

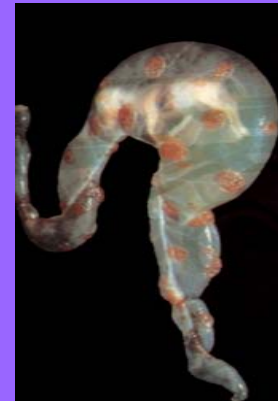


Imunološki i endokrinološki aspekti  
rane gravidnosti i njihova primjena u  
dijagnostici rane embrionalne  
smrtnosti

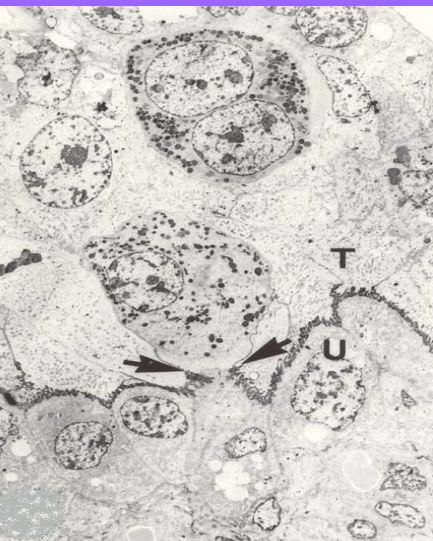
Nikica Prvanović, dr. vet. med

# Uvod

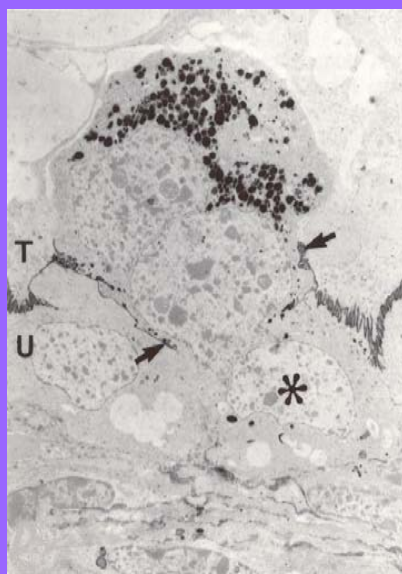
- ❖ Određivanje i nalaz interferona i drugih trofoblast proteina danas se sve češće koriste kao objektivan dokaz postojanja živog i vitalnog embrija.
- ❖ Provodi se serološki - pomoću metoda **RIA** i **ELISA**



Migracija binuklearnih trofoblasta u smjeru mikrovila

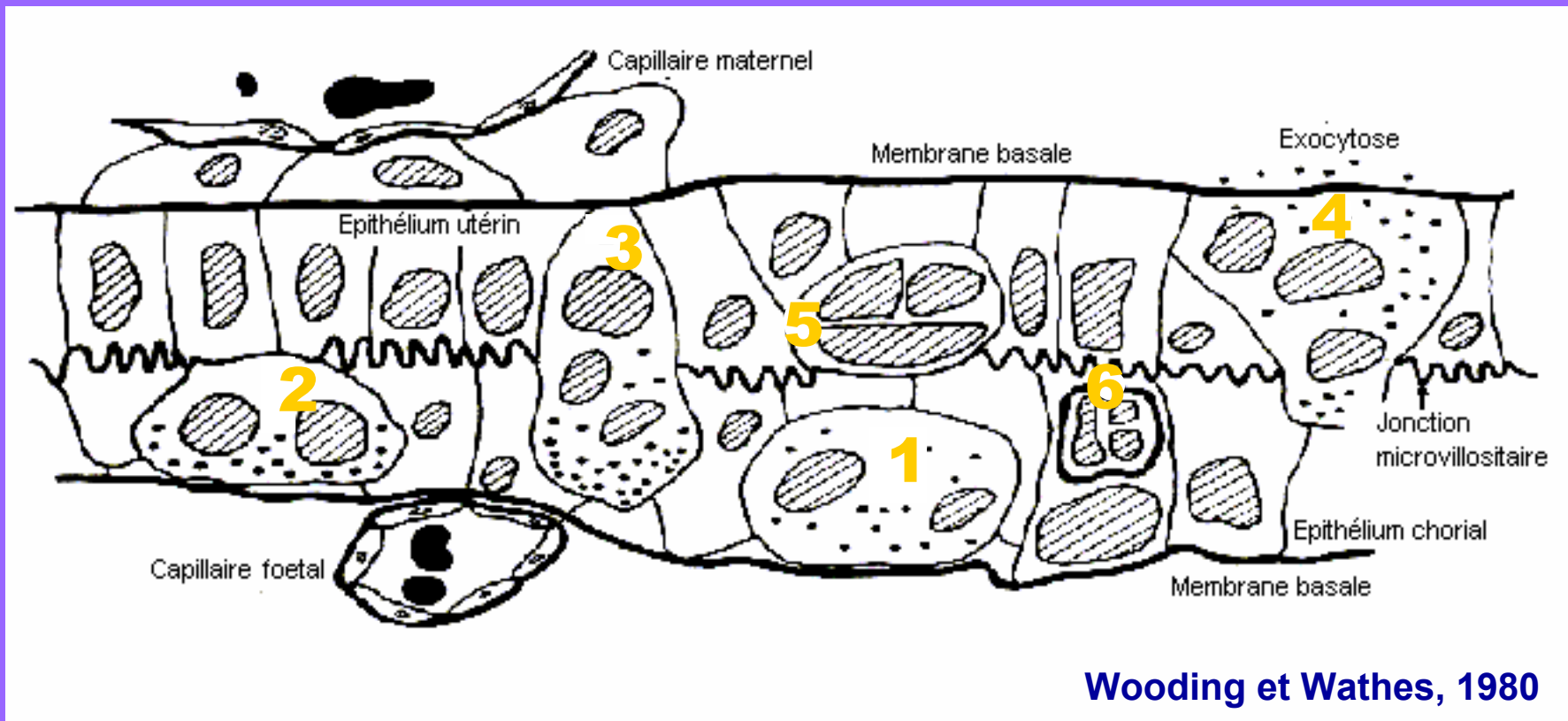


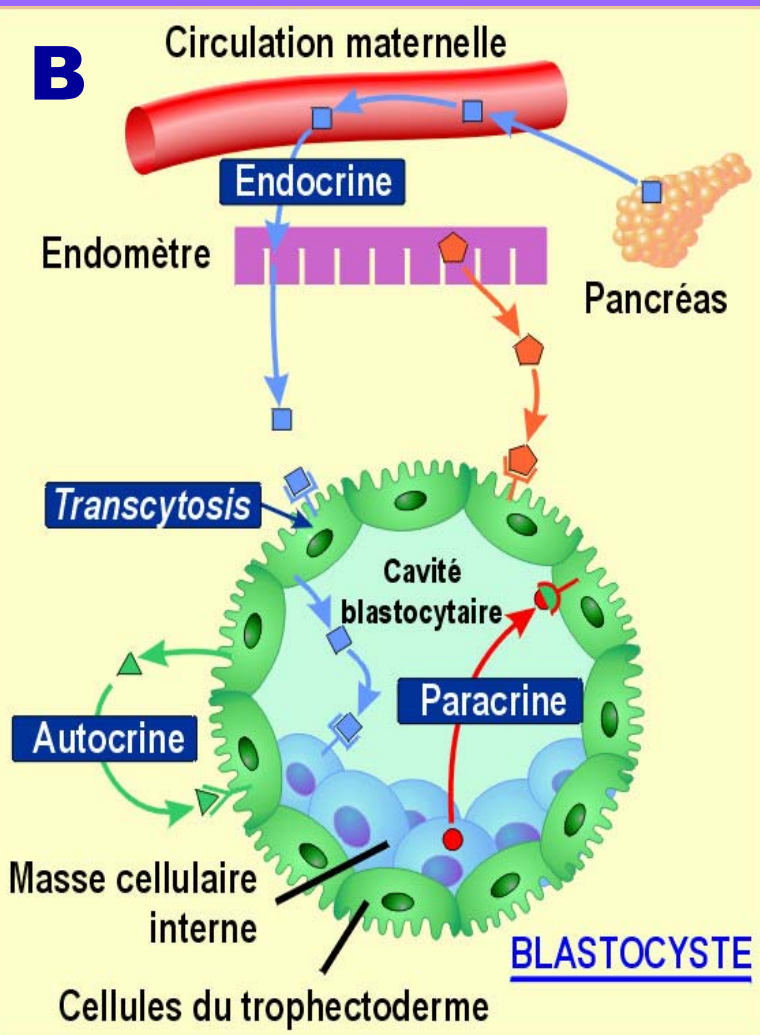
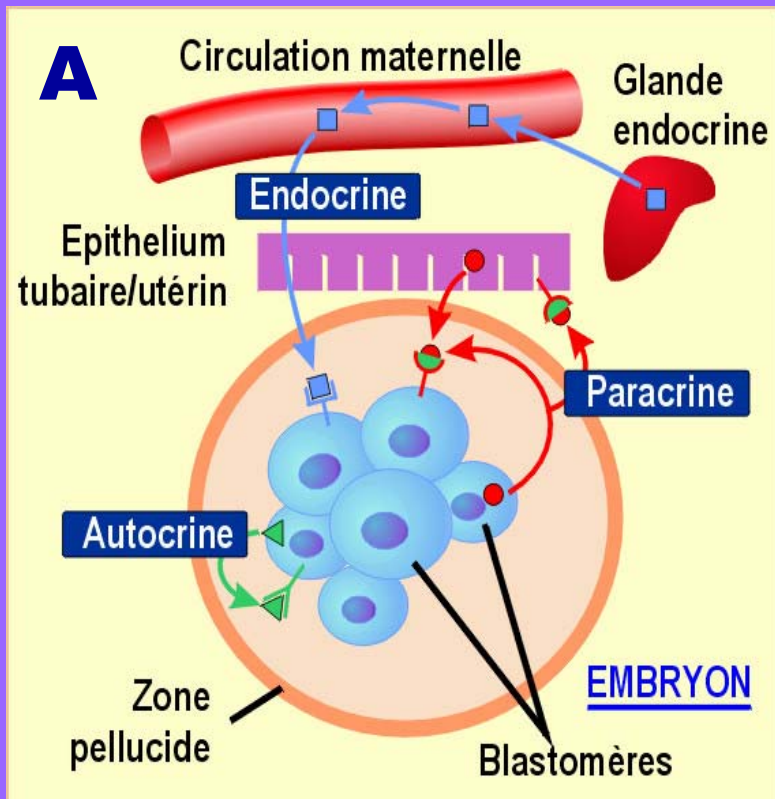
BNT nakon fuzije s endometrijem (vidi zvjezdicu)



Trinuklearne stanice uklopljene u epitel







- |                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| ● TGF- $\alpha$ | Y Récepteur EGF        |
| ■ Insuline      | T Récepteur Insuline   |
| ◊ IGF-1         | Y Récepteur type 1 IGF |
| ▼ IGF-2         | Y Récepteur type 2/M6P |

Interakcije endometrija i trofoblasta  
uvjetovane su vremenom i prostorom  
(Kaye, 1997)



❖ Rana dijagnostika gravidnosti domačih i divljih preživača se provodi:

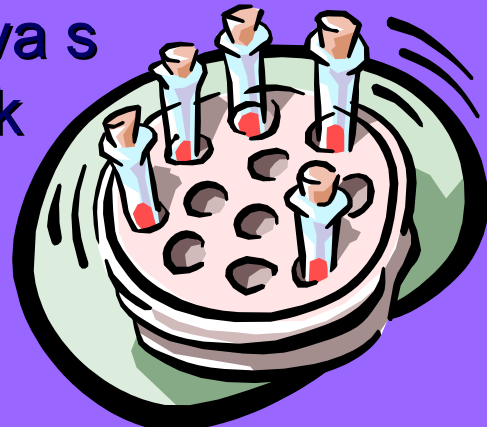
- Kliničkim metodama pretrage
- Ultrazvučnom pretragom
- Određivanjem progesterona u krvi i mlijeku

Željeli smo istražiti:

- ❖ Vitalitet predimplantatornih transferiranih D.S. Embrija
- ❖ Mehanizam rane embrionalne smrtnosti i ulogu **trofoblast proteina** i **leptina** na predimplantacijsku fazu gravidnosti

# Određivanje trofoblast proteina-RIA metoda koristi se:

- ❖ za potvrdu dijagnoze gravidnosti 24. Dana
- ❖ postoje značajne razlike između reakcija kod različitih vrsta domaćih životinja
- ❖ U posljednjih nekoliko godina ova se metoda često koristi u preživača i svinja, a rjeđe u konja i pasa
- ❖ Metoda se intenzivno istražuje i usavršava s tendencijom da postane rutinski postupak



# Uloga trofoblast proteina u ranoj gravidnosti

- ❖ Endometrij postaje stimuliran migracijom blastociste prije implantacije
- ❖ EPF (early pregnancy factor) u miševa je dokazan 4-6 sati nakon oplodnje
- ❖ On veže T-limfocite da spriječi prepoznavanje antigena embrija.







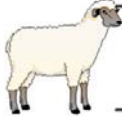
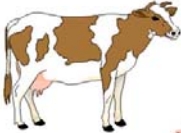




# Dokazivanje EPF- reakcija rozeta



**Negravidna životinja  
EPF-**



**Gravidna životinja  
EPF+**

Espèce	Référence	
	<i>Mus musculus</i>	Morton et al, 1974
	<i>Homo sapiens</i>	Morton et al, 1977
	<i>Ovis aries</i>	Morton et al, 1979
	<i>Bos taurus</i>	Nancarrow et Wallace, 1980
	<i>Sus scrofa</i>	Morton et al, 1983
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Sueoka et al, 1989
	<i>Equus caballus</i>	Takagi et al, 1998
	<i>Sminthopsus macroura</i>	Cruz et al, 2001

## Endokrini odgovor majke –

### majčinsko prepoznavanje gravidnosti

- U krmača 12. dan
- U ovaca 12.-13. dana,
- U krava 16.-17. dana,
- U kobilica 14.-16. dana
- U košuta 17. dana

Što je (ovisno o vrsti) 7-20 dana prije završetka implantacije

**Embrij u razvoju može djelovati na dva načina:**

Da zaustavi sintezu, otpuštanje ili djelovanje  $\text{PGF-2}\alpha$

**ili**

Da prevlada luteotropni učinak luteolizina

**Opće i lokalne reakcije koje slijede predstavljaju  
majčinski odgovor na gravidnost**

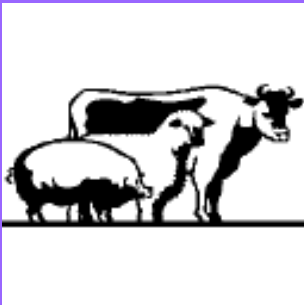
Potom embrijski trofoblast **proliferira, migrira i invadira** krvne žile majke.

Upalna reakcija i imunološke promjene → **preživljavanje i razvoj fetusa i placente**



Implantacija blastocisti = lanac vrlo delikatnih interakcija između embrija i endometrija

- ❖ Predimplantacijska faza je regulirana putem trohoderma, a svi kasniji stadiji regulirani su pomoću **pregnancy specific proteins (PSP ili PAG)**
- ❖ **PAG** igra ključnu ulogu u dokazivanju i određivanju **feto-placentalnog preživljavanja**
- ❖ Sve opisana za ovčje trofoblast proteine je također dokazano kod krava, košuta, krmača i kuja



## ❖ Trofoblast proteini:

- djeluju antiluteolitički limitirajući sintezu, otpuštanje i transport  $\text{PGF2}\alpha$  do jajnika
- potiču sintezu  $\text{PGE}$  umjesto  $\text{PGF2}\alpha$
- sekrecija  $\text{PGF2}\alpha$

iz endokrine (u krv) → u egzokrinu ( u materničnu šupljinu)

Navedene promjene poznate su kao

**“majčinsko prepoznavanje graviditeta”**

**Domaći i divlji preživaci (košuta)**  
**trofoblast blastociste u razvoju**



**sinteza interferon tipa I iz skupine interferona tau**



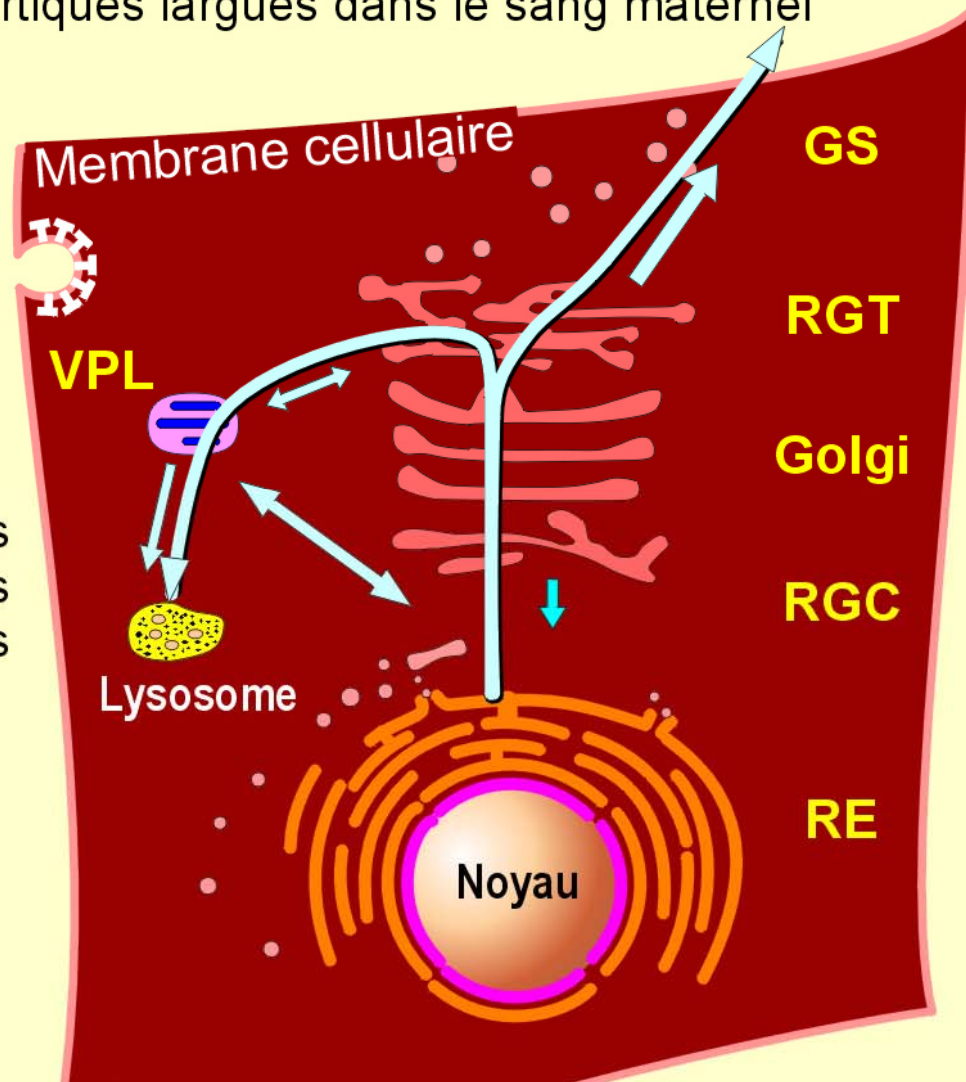
**blokada sinteze oksitocinskih receptora u endometriju.**

**U srne koja je monoestrična, fiziološka je pojava embrijska diapauza-embriotenija, stoga nema potrebe da predimplantacijska blastocista osigura majčinsko prepoznavanje gravidnosti.**

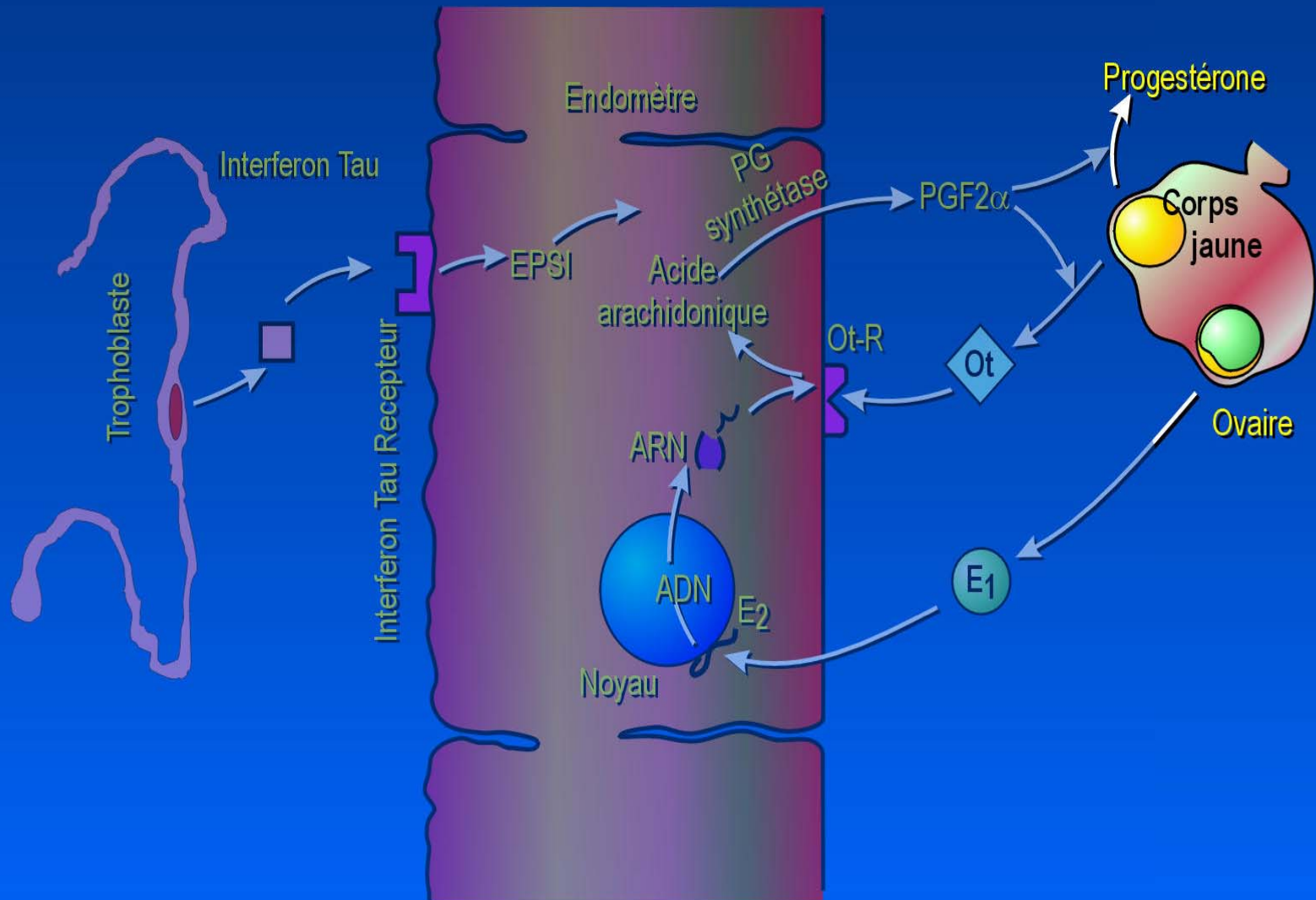


PAG, PSPB... membres de la famille des protéases aspartiques largués dans le sang maternel

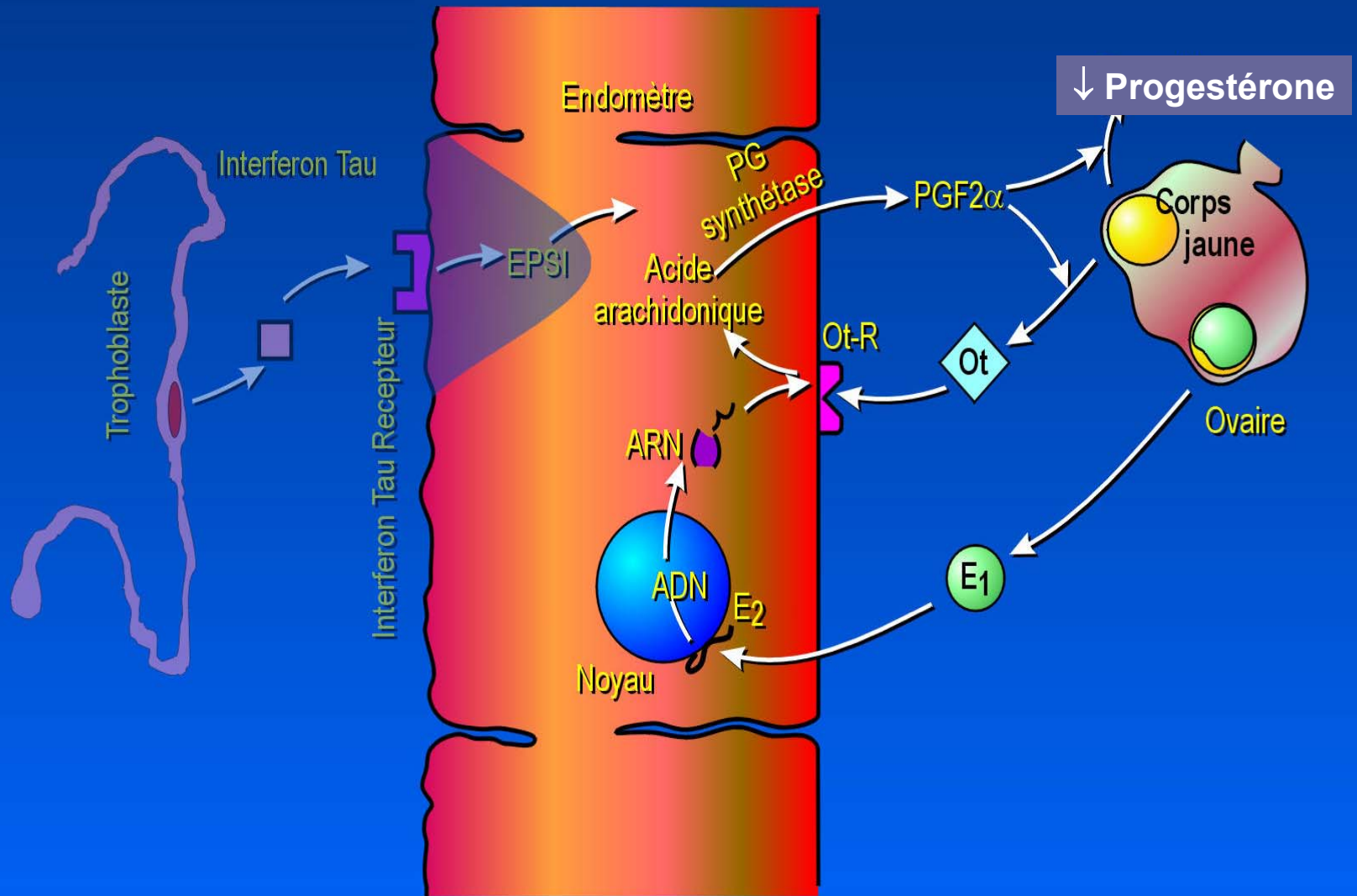
Protéases actives impliquées dans les remaniements cellulaires



# Phase métœstrale et diœstrale

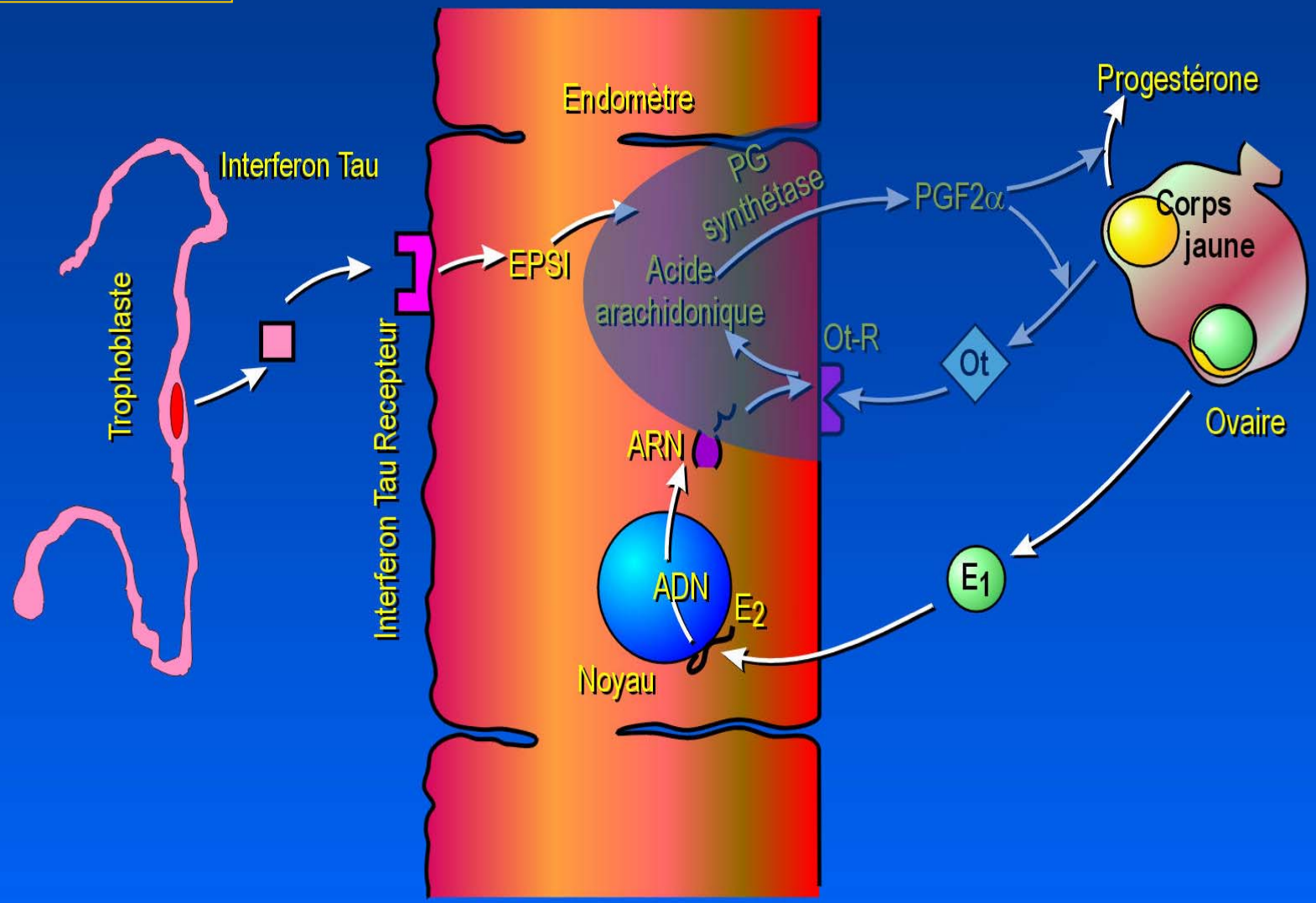


# Phase proœstrale (lutéolyse)

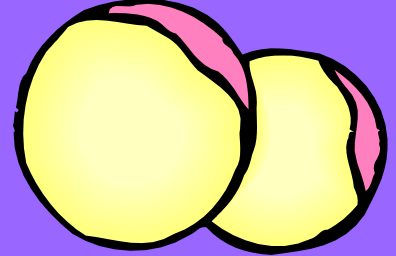


# IFN $\tau$

## Début de la gestation



# Uloga leptina u ranoj gravidnosti



Fat Cells

- ❖ Leptin je hormon podrijetlom iz adipocita, u općoj cirkulaciji proporcionalan količini masnog tkiva
- ❖ U fiziološkim koncentracijama (2-10 ng/ml serum) potiče steroidogenezu jajnika i razvoj embrija
- ❖ Koncentracija leptina značajno raste u ranoj gravidnosti (u prva dva tjedna) i smatra se da regulira invazibilnost citotrofoblasta tijekom implantacije i placentacije

- ❖ Receptori za leptin u mozgu, masnom tkivu, hipofizi, jajnicima i placenti
- ❖ Porast koncentracije leptina u serumu = porast koncentracije LH,FSH, testosterona i estrogena
- ❖ Koncentracija leptina bitno je viša u umbilikalnim venama nego u umbilikalnim arterijama
- ❖ Leptin djeluje na embrij tako što povećava unos i metabolizam glukoze putem regulacije metabolizma i sinteze inzulina
- ❖ Sve navedeno je dokazano u ljudi, miševa, štakora, ovaca i krava

Tijekom gravidnosti leptin direktno utječe na

1. rast i razvoj zametka
2. feto-placentalnu angiogenezu
3. embrionalnu hepatopoezu
4. biosintezu hormona unutar feto-placentalnog spoja ploda majke
5. mehanizam implantacije i angiogenezu tijekom placentacije

- ❖ U svinja je koncentracija leptina viša u placentama koje opskrbljuju normalne fetuse od onih koje opskrbljuje retardirane fetuse, a koji se nalaze u istoj maternici
- ❖ Pokusi na ovcama su pokazali da porast koncentracije leptina u gravidnih ovaca potječe ispočetka od citotrofoblasta, potom od placente te konačno od masnog tkiva ploda
- ❖ Koncentracija leptina u krvi ostaje povišena tijekom cijele gravidnosti i rapidno opada nakon poroda, u ljudi, krava, ovaca, miševa i štakora

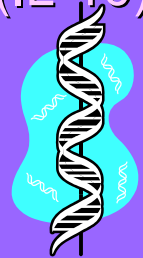


# Biokemijska srodnost leptina i ostalih citokina vezanih za gravidnost (pregnancy associated cytokines)

- **Root:** scop
- **Class:** All alpha proteins
- **Fold:** 4-helical cytokines
- **Family:** citokini dugog lanca
- **Protein:**
  - Leptin
  - Placentalni laktogen

Interferoni/interleukin-10 (IL-10)

interferon-tau



# Mogućnosti, prednosti i mane svih navedenih metoda



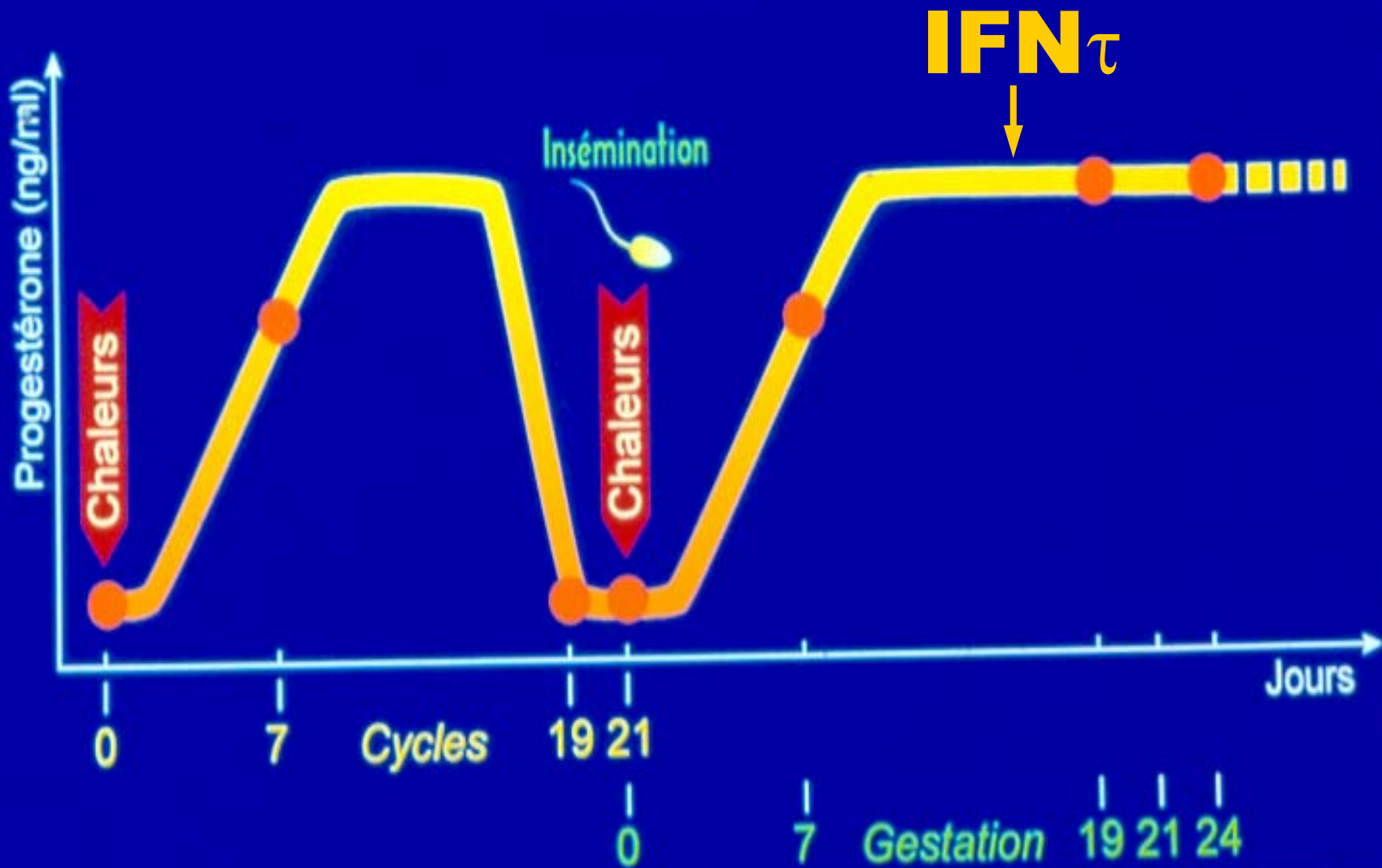
# PAG (pregnancy associated glycoproteins)

- ❖ Najviše su se dosad koristili u ranoj dijagnostici graviditeta
- ❖ Mogu se dokazati direktno iz seruma serološkom metodom RIA
- ❖ Njihova koncentracija ostaje visoka u serumu i do 70 dana nakon uginuća ploda, odnosno poroda, pa iako dokazuje da je u organizmu majke postojao vitalan plod, ne može se koristiti kao biomarker rane embrionalne smrtnosti

# INTERFERON $\tau$

- ❖ može služiti kao biomarker vitalnosti embrija i rane embrionalne smrtnosti
- ❖ izlučuje se lokalno, pa ga je moguće dokazivati samo *in vitro* iz kultiviranih embrija i to indirektno putem prevencije citopatogenog efekta
- ❖ Nije pogodan za rutinsku dijagnostiku gravidnosti

# Taux de progestérone pendant le cycle et la gestation



# PLACENTALNI LAKTOGEN

- ❖ Odras je rasta i razvoja ploda, njegove viabilnosti i vitaliteta
- ❖ Koncentracija mu je značajno viša u cirkulaciji ploda nego u cirkulaciji majke
- ❖ Može se mjeriti isključivo direktno iz seruma ploda

# LEPTIN

- ❖ Dosad nije korišten u rutinskoj dijagnostici gravidnosti
- ❖ Njegova koncentracija raste u ranoj gravidnosti i ovisi o vitalnosti i broju plodova
- ❖ Može se dokazati direktno u serumu metodama RIA i ELISA
- ❖ Mana mu je što na njegovu koncentraciju direktno utječu i sve promjene masnog tkiva, kondicije, BCS (body condition score)

Smatramo da je ako se uzmu u obzir gornji parametri idealan potencijalni biomarker rane embrionalne smrtnosti.



# Materijali i metode

3 skupine po 35 krava:

- ❖ Kontrolna skupina (negravidne krave)
- ❖ Gravidne krave (U. O.)
- ❖ Gravidne krave (embriotransfer)



Plan je bio izmjeriti i usporediti:

- ✓ Progesteron u serumu- putem ELISA
- ✓ PAG u serumu- putem RIA
- ✓ Leptin u serumu putem ELISA
- ✓ Leptin u serumu putem RIA



Svim gravidnim kravama u pokusu gravidnost je dijagnosticirana 20. i potvrđena 35. dan

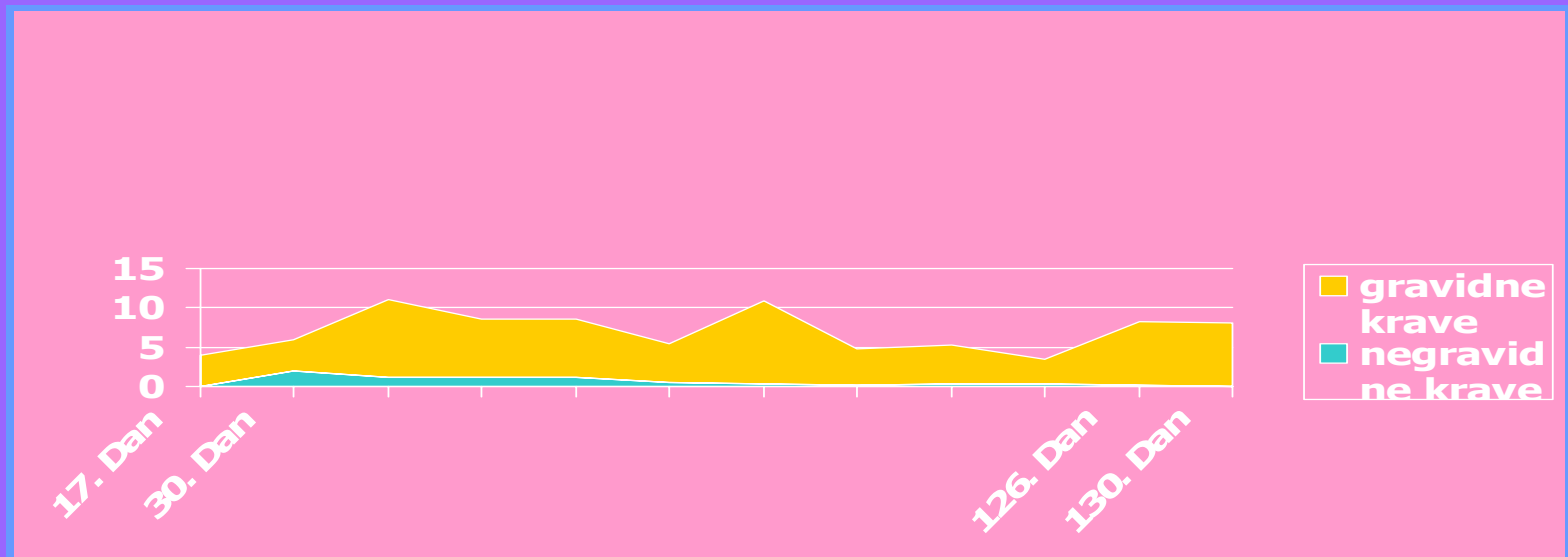
\*U slučaju visoke embrionalne smrtnosti određivati ćemo interferon tau u kultiviranih embrija koristeći antivirusni bioassay in vitro (indirektno putem prevencije patocitogenog efekta)

## DO SADA SMO NAPRAVILI:

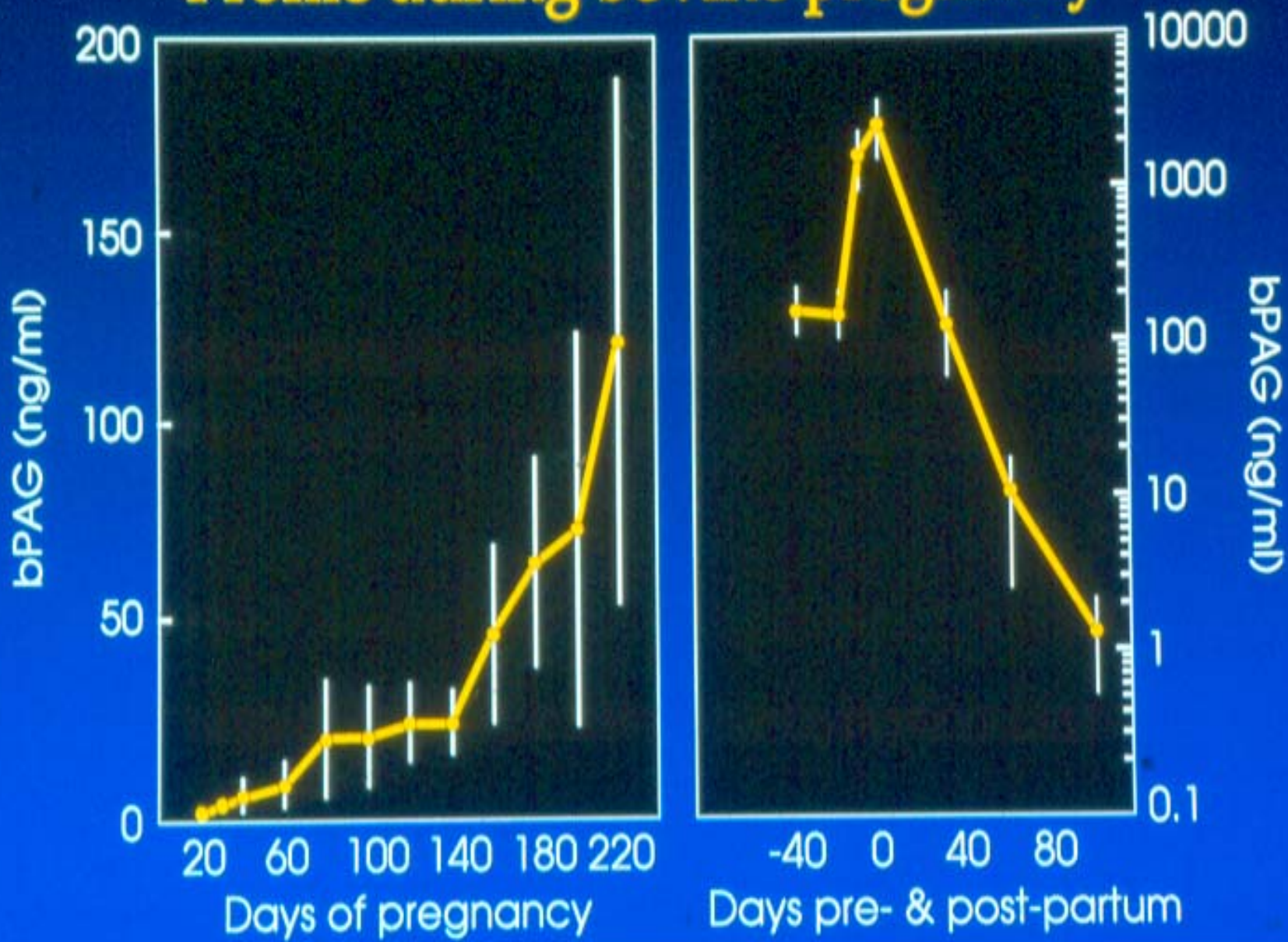
- ❖ Kravama u kontrolnoj negravidnoj skupini krv je uzimana 30. dan po porodu i potom do koncepcije odnosno izlučenja
- ❖ Kravama u gravidnoj skupini krv je uzimana 1. 5. 15. 21., 24. 30 i 35. Dan
- ❖ Sve životinje su redovito pregledavane klinički i posredstvom ultrazvuka
- ❖ Na svim uzorcima je serološkom metodom ELISA i RIA određena koncentracija progesterona
- ❖ Na svim uzorcima je serološkom metodom RIA određena koncentracija progesterona i PAG



# Razina progesterona u gravidnih i negravidnih krava u pokusu



# Profile during bovine pregnancy



Profili dobiveni za leptin ukazuju da kod mliječnih krava nema dijagnostičku važnost, što se objašnjava visokim proizvodnim zahtjevima koje traži uspostava laktacije.

## Institucije i laboratoriji koji sudjeluju u projektu:

- ❖ Laboratorij za asistiranu reprodukciju, Klinike za porodništvo, Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu
- ❖ Laboratorij Odjela za fiziologiju reprodukcije, Veterinarskog fakulteta u Liege-u, Belgija
- ❖ Laboratorij Centra za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske
- ❖ Serološki i ostali laboratoriji Hrvatskog veterinarskog instituta
- ❖ Laboratorij Centra za reprodukciju u stočarstvu Hrvatske
- ❖ Veterinarska stanica Vrbovec
- ❖ Veterinarska stanica "Mliječni put", Ludbreg



# Posebno želim zahvaliti:

- Prof. dr. sc. Antunu Tomaškoviću, Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Prof. dr. sc. Urbanu Besenfelderu, Institut za biotehnologiju, Veterinarski fakultet u Beču,
- Prof. dr. Christine Aurich, Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet u Beču
- Prof. dr. sc. Gottfriedu Brehmu, Institut Ludwig-Maximillian, Veterinarski fakultet u Münchenu,
- Prof. dr. sc. Gjuli Huszeniczi, Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet u Budimpešti
- Prof. dr. sc. Jean Francois Beckersu, Zavod za fiziologiju reprodukcije, Veterinarski fakultet Liege, Belgija



*Hvala na strpljenju i pažnji i Svima ostalima  
koji su mi davali savjete, aktivno  
pomagali, te svima Vama koji ste me  
slušali!!!!*



*Pitanja??!!*