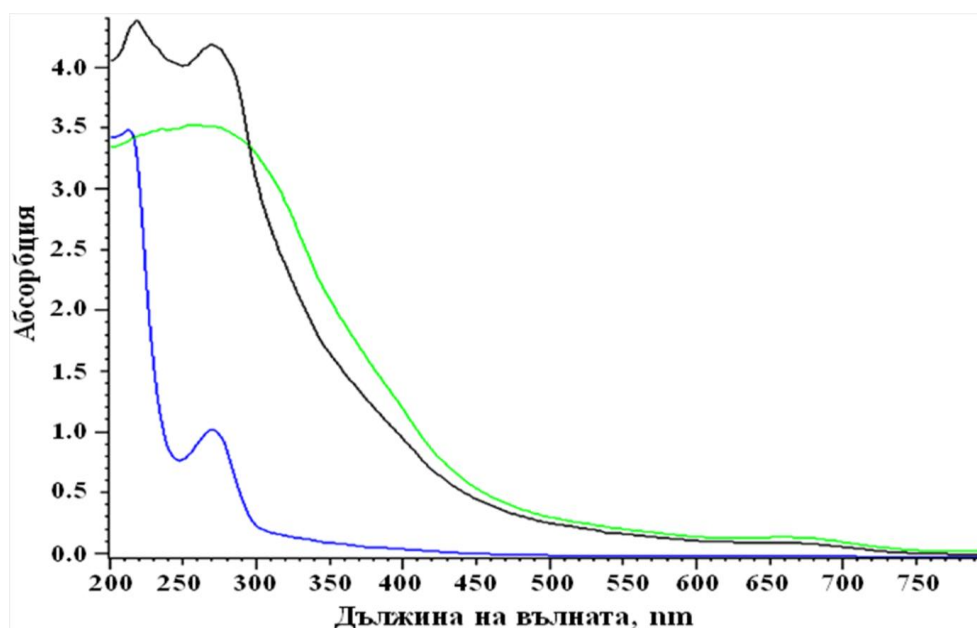
Получен е и пречистен конюгата анти-елазаза антитяло – QD 710 nm чрез гел-филтрация с пълнеж Sephadex G100 (Фигура 27). Конюгатът се намира във фракция 5. Оптимизирано е съотношението на QD и антитяло, за да се избегне загуба на несвързано антитяло (1 μ M QD 710 nm : 30 μ M антитяло).



Фиг. 27. Гел-филтрационна хроматограма на конюгат анти-елазаза антитяло – QD 710 nm. Абсорбция при 280 nm (▲) и 325 nm (■).

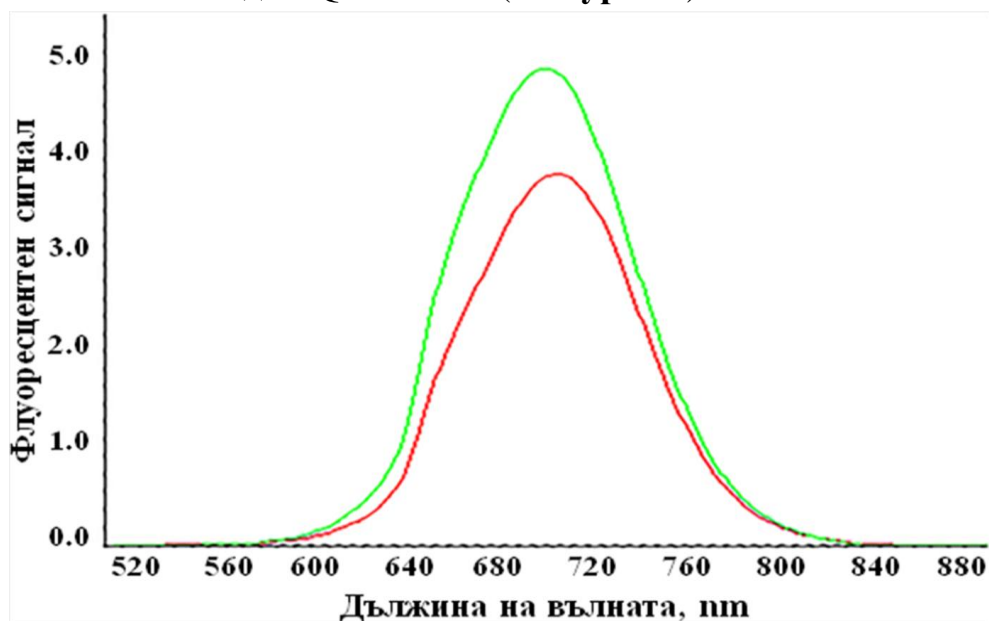
Абсорбционните спектри на получения конюгат, свободното антитяло и несвързани квантови точки (QD) са представени на Фигура 28. От абсорбционния спектър на конюгата се наблюдава запазване на характеристикния максимум за анти-елазаза антитялото (при ~ 270 nm). Прави впечатление, че формата на този максимум при конюгата се променя му, вероятно поради широкия абсорбционен максимум отговарящ на свободни QD 710 nm. Свободното анти-елазаза антитяло показва максимум и при 215 nm, дължащ се на алифатните аминокиселини в полипептидната верига, а при конюгатът той е изместен до 220 nm. При 670 nm дължина на вълната се забелязва завишаване на абсорбцията както

на конюгата, така и на свободните QD 710 nm, отговарящ на размера на CdTe-наноматериал. Това потвърждава успешното свързване на компонентите.



Фиг. 28. UV-Vis спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm (черно), QD 710 nm (зелено) и антитяло (синьо).

Свързването на компонентите в конюгата се анализира чрез сканиране на флуоресцентния сигнал на получения конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm и на свободни QD 710 nm (**Фигура 29**).



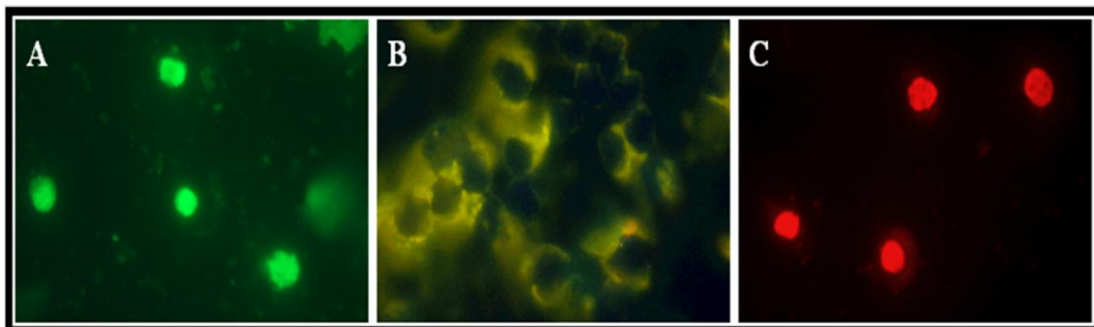
Фиг. 29. Флуоресцентни спектри на конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm (червено) и QD 710 nm (зелено).

При проведения анализ формата на пиковите е еднаква, но се забелязва изместване ~ 10 nm при пика на конюгата, сравнен с този на квантовите точки, което се дължи на свързването на анти-еластаза антитяло и QD 710 nm. Полученият конюгат има пик на възбуждане при 365 nm и на излъчване при 710 nm.

След получаването на флуоресцентните конюгати на анти-еластаза антитяло се пристъпва към разработване на имунофлуоресцентни методи за определяне на неутрофили от краве мляко и включването им в имунофлуоресцентни микроскопски анализи.

2.2. Валидиране на имунофлуоресцентен микроскопски анализ с флуоресцентно белязано анти-еластаза антитяло и прилагането му в реални проби

Флуоресцентно белязаните анти-еластаза антители, конюгирани с FITC, QD 620 nm и QD 710 nm, се използват за имунофлуоресцентен микроскопски анализ на неутрофили от кръв на крава, получени след разделяне на кръвни клетки с Ficoll. Сравнен е интензитета на емисията на флуоресцентните конюгати в реална среда, при използването на целеви клетки и флуоресцентен микроскоп. При използване на конюгата с FITC неутрофилните клетки се оцветяват в зелено (**Фигура 30 А**), конюгатът с QD 620 nm обогря клетките в оранжево-жълто (**Фигура 30 В**), а червено оцветяване се получава от конюгата с QD 710 nm (**Фигура 30 С**). Конюгатите анти-еластаза антитяло – FITC и анти-еластаза антитяло – QD 710 nm осигуряват ярко оцветяване на целевите клетки (неутрофилите) и сравнително малък фон, а анти-еластаза антитяло – QD 620 nm конюгата също оцветява неутрофилите, но получената фонова светлина е по-ярка. Затова, следващите анализи са извършени с анти-еластаза антитяло – FITC и анти-еластаза антитяло – QD 710 nm.



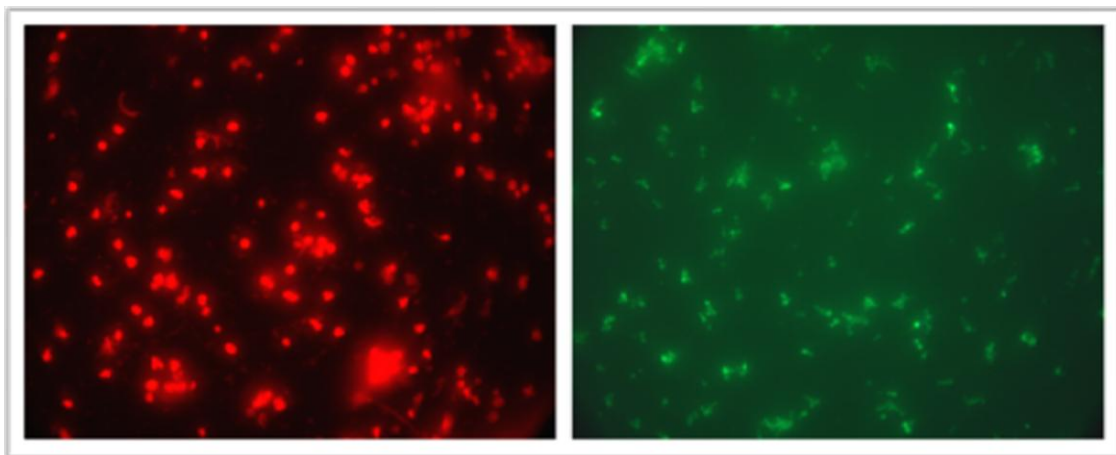
Фиг. 30. Неутрофили от кръв на крава, оцветени с анти-еластаза антитяло, свързано с FITC (A), QD 620 nm (B) и QD 710 nm (C).

Интересно бе да се види дали резултатите са подобни с неутрофили от краве мляко. Извършва се имунофлуоресцентен микроскопски анализ на изолирани неутрофили от краве мляко чрез Ficoll. Сравняват се резултатите с конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm и тези с конюгата анти-еластаза антитяло – FITC (**Фигура 31**). Забелязва се, че при използване на конюгата с QD 710 nm млечните неутрофили са оцветени ярко в червено, а с FITC-конюгата се получава по-слабо оцветяване в зелено. Това прави конюгата анти-еластаза антитяло – QDs 710 nm по-ефективен за яркото визуализиране на неутрофили от краве мляко.



Фиг. 31. Неутрофили от краве мляко, оцветени в червено от конюгата анти-еластаза антитяло – QDs 710 nm и в зелено от конюгата анти-еластаза антитяло – FITC.

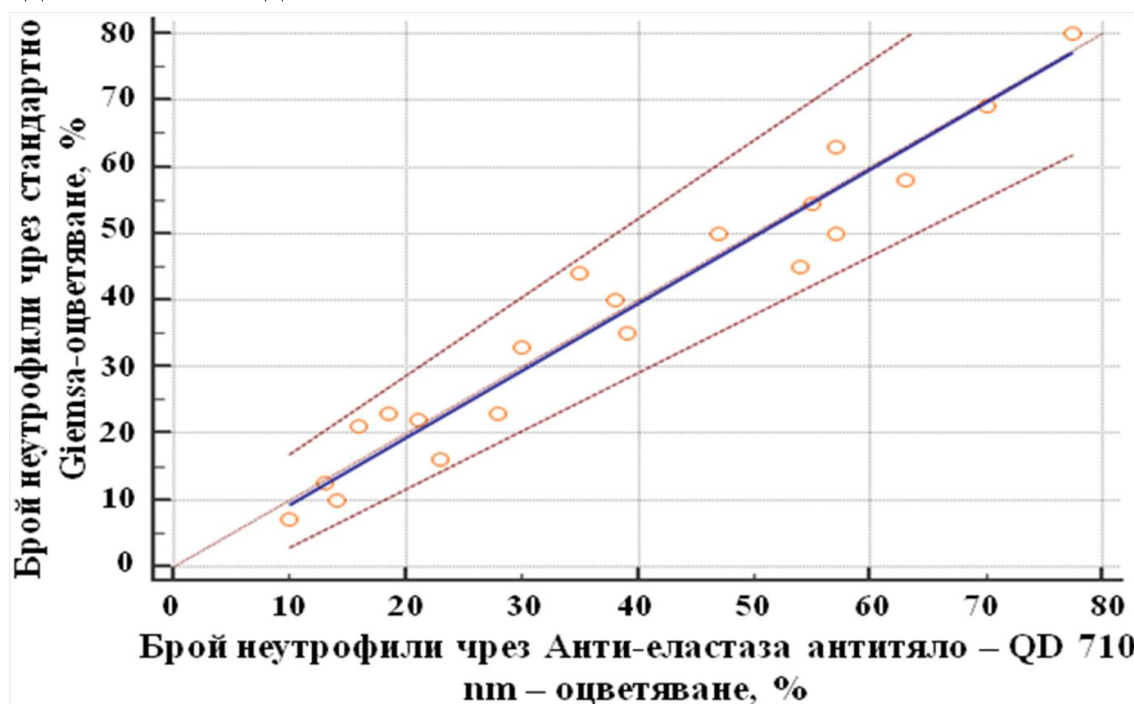
Конюгатите са приложени за имунофлуоресцентен микроскопски анализ на соматични клетки в мляко (**Фигура 32**). Отново конюгатът анти-еластаза антитяло – QD 710 nm показва по-интензивно оцветяване на клетките, а фонът е значително по-слаб. Това го прави по-подходящ за реални проби от мляко.



Фиг. 32. Соматични клетки в краве мляко, оцветени в червено от конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm и в зелено от конюгат анти-еластаза антитяло – FITC.

Представените резултати показват предимствата на конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm пред тези на анти-еластаза антитяло – FITC.

Поради по-добрите флуоресцентни характеристики на конюгата анти-еластаза антитяло – QD 710 nm, с него се извършва сравнение на създадения имунофлуоресцентен микроскопски анализ с традиционен Giemsa-метод за определяне процента неутрофили в реална млечна проба. Концентрацията на неутрофилни клетки в мляко се варира от 7 – 80%. (Фигура 33). Получава се корелационен коефициент 0.957, изчислен чрез програма MedCalc, Passing-Bablok regression, който показва добра корелация между двата метода и потвърждава достоверността на предложения метод.



Фиг. 33. Корелация на резултатите, получени от броенето на неутрофилни клетки в мляко с изработения имунофлуоресцентен микроскопски метод (с анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) и стандартен Giemsa-метод.

След като е доказана добрата корелация на разработения метод с комерсиален метод, конюгатът анти-еластаза антитяло – QD 710 nm се използва за определяне процентното съдържание на неутрофилите, спрямо общия брой на соматичните клетки (ОБСК) в реални проби мляко (Таблица 5). ОБСК в пробите мляко се определя чрез брояча за клетки на фирма Милкотроник ООД.

Таблица 5. ОБСК и брой на неутрофилите в реални проби от краве мляко, изследвани с конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm.

Номер на пробата	ОБСК, x 1000 cells/mL	Брой неутрофили, x 1000 cells/mL	Брой неутрофили, %	Стандартно отклонение, Брой неутрофили, x 1000 cells/mL
1	420	285	68	10.737
2	800	686	86	42.363
3	150	33	22	2.074
4	500	390	78	20.100

Резултатите за процентът неутрофили спрямо ОБСК в мляко са близки с тези описани по-рано с конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC. При анализ на нормално мляко (ОБСК 150 000 cells/mL) неутрофилите са 22%, а в маститно мляко (ОБСК 500 000 cells/mL) представляват 78% от всички клетки. Това драстично увеличаване на количеството неутрофили при наличие на инфекция, е забелязано и от други автори. Някои автори докладват съдържание на неутрофилни клетки до 95% в маститни млека. Schwarz и колеktiv (2011) установяват, че неутрофилите представляват 0% при ОБСК 1 000 cells/mL. При ОБСК 1 824 000 cells/mL в мляко с установено заразяване със *Staphylococcus aureus*, неутрофилите стигат до 86%. При наличие на *Escherichia coli* във вимето и ОБСК 967 000 cells/mL са открити 85% неутрофили. Заключение на всички споменати автори до момента, е че при наличие на инфекция количеството на неутрофилите се увеличава драстично. Това прави предложеният конюгат анти-еластаза антитяло – QD 710 nm, а също и анти-неутрофил антитяло – FITC, необходими средства за определяне здравословния статус на кравата.

3. Сравнение на имунофлуоресцентните микроскопски анализи с анти-неутрофил антитяло и анти-еластаза антитяло.

Изследваните антители (анти-неутрофил антитяло и анти-еластаза антитяло) се използват за определяне на неутрофили в кръв и мляко на крава. При използването на индиректен ELISA метод анти-неутрофил антитялото показва висока активност и специфичност с кръвни неутрофили (при 2 000 cells/mL – 0.40 AU, а при 2 000 000 cells/mL – 1.00 AU) и много ниска крос-реактивност с моноклеарни клетки от кръв (при 2 000 cells/mL – 0.00 AU, а при 2 000 000 cells/mL – 0.15 AU). Анти-

еластаза антитялото при същия анализ показва малко по-ниски стойности с кръвни неутрофили (при 2 000 cells/mL – 0.38 AU, а при 2 000 000 cells/mL – 0.78 AU) и с мононуклеарни клетки от кръв (при 20 000 cells/mL – 0.00 AU, а при 2 000 000 cells/mL – 0.15 AU). При анализ на неутрофили от краве мляко резултатите са аналогични.

Анти-еластаза антитялото и неговите конюгати имат по-нисък сигнал при ELISA и микроскопски методи, което най-вероятно се дължи на факта, че еластазата се намира в азурофилните гранули на неутрофилите. Това води до затруднено осъществяване на имунологичната реакция антиген-антитяло, независимо че клетъчните стени на соматичните клетки са пропускливи под действието на Triton X-100. При анализи с анти-неутрофил антитялото и неговите конюгати се осъществява свързване на антитялото с епитопи по повърхността на неутрофилната клетка. Реакцията антиген-антитяло не е затруднена, както се наблюдава при анти-еластаза антитялото.

Доказано е, че имунофлуоресцентните микроскопски анализи на кръвни клетки с получените флуоресцентно белязани антителата (анти-неутрофил антитяло – FITC, анти-еластаза антитяло – FITC, анти-еластаза антитяло – QD 620 nm, анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) са селективни - оцветяват се само неутрофилите и не се отчита крос-реактивност с мононуклеарните клетки. При анализ на разделени чрез Ficoll соматични клетки от мляко се забелязва същата селективност на оцветяване.

Разработените имунофлуоресцентни микроскопски анализи (с анти-неутрофил антитяло – FITC и с анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) успешно се използват за определяне на неутрофили в мляко. При проучените проби се установява линеен интервал от 20 000 до 1 000 000 cells/mL общ брой соматични клетки (ОБСК) и при двата метода. Експериментите с по-малко количество клетки затрудняват анализа поради наличието на недостатъчно клетки в зрително поле на микроскопа и се получава голям коефициент на вариация. При млека с ОБСК повече от 1 000 000 cells/mL изчисленото стандартно отклонение също се увеличава поради гъстотата на клетките, присъстващи на зрително поле. Клетките се групират и това затруднява преброяването им. Установеният линеен интервал включва легалния праг за прием на мляко в редица страни, сред които България (400 000 cells/mL), Германия (100 000 cells/mL), Канада (500 000 cells/mL) и САЩ (750 000 cells/mL).

Използването на конюгата анти-неутрофил антитяло – FITC изглежда по-перспективно, поради възможността за двуцветен анализ чрез добавянето на пропидиев йодид (PI). Използването на анти-еластаза антитяло – QD 710 nm, е ограничено само за определяне на неутрофилните клетки, без ОБСК, тъй като при маститно мляко част от еластазата излиза извън разкъсаните клетки и ще се получат занижени резултати. Съчетанието на PI, който оцветява всички СК в червено, с конюгатът анти-неутрофил антитяло – FITC със зелена емисия, който се свързва само с неутрофилите, осигуряват едновременно определяне на ОБСК и процентът неутрофили. По този начин с по-голяма достоверност може да се установи ранен възпалителен процес на млечната жлеза и да се вземат мерки навреме за лекуване на животните.

До сега за определяне на количеството неутрофили в млякото основно се предлага използването на поточна цитометрия. В Таблица 6 са представени техните резултати.

Таблица 6. Резултати от други авори (с поточна цитометрия) за неутрофили (%) спрямо ОБСК (с определени стандартни отклонения на резултатите).

Източници	Здрава млечна жлеза	Неутрофили, %	Заразена млечна жлеза	Неутрофили, %
Wever & Emanuelson (1989)	ОБСК < 100 000 cells/mL	32 ± 11	ОБСК > 800 000 cells/mL	49 ± 16
Östensson (1993)	ОБСК < 100 000 cells/mL	20 ± 10	След инжектиране на ендотоксин	78 ± 5
Leitner et al. (2000)	ОБСК < 100 000 cells/mL	28 ± 3	Инфектиране с <i>Str. dysgalactie</i> ; ОБСК > 600 000 cells/mL	73 ± 6
Dosogne et al. (2003)	ОБСК < 200 000 cells/mL	28 ± 2	-	-

На практика обаче по-точната цитометрия не е подходящ за измерване на соматични клетки в мляко, тъй като апаратурата е сложна, скъпа и изисква обучен специалист. Така разработените от нас методи предлагат

много добра алтернатива, тъй като получените резултати са сравними с вече използваните и разработени методи от други автори.

За провеждане на непрекъснат анализ и контрол на соматични клетки в мляко са необходими преносими прости апарати с лесно обслужване и ниска цена. Такива възможности може да осигури имунофлуоресцентния микроскопски метод, който лесно може да бъде съчетан с портативен флуоресцентен цитометър. Разработените от нас имунофлуоресцентни методи ще бъдат приложени към произведания от фирма Милкотроник брояч на клетки Lactoscan SCC, който е преносим и лесно се обслужва (Фигура 34).



Фиг. 34. Имунофлуоресцентен брояч на клетки Lactoscan SCC.

Прилагането на разработените имунофлуоресцентни микроскопски анализи за определяне на неутрофили в краве мляко, на базата на анти-неутрофили антитяло и анти-еластаза антитяло ще осигури бързо и навременно лечение на животното и ще бъдат избегнати големи икономически загуби. Разработването на едновременен имунофлуоресцентен микроскопски анализ на соматични клетки и неутрофили в една и съща проба ще позволи да се прави по-точна и категорична диагностика на мастита. Тези методи с успех могат да бъдат използвани за диагностика на мастит в ранен стадий и проследяване на здравословния статус на вимето на кравата.

ИЗВОДИ

- 1) Изолирани са неутрофили от кръв и мляко на крава чрез използване на водоразтворими полимери (PVP, Декстран, Ficoll). Най-добри реагенти за изолиране на неутрофили са PVP (90% чисти неутрофили) и Ficoll (97% чисти неутрофили).
- 2) Изолирана е неутрофилна еластаза от кръв и мляко на крава и е доказана чрез HPLC и ензим-субстратна цветна реакция.
- 3) Получени са овчи поликлонални антитела срещу неутрофили и неутрофилна еластаза на крава с висок серумен титър (31 250 пъти разреждане).
- 4) Определена е чувствителността на полученото анти-неутрофил антитяло – граница на откриване 5 $\mu\text{g/mL}$ неутрофилни фрагменти и линейния интервал на измерване на неутрофили в кръв (от 2 000 до 2 000 000 cells/mL неутрофили) и в мляко на крава (от 20 000 до 2 000 000 cells/mL).
- 5) Изследвана е чувствителността на полученото анти-еластаза антитяло – граница на откриване 1 $\mu\text{g/mL}$ неутрофилна еластаза и линейния интервал на измерване на неутрофили в кръв (от 2 000 до 2 000 000 cells/mL неутрофили) и в мляко на крава (от 20 000 до 2 000 000 cells/mL).
- 6) Доказано е, че активността на анти-неутрофил антитяло и на анти-еластаза антитяло спрямо съответно, неутрофили и неутрофилна еластаза е 100%, а крос-реактивността спрямо мононуклеарните клетки е незначителна.
- 7) Получени са и пречистени конюгати на антителата (анти-неутрофил антитяло и анти-еластаза антитяло) с флуорохроми (FITC, QD 620 nm, QD 710 nm) и са доказани чрез UV-Vis и флуоресцентна спектрофотометрия.
- 8) Разработени са имунофлуоресцентни микроскопски анализи с получените конюгати (анти-неутрофил антитяло – FITC и анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) за определяне на неутрофили при различни количества соматични клетки в краве мляко, с линеен интервал от 20 000 до 1 000 000 cells/mL ОБСК.
- 9) Доказани са над 68% неутрофили при соматични клетки – 400 000 cells/mL (легалният праг за България) и над 50% неутрофили при

млека с ОБСК под легалния праг, индикиращи наличие на инфекция на млечната жлеза.

- 10) Получените имунофлуоресцентни микроскопски анализи (с анти-неутрофил антитяло – FITC и анти-еластаза антитяло – QD 710 nm) за определяне на неутрофили в краве мляко са валидирани и сравнени със стандартен Giemsa-микроскопски метод и показват корелационни коефициенти над 0.957.
- 11) Изработен е имунофлуоресцентен микроскопски анализ за едновременно определяне на общ брой соматични клетки (с PI) и количество неутрофили (с получения конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC) в краве мляко.

НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ ПРИНОСИ

1. Изолирана е неутрофилна еластаза от маститно краве мляко.
2. Получени са овчи поликлонални антитела срещу неутрофили и неутрофилна еластаза на крава.
3. Получен е флуоресцентен конюгат с флуоресцеин изотиоцианат на анти-неутрофил антитяло, специфично към неутрофили на крава.
4. Получени са флуоресцентни конюгати с флуоресцеин изотиоцианат и квантови точки на анти-еластаза антитяло, специфично към неутрофилни клетки и неутрофилна еластаза на крава.
5. Разработен е имунофлуоресцентен метод за определяне на количеството неутрофили в кръв и мляко на крава с получените конюгати (анти-неутрофил антитяло – FITC, анти-еластаза антитяло – FITC, анти-еластаза антитяло – QD).
6. Разработен е имунофлуоресцентен микроскопски метод за едновременно определяне на общ брой соматични клетки (с пропидиев йодид) и количество неутрофили (с конюгат анти-неутрофил антитяло – FITC) в краве мляко.

СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА

1. Becheva Z. & T. Godjevargova (2015) Influence of five different methods for blood neutrophil separation. НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ, том 54, серия 10.2, 59-63.
2. Becheva Z. & T. Godjevargova (2015) A rapid method for determination of somatic cell count and isolation of neutrophil elastase from bovine milk. НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ, том 54, серия 10.2, 15-18.
3. Becheva Z., K. Gabrovska & T. Godjevargova (2016) Fluorescent microscopic analysis of bovine blood neutrophils by QDs labeled anti-bovine neutrophil elastase antibody. НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ, том 55, серия 10.2, 83-88.
4. Becheva Z. & T. Godjevargova (2017) Preparation of anti-elastase antibody conjugated with quantum dots 710 nm and fluorescein isothiocyanate for immunoassay of milk somatic cells. Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology, 6:3. (*Impact factor: 1.06*)
5. Becheva Z., K. Gabrovska & T. Godjevargova (2017) Immunofluorescence microscope assay of neutrophils and somatic cells in bovine milk. Food and Agricultural Immunology, 28:6, 1196-1210. (*Impact factor: 1.392*)

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Научна конференция с международно участие на Русенски университет “Ангел Кънчев“ – филиал Разград, 2015 г.
2. Научна конференция с международно участие на Русенски университет “Ангел Кънчев“ – филиал Разград, 2016 г.
3. RICCSSE 2017 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering - 6-9 September 2017, Poiana Brasov, Romania.

**Списък на фигурите и таблиците, включени в Автореферата и тяхната
номерация в Дисертацията**

Номер на фигурата в Автореферата	Номер на фигурата в Дисертацията
Фигура 1	Фигура 13
Фигура 2	Фигура 15
Фигура 3	Фигура 16
Фигура 4	Фигура 17
Фигура 5	Фигура 18
Фигура 6	Фигура 19
Фигура 7	Фигура 20
Фигура 8	Фигура 21
Фигура 9	Фигура 22
Фигура 10	Фигура 23
Фигура 11	Фигура 24
Фигура 12	Фигура 25
Фигура 13	Фигура 26
Фигура 14	Фигура 27
Фигура 15	Фигура 28
Фигура 16	Фигура 29
Фигура 17	Фигура 30
Фигура 18	Фигура 31
Фигура 19	Фигура 32
Фигура 20	Фигура 33
Фигура 21	Фигура 34
Фигура 22	Фигура 35
Фигура 23	Фигура 36
Фигура 24	Фигура 37
Фигура 25	Фигура 38
Фигура 25	Фигура 39
Фигура 27	Фигура 40
Фигура 28	Фигура 41
Фигура 29	Фигура 42
Фигура 30	Фигура 43
Фигура 31	Фигура 44
Фигура 32	Фигура 46
Фигура 33	Фигура 47
Фигура 34	Фигура 49

Номер на таблицата в Автореферата	Номер на таблицата в Дисертацията
Таблица 1	Таблица 6
Таблица 2	Таблица 7
Таблица 3	Таблица 8
Таблица 4	Таблица 9
Таблица 5	Таблица 10
Таблица 6	Таблица 11