

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

**11. NAUČNI SIMPOZIJUM
REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA**

ZBORNİK PREDAVANJA

08 - 11. oktobar 2020.

11. NAUČNI SIMPOZIJUM „REPRODUKCIJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA“
XI SCIENTIFIC SYMPOSIUM „REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS“

– Zbornik radova / *Proceedings* –

Organizatori / *Organized by*

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade

Dekan Fakulteta veterinarske medicine
Dean of the Faculty of Veterinary Medicine
Prof. dr Vlado Teodorović

Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje
Department of Reproduction, Fertility and Artificial Insemination

Uz podršku / *Supported by*
Veterinarska komora Srbije / *Veterinary Chamber of Serbia*

Predsednik / *Chairmen*

Prof. dr Slobodanka Vakanjac

Sekretar / *Secretary*

Prof. dr Dragan Gvozdić

Organizacioni odbor / *Organizing Committee*

Prof. dr Dragan Šefer, dr sc. Željko Sladojević, prof. dr Milenko Šarić,
prof. dr Miloš Petrović, prof. dr Marko Samardžija, mr sc. Saša Bošković,
dr sc. Dobrila Jakić-Dimić, prof. dr Sava Lazić, dr sc. Zoran Rašić,
dr sc. Goran Jakovljević, Maja Gabrić

Naučni odbor / *Scientific Committee*

Prof. dr Miloš Pavlović, predsednik,
prof. dr Danijela Kirovski, doc. dr Vladimir Magaš,
prof. dr Toni Dovenski, prof. dr Otto Szenci, prof. dr Opsomer Geert

Sekretarijat / *Secretariat*

Prof. dr Dragan Gvozdić, Maja Gabrić

Odgovorni urednik / *Editor in Chief*

Prof. dr Miodrag Lazarević

Grafički dizajn i izrada korica / *Cover design*

Prof. dr Ivan B Jovanović

Tehnički urednik / *Technical Editor*

Gordana Lazarević

Izdavač / *Publisher*

Fakultet veterinarske medicine, Beograd
Centar za izdavačku delatnost i promet učila

Štampa / *Printing*

Naučna KMD, Beograd

Tiraž: 450 primeraka

ISBN 978-86-80446-37-0

SADRŽAJ

PLENARNI REFERATI

1. **Aleksić Jelena, Kirovski Danijela, Stojanac Nenad, Svetlana Nedić, Vakanjac Slobodanka:**
Savremene tehnike u animalnoj reprodukciji u svetlu važećih propisa
The innovative techniques in animal reproduction in the scope of current regulations 3
2. **Nenadović Katarina:**
Uticaj odnosa čoveka prema farmskim životinjama na dobrobit i reprodukciju
Human animal relationship and effect on welfare and reproduction 13
3. **Lojkić Martina, Karadjole Tugomir, Bačić Goran, Samardžija Marko, Prvanović Babić Nikica, Butković Ivan, Šavorić, Juraj, Getz Iva, Folnožić Ivan, Špoljarić Branimira, Maćešić Nino:**
Ocjena sjemena psa
Semen evaluation in dogs 21
4. **Maćešić Nino, Bačić Goran, Karadjole Tugomir, Samardžija Marko, Prvanović Babić Nikica, Vince Silvijo, Efendić Maša, Butković Ivan, Šavorić Juraj, Lojkić Martina:**
Endoskopsko osjemenjivanje kuja
Endoscopic artificial insemination of bitch 33
5. **Magaš Vladimir, Stanišić Ljubodrag, Vakanjac Slobodanka, Nedić Svetlana:**
Terapija kompleksa cistična endometrijalna hiperplazija – piometra
Therapy of CEH-P complex 43
6. **Ntallaris Theodoros, Dupont Joelle, Humblot Patrice:**
Effects on energy balance and breed on dairy cows reproductive efficiency
Uticaj energetskeg bilansa i rase na reprodukciju visoko mlečnih krava 53
7. **Otavă Gabriel, Mircu Calin, Marc Simona, Torda Iuliu, Hutu Ioan:**
Oestrus synchronization in nulliparous yearling Assaf breed ewes with progestin impregnated intravaginal sponges
Sinhronizacija estrusa kod ovaca šilježica rase Asafi primenom intravaginalnih sunđera impreginarnih progestinom 83

| | |
|---|-----|
| 8. Maletić Milan, Pavlović Miloš, Đurić Miloje: Toplotni stres kao faktor rizika u reprodukciji visoko mlečnih krava <i>Heat stress as a risk factor in the reproduction of high yielding dairy cows</i> | 97 |
| 9. Mrkun Janko: MOET in cows: most common problems that we are facing with <i>MOET kod krava: najčešći problemi sa kojima se suočavamo</i> | 105 |
| 10. Zakošek Pipan Maja: ART in small animals – how far are we? <i>ART kod malih životinja – dokle smo stigli?</i> | 119 |
| 11. Šterbenc Nataša: Practical applications of single layer centrifugation as a sperm selection technique for improving reproductive efficiency <i>Praktična primena jednoslojnog centrifugiranja kao tehnika selekcije sperme za poboljšanje reproduktivne efikasnosti</i> | 131 |
| 12. Fratrić Natalija, Gvozdić Dragan: Imunologija sperme – poseban osvrt na goveda <i>Immunology of semen – special reference to cattle</i> | 145 |
| 13. Stančić Ivan, Vakanjac Slobodanka, Apić Jelena, Zdraveski Igor, Galić Ivan: Proteini spermalne plazme kod nerastova kao selekcijski marker <i>Boars seminal plasma proteins as a selection marker</i> | 157 |
| 14. Stojković Miodrag: Preimplantacioni embrioni, matične ćelije i bioinformatika – platforma za utvrđivanje porekla bolesti <i>Engleski</i> | 167 |
| KRATKA SAOPŠTENJA | |
| 15. Radovanović Savić Radoslava, Zdravković Nemanja, Furdek Aleksandar, Rajić Savić Nataša: Stvaranje biofilma – mehanizam preživljavanja uzročnika mastitisa <i>Biofilm formation – survival mechanism of mastitis causative agents</i> | 177 |
| 16. Bojkovski Jovan, Prodanov - Radulović Jasna, Vakanjac Slobodanka, Becskei Zsolt, Zdravković Nemanja, Stanišić Ljubodrag, Đurić Miloje, Nedić Svetlana, Dobrosavljević Ivan, Maletić Jelena: Najčešći propusti u obezbeđivanju biosigurnosti na farmi svinja <i>The most common failures in providing biosecurity on a pig farm</i> | 185 |
| INDEKS AUTORA | 197 |

**IMUNOLOGIJA SPERME – POSEBAN OSVRT NA GOVEDA****IMMUNOLOGY OF SEMEN – SPECIAL REFERENCE TO CATTLE****Fratrić Natalija, Gvozdić Dragan***Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija**Kratak sadržaj*

Imunski sistem igra važnu ulogu u fertilizaciji, uspostavljanju i održavanju graviditeta. Imunski mehanizmi semenika opremljeni su fizičkom i imunskom zaštitom antigena spermatozoida (autoantigena) od imunskog sistema domaćina kao i mehanizmima za suzbijanje mikrobijalnih patogena. U pubertetu kada je već uspostavljena imunska kompetentnost, germinativne – polne ćelije završavaju svoj prvi ciklus dok se diferenciraju u zrele spermatozoide. U ovom periodu se sintetiše niz novih površinskih molekula koji se zajedno sa spermatozoidima u razvoju (autoantigenima) "predstavljaju" imunskom sistemu. Prisustvo fizičke krv – testis barijere čini da su testisi sisara imunološki privilegovano mesto koje štiti autoantigene polnih ćelija od sistemskog imunskog odgovora. Lokalni imunomodulatori kao što su makrofagi, ćelije prirodne ubice (engl. natural killer, NK), dendritične ćelije, mastociti i T limfociti ne aktiviraju imunsku reakciju odbacivanja i na taj način omogućavaju spermatozoidima da izbegnu napad imunskog sistema (lokalna imunosupresivna sredina).

Ključne reči: imunitet, oplodnja, semena plazma, spermatozoidi

Summary

The immune system plays a critical role in fertilization, the establishment and maintenance of pregnancy. Immune mechanisms of testes represent physical and immunological protection of spermatozoal autoantigens from a host immune response and also to counteract invading microbial pathogens. At puberty, when immune competence is already established, germ cells complete their first spermatogenic cycle as they differentiate into mature spermatozoa. In this period, new surface molecules are synthesized, and along with the developing spermatozoa (autoantigens) are presented to the immune system. The presence of the physical blood testis barrier makes the mammalian testes an immunologically privileged place, protecting the autoantigenic germ cells from systemic immune response. Local immune modulators such as macrophages, natural killer cells,

dendritic cells, mast cells, and T lymphocytes do not activate immune rejection, thus allowing spermatozoa to escape immune attack (local immunosuppressive environment).

Key words: fertilization, immunity, seminal plasma, spermatozoa

Imunski sistem

Imunski sistem se sastoji iz dve komponente: nespecifičnog imunskog sistema koji uključuje nespecifične mehanizme za zaštitu domaćina od infekcije i specifičnog imunskog sistema koji prepoznaje i odgovara na specifične antigene preko visoko polimorfnih molekula tkivne histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) i širokog repertoara imunoglobulina (Zhao i sar., 2014; Hurley, 2015).

Nespecifični imunski sistem koristi brojne ćelije (fagocite, NK ćelije i dr.), molekule (defenzini i komplement) i receptore (engl. *Toll-like receptors*, TLR) da prepozna molekulske karakteristike patogena u cilju njihovog uklanjanja. Defenzini su široko rasprostranjena klasa antimikrobijalnih proteina i igraju bitnu ulogu u zaštiti od bakterija i gljivica. Interesantno je da su β -defenzini eksprimirani i u epididimisu i u ženskom reproduktivnom traktu (Horne i sar., 2008). Druga važna komponenta imunskog sistema je sistem komplementa koji se sastoji od velikog broja specifičnih proteina i njihovih proteolitičkih proizvoda, koji cirkulišu u krvi i često predstavljaju prvu liniju odbrane organizma. Oni čine oko 5% globulinske frakcije krvnog seruma i uključuju brojne male molekule proteina koji normalno cirkulišu kao inaktivni prekursori. Dva glavna puta aktivacije komplementa su: klasični, koji prepoznaje i aktivira se u odgovoru na antigen-antitelo kompleks i alternativni put, koji se aktivira putem C3b proteina komplementa koji se vezuje za površinu mikroba i molekule antitela. Ishod svakog od puteva aktivacije može biti: pokretanje zapaljenskog procesa, oslobađanje hemoatraktanata koji privlače fagocite na mesto infekcije, podsticanje vezivanja i prepoznavanja antigena (opsonizacija) i pokretanje liziranja bakterije-antigena (Sarma i Ward, 2011).

Brojni proteini komplementa su uključeni u imunski odgovor, a među njima su primarni aktivatori: C3 komponenta komplementa i njeni proteolitički proizvodi (C3a i C3b) nastali delovanjem C3 konvertaze; C5 komponenta komplementa i njeni proteolitički proizvodi (C5a i C5b). Komponenta C5a je važan hemotaktički protein koji ima ulogu u privlačenju i aktivaciji mastocita. Komponente C5a i C3a imaju anafilaktičku aktivnost izazivajući degranulaciju mastocita. Komponenta C5b pokreće put stvaranja (engl. *membrane attack pathway*) koji na kraju završava formiranjem MAC (engl. *membrane attack complex*). Ova komponenta kordinira vezivanjem i drugih značajnih komponenti komplementa bitnih za nastajanje MAC i generisanje pora u membrani koje dovode do liziranja bakterija (Dorus i sar., 2012).

Postoje dve tipa specifičnog imunskog odgovora: ćelijski i humoralni. Nosioci ćelijskog imunskog odgovora su T limfociti. Nosioci humoralnog odgovora su B limfociti koji se nakon kontakta sa antigenom transformišu u plazma ćelije koje sintešu i sekretuju imunoglobuline. Specifični imunski sistem odgovara direktno na prisustvo tačno određenog antigena. On se oslanja na kapacitet imunskih ćelija da razlikuju sopstvene od stranih ćelija (prepoznavanje sopstvenog od stranog). Ovo prepoznavanje, zajedno sa prezentacijom antigena na površini ćelije, olakšano je prisustvom MHC molekula klase I i II u ćelijskoj membrani. Ovi proteini su markeri sopstvenih ćelija i jedinstveni su za jedinku. Oni su uključeni u prepoznavanje i imunsku reakciju na strane antigene. Molekuli MHC klase I su izloženi na površini svih ćelija sa jedrom, dok je molekul MHC klase II prisutan samo na površini antigen-prezentujućih ćelija (APC ćelije: makrofagi, B ćelije i dendritične ćelije). T limfociti prepoznaju MHC i antigenske komplekse na površini ćelije i podstiču eliminaciju inficirane ćelije. Imunski odgovor posredovan antitelima zavisi od složenog procesa somatskog prepoznavanja u kome nastaje široki repertoar antitela na specifične antigene.

Kako spermatozoidi, tako su i oociti, jedinstveni među ćelijama sa jedrom jer nemaju na površini molekule MHC klase I i zbog toga su manje podložni otkrivanju od strane T limfocita (Clark, 2010a).

Uspešna funkcija sperme u velikoj meri zavisi od interakcije sa drugim ključnim aspektima biologije muškog i ženskog pola, a imunski sistem je među najvažnijima (Wigby i sar., 2019).

Krvno-testisna barijera (KTB)

Krvno-testisna barijera je karakterična po tome da je 50-100 puta čvršća i neprobojnija u odnosu na periferne endotelne ćelije (Mruk i Cheng, 2015). Značajna funkcija KTB je imunološka izolacija razvoja polnih ćelija (gameta u razvoju). Tesno vezane membrane Sertolijevih ćelija formiraju barijeru (KTB) koja onemogućava prolazak proteinskih molekula (kao što su imunoglobulini) iz kapilara, dok molekuli rastvorljivi u mastima kao što su steroidni hormoni lako difunduju kroz nju. Ova barijera je neophodna i potrebna za završetak mejoze polnih ćelija i njihovo napredovanje kroz spermiogenezu. Ona je važna jer se antigeni spermatoocita, spermatida i spermatozoida mogu "prepoznati" kao "tuđi" antigeni od strane imunskog sistema odraslog mušnjaka. Oni nisu prisutni za vreme razvoja fetusa, kada imunski sistem razvija sposobnost razlikovanja sopstvenog od stranog. Spermatozoidi se razvijaju u pubertetu dugo nakon prepoznavanja sopstvenih antigena i razvoja imunske tolerancije na njihove antigene. Proteinski antigeni kojima organizam nikada ranije nije bio izložen sintetišu se u testisima tokom spermatogeneze. Izolacija razvoja polnih ćelija iza imunske barijere (KTB) sprečava da odrasla jedinka – mušnjak stvori antitela na sopstvene spermatozoide. Ako dođe do oštećenja krvno-testisne barijere imunski sistem može tretirati spermatozoide kao strane antigene i dolazi do proizvodnje anti-spermatozoalnih antitela.

Anti-spermatozoalna antitela mogu predstavljati smetnju za fertilizaciju dovodeći do gubitka pokretljivosti spermatozoida, remeteći sposobnost njihove penetracije kroz cervikalnu sluz, inaktiviraju akrozomalne enzime, inhibiraju priljublivanje spermatozoida za zonu pelucidu i posreduju u uginuću embriona. Integritet KTB može biti pod uticajem i drugih faktora uključujući genetske faktore, toksine iz sredine, zapaljenje i određene bolesti. Integritet KTB je regulisan kako endokrinom (FSH, LH, androgeni) kao i parakrinom (TNF β retinoid) sekrecijom (Stanton, 2016; Archana i sar., 2019).

Na integritet KTB i kvalitet sperme utiču takođe Pin 1 (peptidil-proлил cis/trans izomeraza), FASLG sistem (engl. *fas ligand sistem*) i TLR receptori (engl. *toll like receptors*) (Islam i sar., 2017). Poslednja dva faktora su poslednjih decenija privukla veliku pažnju u istraživanju imunskog aspekta sperme i fertiliteta. Prisustvo FASLG iRNA u polnim ćelijama (mejotičnim i postmejotičnim) i Fas proteina u zrelim spermatozoidima uključeni su u regulaciju imunskog odgovora indukovanjem apoptoze u limfocitima koji su reagovali na ćelije koje nose Fas proteine. Smatra se da je ovo suštinski mehanizam kojim se smanjuje imunski odgovor i održava imunološki "privilegovano" okruženje u testisima (Zhao i sar., 2014; Sahnoun i sar., 2017). Ovaj mehanizam je važan u fertilizaciji jer omogućava da spermatozoidi izbegnu autoimuni odgovor u muškom reproduktivnom sistemu i alogeni odgovor u ženskom (D'Alessio i sar., 2001). TLR receptori pokreću nespecifični imunski odgovor preko citokina interleukina 1 i 6 (IL-1, IL-6) i faktora nekroze tumora (TNF α) i njegova regulacija je od suštinske važnosti za zaštitu polnih ćelija od samog imunskog sistema i patogena.

Imuno-regulatorni biomolekuli u testisu i semenu

U muškom reproduktivnom traktu se sintetišu i zajedno sa spermatozoidima transportuju u spermu – seme imuno regulatorni molekuli kao što su TGF β (engl. *transforming growth factor* β), citokini, faktori rasta, CD3, imunosupresivni molekuli (PGE – prostaglandin E) IL-2, IL-4, IL-10, kao i NK ćelije (engl. *natural killer*) (Archana i sar., 2019).

Semena plazma obezbeđuje citokine i faktore rasta koji su neophodni za regulaciju zapaljenskog odgovora, privlačenje leukocita, maternalnu toleranciju na aloantigene spermatozoida i razvoj embriona. Ona sadrži mnoge biomolekule (Juyena i Srelleta, 2012) koji deluju na imunski sistem i inflamaciju. Dokazano je da semena plazma bikova ispoljava snažnu antikomplementarnu aktivnost i dovodi do inhibicije precipitacije imunskih kompleksa (Lazarević, 2000). Ona dostavlja potencijalno imunogene biomolekule u ženski reproduktivni trakt kao što su PGE, 19 hidroksi-prostaglandin E, TGF β i humani leukocitni antigen G.

Ne postoji ni jedna telesna tečnost kao što je semena plazma u kojoj je koncentracija prostaglandina tako visoka. Pored toga, tu se nalaze i imunosupresivni faktori kao što su IL-6 i IL-10, koji štite spermu od imunskih reakcija u ženskom reproduktivnom traktu (Ochsenkühn i sar., 2006).

Citokini

Citokini regulišu fiziološke funkcije vezane za testise i proizvodnju semena da bi se omogućila oplodnja. Citokini kao što su TGF β , CXChemokini ligand 12 (CXCL12), IL-1, IL-5, IL-7, IL-13, IL-17 i monocitni hemotaktički protein 1, utvrđeni su kod zdravih plodnih jedinki. Oni regulišu aktivnost T ćelija, aktivnost hemotaktičkog liganda 3, interferona alfa i faktora stimulacije kolonija granulocita (CFU-G) (Archana i sar., 2019). Povećanje koncentracije PGE tokom infekcije sprečava ćelijski posredovan odgovor na spermatozoide, dok je ukupna sekrecija citokina tokom humoralnog odgovora pojačana tokom infekcije (Loveland i sar., 2017).

Defenzini

Antimikrobne materije sekretovane u seme kao što su defenzin, katepsin i serpin mogu da regulišu pokretljivost sperme i nespecifični imunski odgovor. Defenzin pruža zaštitu kod virusne i bakterijske infekcije i prevenira preuranjenu aktivaciju spermatozoida. Defenzin je neophodan za sazrevanje spermatozoida i njihovu zaštitu od imunskog odgovora u ženskom reproduktivnom traktu. U epitelnim ćelijama kaudalnog epididimisa i vas deferensa, defenzin β 126 je povezan sa antimikrobnim peptidima koji su uključeni u pokretljivosti spermatozoida, ćelijsku signalizaciju, imunoregulaciju i vezivanje spermatozoida za epitel jajovoda (Lyons i sar., 2018). Defenzin 126 reguliše i kretanje spermatozoida kroz cervikalnu sluz i štiti ih od napada imunskog sistema u ženskom reproduktivnom traktu, a takođe je neophodan za maturaciju spermatozoida (Tollner i sar., 2008).

Komplement

Sperma takođe sadrži i neke komponente sistema komplementa, uključujući komplement vezujući protein C1q, C3 komponentu komplementa, kao i proteine koji ne pripadaju komplementu kao što su angiotenzin konvertaza enzim 2, apolipoprotein 1,2 I 4, β 2 mikroglobulin i dr. U regulaciji aktivnosti spermatozoida učestvuju i proteini kao što su klasterin, CD109, CD46, i CD55. Svi ovi elementi zajedno štite spermu od komplementa u muškom i ženskom reproduktivnom traktu tokom inflamatornog odgovora, učestvuju u spajanju spermatozoida i jajne ćelije i implantaciji (Dorus i sar., 2012).

Komplement i funkcija sperme

Intereakcija sperme sa imunskim sistemom ženke je neizbežna jer ona prolazi kroz taj sistem da bi došlo do oplodnje jajne ćelije. U ženskom reproduktivnom traktu glavna komponenta nespecifičnog imunskog sistema je sistem komplementa. Semena plazma poseduje sposobnost inhibicije komplementa. Identifikovano je više proteina u semennoj plazmi i na površini spermatozoida koji regulišu aktivaciju komplementa. Regulatori komplementa koji su dobro proučeni uključuju

klasterin, CD46, CD55 i CD59, za koje je utvrđeno da imaju aktivnost u semenoj plazmi i koji u različitom stepenu prijanjaju za membranu spermatozoida. Od posebnog interesa je CD46. On se kod ljudi eksprimira na ćelijama sa jedrom i pruža zaštitu od komplementa (Inoue i sar., 2003; Archana i sar., 2019).

Istraživanja u oblasti proteomike sperme su pokazala da sperma sadrži najmanje tri primarne komponente komplementa: C1qbp (engl. *binding protein*, bp), C3 i C5 komponentu sistema komplementa. Smatra se da komponenta C1qbp igra ulogu u regulisanju aktivacije klasičnog puta komplementa inhibicijom aktivacije C1 komponente. Komponenta komplementa C3 kod oba puta aktivacije podleže hidrolizi da bi se se stvorili različiti proizvodi aktivacije (C3b) koji na kraju dovode do vezivanja i eliminacije patogena. Proizvodnja C3b komponente može dovesti do stvaranja C5 konvertaze koja onda deluje na C5, cepa ga i rezultat aktivacije komplementa je na kraju formiranjem MAC-a (engl. *membrane attack complex*), koji se ubacuje u ćelijsku membranu i dovodi do liziranja ćelije (Sarma i Ward, 2011).

Iako precizne funkcije ovih komponenti komplementa treba da bude razjašnjene poznato je da se C3b vezuje za spermu koristeći CD46 kao receptor (Mizuno i sar., 2004). Smatra se da C3b deluje kao most između spermatozoida i drugih CD antigena na površini oocita. Ovo se može uporediti sa klasičnim mehanizmom imunološke adherence. Takođe se smatra da je prepoznavanje i međusobno vezivanje ćelija odraz plejotropije (pojava da jedan gen utiče na dve ili više naizgled nepovezanih fenotiskih karakteristika) između imuniteta i reproduktivnog sistema (Riley-Vargas i sar., 2005). Isto tako je poznato da sperma sadrži i druge CD antigene kao što su CD55, CD59 i CD109 (Dorus i sar., 2012). Predpostavlja se da CD55 i CD59 predstavljaju dopunu zaštiti sperme od sistema komplementa. Utvrđeno je ovi molekuli (CD55 i CD59), antigeni, utiču na rastavljanje C3/C5 konvertaze i time blokiraju formiranje formiranje MAC-a. Međutim, da li je to slučaj i kod sperme nije sigurno dokazano. Za faktor H komplementa se zna da prekida C3 konvertazu, klasterin inhibira lizu komplementom i oni su identifikovani u proteomu (proteinima) sperme (Sarma i Ward 2011; Moura i Menilli, 2016).

Rezultati istraživanja proteomike sperme bi svakako trebalo da budu korisni u razjašnjavanju kako ovi molekuli zajedno funkcionišu kako bi uticali na aktivaciju komplementa, dinamiku akrozomalne reakcije i fuziju spermatozoid-jajna ćelija.

Hormoni

Osovina hipotalamus-hipofiza-gonade (HPA - osovina) u vezi je sa odgovorom imunskog sistema na funkcionalne i fiziološke promene. Tokom graviditeta, progesteron dovodi do imunosupresije dok estrogen obezbeđuje imunsku zaštitu tokom implantacije embriona. Polni steroidi i luteinizirajući hormon (LH) održavaju lokalnu imunološku sredinu u reproduktivnom traktu supresijom maternalnog alo-odgovora i generisanjem puteva imunološke tolerancije. Ovo se postiže smanjenjem antigen prezentujućeg kapaciteta dendritičnih ćelija, monocita i makrofaga,

i/ili blokiranjem NK ćelija, T i B ćelija protiv spermatozoidnih imuno regulatornih biomolekula u ženskom reproduktivnom traktu.

Utvrđene su različite uloge androgena u muškom reproduktivnom traktu u regulisanju proinflamatornih citokina. Izlaganje imunskih ćelija testosteronu, u *in vitro* uslovima, je pokazalo da pod njegovim dejstvom dolazi do supresije adhezivnih molekula i citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF β , i proizvodnje antiinflamatornih citokina (IL-10). U testisima je testosteron uključen u apoptozu T ćelija što je važno za održavanje imunski "privilegovane" sredine. Androgeni ispoljavaju svoju imunosupresivnu funkciju na leukocite testisa regulišući ravnotežu između ekspresije pro-inflamatornih i anti-inflamatornih citokina u Sertolijevim, Lajdigovim i peritubularnim ćelijama (Meinhardt i Hedger, 2011). Poremećaj funkcije HPA osovine, posebno sekrecije androgena može dovesti do poremećaja imunske funkcije i neplodnosti kod mužjaka.

Stres, reaktivne kiseoničke vrste (ROS) i imunski sistem

Spermatozoidi proizvode visok nivo ROS što odražava nivo njihove metaboličke aktivnosti. Oksidativni stres je jedan od glavnih faktora koji utiču na fertilitet kod mužjaka. Nivo nekih antioksidanasa kao što su askorbinska kiselina, α -tokoferol i redukovani glutation u semenoj plazmi ublažavaju efekte ROS da bi se održala pokretljivost i morfologija sperme (Thakare i Patil, 2012). U prevenciji oksidativnog stresa u reproduktivnom traktu bitnu ulogu imaju i kiseli proteini semene plazme. Ovi proteini se kod bikova nalaze u sekretu epididimisa i akcesornih polnih žlezda (Kumar i sar., 2012).

Toplotni stres deluje supresivno na imunitet i utiče na reprodukciju uglavnom povećanom proizvodnjom ROS (Tremellen, 2008). Proizvodnja ROS u mitohondrijama spermatozoida, fluidnost membrane sperme, oštećenje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) su pod uticajem toplotnog stresa. Citokini odgovorni za pojavu ROS pokazuju složenu interakciju koja reguliše imunske odbrane reproduktivnog trakta mužjaka. Koncentracije nekih citokina (CXCL5, CXCL16, CXCL8, IL1b, IL10, CSF3, *chemokine-motif ligand 3*, i TNF β) su povećane kod visokog nivoa ROS. Takođe, neki kontaminanti sredine kao što su teški metali, fungicidi i pesticidi mogu uticati na promenu imunski privilegovanog mesta testisa (Archana i sar., 2019).

Antigene komponente semena

Antigene komponente semena su poreklom iz testisa, epididimisa, *vas deferens-a* i akcesornih polnih žlezda. U najširem smislu se mogu klasifikovati na one komponente koje se nalaze u semenoj plazmi i one koje su vezane za spermatozoide. Spermatozoidi nose mešavinu antigena (Ag) uključujući Ag-specifične za sperm, MHC antigene, Ag krvnih grupa i druge somatske Ag. Antigeni sperme mogu biti poreklom iz reproduktivnog trakta mužjaka (autoantigeni) a za ženke su

izoantigeni. Antitela na spermatozoide moraju ući u semenu plazmu ili cervikalni sluz da bi odigrali svoju ulogu.

Interesantna je činjenica da u ženskom reproduktivnom traktu spermatozoidi usled kretanja i prolaska kroz cervikalnu sluz gube svoj omotač i na taj način stalno menjaju antigensku strukturu, ispoljavajući različite antigene na svojoj površini. Ovim se smanjuje verovatnoća za nastanak dovoljne količine potencijalno štetnih antispermatozoalnih antitela. Imunosupresivno delovanje semene plazme dokazano je kod svih ispitivanih vrsta sisara i pretežno je usmereno na limfocite, NK ćelije i komponente sistema komplementa (Lazarević, 2000).

Antispermatozoidna antitela (*antisperm antibodies, ASA*)

Mnogi faktori utiču na formiranje ASA kod mužjaka kao što su oštećenje KTB usled lokalne inflamacije, tumora, toksina, procedura ekstrakcije sperme, smanjenja ćelijskih i humoralnih imunomodulatornih faktora u semenoj plazmi ili antigen-ukrštene reakcije između mikroorganizama i spermatozoida. Kod bikova, genitalna infekcija sa patogenima (bakterije) kao što su *Chlamydia spp.*, *Brucella abortus* i infekcija sa virusom infektivnog bovinog rinotraheitisa (IBR) može biti udružena sa pojavom ASA. Takođe se mogu javiti ASA kod bikova sa orhitisom i zapaljenjem semenih vezikula. ASA sekretovana u semenu plazmu negativno utiču na pokretljivost spermatozoida, integritet njihove membrane i mogućnost da penetriraju kroz cervikalnu sluz. Kod bikova sa niskom sposobnosti oplodnje nađena su ASA povezana sa abnormalnostima sperme (Ferrer i Miller, 2018). Tako je, na primer, utvrđen veći nivo spermatozoida za koja su vezana IgA antitela kod manje fertilnih bikova (bikovi rasa goveda za proizvodnju mesa). Vezivanje IgG za spermatozoide utiče negativno na njihovu pokretljivost, abnormalnost glave i promene morfologije repa („namotani repovi“) (Ferrer i sar., 2015). Antispermalna antitela nastaju kada imunski sistem bude senzibilisan spermom što kao rezultat dovodi do njihovog uništavanja. Kod mužjaka, proizvodnja ASA je obično inhibirana zbog KTB, dok je kod ženke proizvodnja ASA normalno suprimirana (Mital i sar., 2011). Ukoliko dođe do narušavanja bilo kog od ovih mehanizama može doći do proizvodnje ASA što može biti uzrok neplodnosti.

Da bi se postavile granične vrednosti za utvrđivanje prisustva ASA u serumu krava, koje su više puta osemenjavane (kod ponovljenog osemenjavanja) istraživači su koristili različite testove: test imobilizacije sperme (engl. *sperm immobilization test*), aglutinacije sperme (engl. *sperm agglutination test*, SAT) i imunoperoksidazni test (engl. *immunoperoxidase test*, IPT) (Srivastava i sar., 2016). Za detekciju ASA može se koristiti i enzimo-immuno esej (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA test) u cilju kvantifikacije ukupnih IgG i IgA (za otkrivanje ASA vezanih za spermatozoide u sekretima reproduktivnog trakta i serumu).

Tako je dokazano da prisustvo antispermalnih antitela u cervikalnoj sluzi ili krvnom serumu iznosi 37,9 i 34,5% kod neplodnih (nesteonih) krava, dok njih nema u cervikalnoj sluzi, a u krvnom serumu je pristno kod svega 6,7% plodnih –

fertilnih (steonih) krava (Wang, 1989). Antitela mogu biti prisutna u krvi kao IgG i/ili u sekretu reproduktivnog trakta kod mužjaka kao i kod ženke preživara (ali i ljudi). Antispermalna antitela izazivaju neplodnost aglutinacijom ili imobilizacijom spermatozoida u serumu/cervikalnoj sluzi ili blokiraju pričvršćivanje spermatozoida za oocite, što negativno utiče na fertilizaciju ili dovodi do rane smrti embriona i ponovnog osemenjavanja (parenja).

Istraživanja su pokazala da prisustvo više od 12,6% aglutinovanih spermatozoida pri razblaženju 1:5 ili više od 2,62 % peroksidaza pozitivnih spermatozoida pri razblaženju seruma od 1:80 testiranih SAT and IPT može biti uzrok ponovljenog parenja usled ASA kod krava (Srivastava i sar., 2016).

Tehnike za otkrivanje imunskih regulatornih molekula

Za otkrivanje ASA u biološkim tečnostima, serumu i semenoj plazmi mogu se koristiti ELISA test ili radioimunoesej (engl. *radioimmuno assay*, RIA test). Precizna citometrija se upotrebljava za identifikaciju IgG i IgA molekula na površini spermatozoida (Sardoy i sar., 2012), dok su 2D-poliakrilamid gel elektroforeza i SDS-PAGE elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis*) metode izbora za analizu brojnih proteina sperme (Kasimanickam i sar., 2019). U istu svrhu se mogu koristiti tačna hromatografija i masena spektrometrija.

Otkrivanje antigena sperme i razjašnjavanje njihove uloge u funkciji sperme i fertilizaciji ukazuje na značaj sveobuhvatnog razumevanja sastava plazma membrane spermatozoida i oocita, koji međusobno deluju tokom oplodnje. Razjašnjenje funkcija i puteva regulatornih molekula imunskog sistema koji su u vezi sa oplodnjom – fertilizacijom, je preduslov za razumevanje njihovog uticaja na plodnost.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2020-14/200143).

Literatura

1. Archana S, Selvaraju S, Binsila B, Arangasamy A, Krawetz S, 2019, Immune regulatory molecules as modifiers of semen and fertility, *Mol Reprod Dev*, 86, 1485–504.
2. Clark F, 2010, The mammalian zona pellucida: a matrix that mediates both gamete binding and immune recognition? *Syst Biol Reprod Med*, 56, 349–64.
3. D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, Padula F, Muciaccia B, De Cesaris P, 2001, Testicular FasL is expressed by sperm cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 3316–21.
4. Dorus S, Skerget Sand Karr T, 2012, Proteomic discovery of diverse immunity molecules in mammalian spermatozoa, *Syst Biol Reprod Med*, 58, 218–28.

11. naučni simpozijum "Reprodukcija domaćih životinja"

5. Ferrer S, Laflin S, Anderson E, Miesner D, Wilkerson J, George A, 2015, Prevalence of bovine sperm-bound antisperm antibodies and their association with semen quality, *Theriogenology*, 84, 94–100.
6. Ferrer S, Miller J, 2018, Equine sperm-bound antisperm antibodies are associated with poor semen quality, *Theriogenology*, 118, 212–18.
7. Horne W, Stock J, King E, 2008, Innate immunity and disorders of the female reproductive tract, *Reproduction*, 135, 739–49.
8. Hurley D, 2015, The Relationship of Immunity and Reproduction in Dairy Cows, *Adv Dairy Technol*, 27, 129–141.
9. Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, 2003, Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm, *Mol Cell Biol*, 23, 2614–22.
10. Islam R, Yoon H, Kim B, Bae H, Shin H, Kim J, 2017, Blood-testis barrier integrity depends on Pin1 expression in Sertoli cells, *Sci Rep*, 7, 6977.
11. Juyena S, Srelleta C, 2012, Seminal Plasma: An Essential Review Attribute to Spermatozoa, *J Androl*, 33, 4, 536–51.
12. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Arangasamy A, Kastelic J, 2019, Sperm and seminal plasma proteomics of high versus low fertility Holstein bulls, *Theriogenology*, 1, 126, 41–8.
13. Kumar P, Kumar D, Singh I, Yadav P, 2012, Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility, *Agric Res*, 1, 1, 78–86.
14. Lazarević M, 2000, Imunologija reprodukcije, U: Neuroendokrinomunologija, Urednici Ćirić O, Budeč M, Leposavić G, Zavod za udžbenike I nastavna sredstva Beograd, 349–75.
15. Loveland L, Klein B, Pueschl D, Indumathy S, Bergmann M, Loveland E, 2017, Cytokines in male fertility and reproductive pathologies: Immunoregulation and beyond, *Front Endocrinol*, 8, 307.
16. Lyons A, Narciandi F, Donnellan E, Aguirregomezcorra A, Farrelly C, Lonergan C, 2018, Recombinant β -defensin 126 promotes bull sperm binding to bovine oviductal epithelia, *Reprod Fertil Dev*, 30, 11, 1472–81.
17. Meinhardt A, Hedger P, 2011, Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege, *Mol Cell Endocrinol*, 335, 60–8.
18. Mital P, Hinton T, Dufour M, 2011, The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions, *Biol Reprod*, 84, 851–58.
19. Mizuno M, Harris L, Johnson M, Morgan P, 2004, Rat membrane cofactor protein (MCP; CD46) is expressed only in the acrosome of developing and mature spermatozoa and mediates binding to immobilized activated C3, *Biol Reprod*, 71, 1374–83.
20. Moura A, Memili E, 2016, Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility, *Anim Reprod*, 13, 3, 191–9.
21. Mruk D, Cheng Y, 2015, The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation, *Endocr Rev*, 36, 564–91.
22. Ochsenkühn R, O'Connor E, Hirst J, Gordon Baker W, de Kretser M, 2006, The relationship between immunosuppressive activity and immunoregulatory cytokines in seminal plasma: Influence of sperm autoimmunity and seminal leukocytes, *J Reprod Immunol*, 71, 57–74.
23. Riley-Vargas C, Lanzendorf S, Atkinson P, 2005, Targeted and restricted complement activation on acrosome-reacted spermatozoa, *J Clin Invest*, 115, 1241–9.
24. Sahnoun S, Sellami A, Chakroun N, Mseddi M, Attia H, Rebai T, 2017, Human sperm Toll-like receptor 4 (TLR4) mediates acrosome reaction, oxidative stress markers and sperm parameters in response to bacterial lipopolysaccharide in infertile men, *J Assist Reprod Genet*, 34, 1067–77.
25. Sardoy C, Anderson E, George A, Wilkerson J, Skinner S, Ferrer S, 2012, Standardization of a method to detect bovine sperm-bound antisperm antibodies by flow cytometry, *Theriogenology*, 78, 1570–77.

26. Sarma V, Ward A, 2011, The complement system, *Cell Tissue Res*, 343,227–35.
27. Shutao Z, Weiwei Z, Shepu X, Daishu H, 2014, Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity, *Cell Mol Immunol*, 11, 428–37.
28. Srivastava S, Shinde S, Singh S, Mehrotra S, Verma M, Singh A, 2017, Antisperm antibodies in repeat-breeding cows: Frequency, detection and validation of threshold levels employing sperm immobilization, sperm agglutination and immunoperoxidase assay, *Reprod Domest Anim*, 52, 195–202.
29. Stanton G, 2016, Regulation of the blood-testis barrier, *Semin Cell Dev Biol*, 59, 166–73.
30. Sullivan R, Saez F, 2013, Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology, *Reproduction*, 146, R21–R35.
31. Tollner L, Yudin A, Treece A, Overstreet W, Cherr N, 2008, Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus, *Hum Reprod*, 23, 2523–234.
32. Tremellen K, 2008, Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective, *Hum Reprod Update*, 14, 243–58.
33. Wang G, 1989, Antisperm antibodies in fertile and non fertile cows, *Anim Husb Vet Med China*, 30, 867–70.
34. Wigbya S, Suarez S, Lazzaro B, Pizzaria T, Wolfner M, 2019, Sperm success and immunity, *Curr Top Dev Biol*, 135, 287–313.

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

636.082(082)

636.09:618.19(082)

НАУЧНИ симпозијум Репродукција домаћих животиња (11 ; 2020 ; Србија)

Zbornik predavanja / 11. Naučni simpozijum Reprodukција домаћих животиња, 08 - 11. oktobar 2020. ; [organizatori Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu ... [et al.]] ; [odgovorni urednik Miodrag Lazarević]. - Beograd : Fakultet veterinarske medicine, Centar za izdavačku delatnost i promet učila, 2020 (Beograd : Naučna KMD). - II, 197 str. : ilustr. ; 25 cm

Radovi na srp., engl. i hrv. jeziku. - Prema predgovoru, simpozijum je održan u online režimu putem Zoom platforme. - Tiraž 450. - Bibliografija uz svaki rad. - Registar. - Summaries.

ISBN 978-86-80446-37-0

а) Домаће животиње -- Размножавање -- Зборници б) Домаће животиње -- Млечне жлезде -- Болести -- Зборници

COBISS.SR-ID 22437129