

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Isidora S. Protić

**ACETILACIJA α -TUBULINA I EKSPRESIJA
TRANSPORTERA CINKA ZIP6, ZIP10 I ZIP14
KAO MARKERA STRUKTURNE I
FUNKCIJSKE HETEROGENOSTI HUMANIH
SPERMATOZOIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Isidora S. Protić

**ACETILATION OF α -TUBULIN AND
EXPRESSION OF ZINC TRANSPORTERS
ZIP6, ZIP10 AND ZIP14 AS MARKERS OF
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL
HETEROGENITY OF HUMAN SPERMATOZOA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI

dr Aleksandra Korać

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Snežana Vidaković

redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

dr Bato Korać

vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Igor Golić

viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Lidija Tulić

docent

Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

DATUM ODBRANE: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija urađena je na osnovu odobrenja Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije broj 1730/12 od 17.09.2015. godine.

Deo disertacije koji se odnosi na prikupljanje podataka i eksperimentalnog materijala je rađen u Kliničkom centru Srbije a drugi, veći deo na Katedri za biologiju ćelija i tkiva i pri Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Rad je realizovan pod rukovodstvom prof. dr Aleksandre Korać i prof. dr Snežane Vidaković.

Drago mi je da mogu da se zahvalim svima koji su doprineli izradi ove doktorske disertacije i to pre svega:

Prof. dr Aleksandri Korać, mom mentoru, izuzetnoj osobi koja je mi bezuslovno pomogla onda kada sam mislila da to nije moguće. Njeno bezrezervno razumevanje, strpljenje, istrajnost, stručna, tehnička i svaka druga pomoć u toku naučnog, eksperimentalnog i akademskog rada kao i pri pisanju teze su doprineli uspešnom završetku ovog rada. Njoj dugujem neizmernu zahvalnost i poštovanje.

Prof. dr Snežani Vidaković, mom drugom mentoru, što je uvek bila tu kada je trebalo i što me je podržavala.

Dr Igoru Goliću na savetima, pomoći u eksperimentalnom radu kao i na tehničkoj i statističkoj izvedbi.

Zahvalna sam i članovima odeljenja Medicinski potpomognute oplodnje Klinike za ginekologiju i akušerstvo Univerzitetskog kliničkog centra Srbije, i to kako biološko laboratorijskom delu tako i lekarskom i sestrijskom. Svi su oni na neki način učestvovali u prikupljanju podataka i eksperimentalnog materijala za izradu ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem članovima Katedre za biologiju ćelija i tkiva i Centra za elektronsku mikroskopiju jer su uspeli da podnesu sva moja početna neznanja, obuku i posebno eksperimentalni rad.

Na kraju, izuzetnu zahvalnost dugujem mojim izuzetnim roditeljima, majci i pokojnom ocu koji su uvek u životu bili uz mene. Njima je ovaj rad posvećen.

ACETILACIJA α -TUBULINA I EKSPRESIJA TRANSPORTERA CINKA ZIP6, ZIP10 I ZIP14 KAO MARKERA STRUKTURNE I FUNKCIJSKE HETEROGENOSTI HUMANIH SPERMATOZOIDA

REZIME

Muška neplodnost je primarni ili doprinoseći uzrok u 40% slučajeva neplodnosti para. Pored trenutne dijagnostike utvrđivanja muške neplodnosti svakodnevno se nameće potreba za novim načinima procene fertilizaciono sposobnih spermatozoida.

Pokretljivost spermatozoida, odnosno njihova sposobnost za oplodnju, strukturno zavisi od tubulinskog koda – ekspresije specifičnih tipova tubulina koji grade centriole i flagelum, i acetilacije tubulina kao najzastupljenije post-translacione modifikacije (PTM). Funkcijski, pokretljivost spermatozoida zavisi i od cink koda koji je regulisan ekspresijom i lokalizacijom specifičnih transportera cinka, importera – ZIP i eksportera – ZnT.

Cilj rada bilo je utvrđivanje ćelijske i molekulske osnove heterogenosti spermatozoida na nivou tubulinskog i cink koda. Korišćeni su uzorci sperme pacijenata u postupku biomedicinski potpomognute oplodnje i to intrauterine inseminacije koji su klasifikovani prema uputstvu Svetske zdravstvene organizacije kao normo- i astenozoospermični. U analizi su korišćeni nativni i uzorci obrađeni po modifikovanom metodu centrifugiranja u gradijentu. Imunocitohemija je korišćena za prikaz ekspresije i lokalizacije α -tubulina i acetilovanog α -tubulina putem svetlosne mikroskopije. Imunofluorescencija je korišćena za karakterizaciju ekspresije i lokalizacije α -tubulina, acetilovanog α -tubulina i tri različita tipa ZIP transportera u ejakulisanim spermatozoidima normo- i astenozoospermičnih uzoraka sperme.

Detekcija imunofluorescencijom je pokazala heterogenu lokalizaciju i zastupljenost imunopozitivnosti α -tubulina i acetilovanog α -tubulina. Acetilovani α -tubulin je bio prisutan u repu i jedru normozoospermičnih spermatozoida. Za acetilovani α -tubulin je više imunopozitivnosti bilo u repu, a manje u jedru astenozoospermičnih u poređenju sa normozoospermičnim uzorcima. ZIP6, ZIP10 i ZIP14 su pokazali heterogenu ekspresiju spermatozoida i različitu distribuciju u subkompartimentima spermatozoida. U oba tipa uzoraka, ZIP6 i ZIP14 su bili pretežno lokalizovani u glavi, dok je ZIP10 lokalizovan isključivo duž repa spermatozoida. Astenozoospermija nije uticala na lokalizaciju ni jednog od ZIP transportera u kompartimentima spermatozoida, međutim kod lokalizacije subkompartimenta u regionima glave spermatozoida, za ZIP6, astenozoospermija je snizila imunoekspresiju žir/polmesecečaste forme. ZIP14 imunolokalizacija je izmenjena u korist forme nalik polumesecu.

Imunolokalizacija acetilovanog α -tubulina može doprineti heterogenosti jedara između spermatozoida u odnosu na imunolokalizaciju i različitu ekspresiju i distribuciju ZIP transportera u subkompartimentima spermatozoida, a naši rezultati pokazuju da postoji heterogenost između spermatozoida u normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima.

Buduća detaljna analiza tubulinskih PTM u humanim spermatozoidima mogla bi pružiti dodatne informacije o funkcijama zasnovanim na mikrotubulama u ćelijama. Mnoga pitanja ostaju vezana za mehanizam transporta Zn^{2+} , posebno zato što je njegova zastupljenost u vezi sa različitim uslovima životne sredine, kako fiziološkim tako i patološkim i možda može poslužiti u utvrđivanju i/ili tretmanu muške neplodnosti. Usled sve zastupljenijeg individualizovanog pristupa pacijentu u medicini, dodatna istraživanja su potrebna kako bi dala doprinos identifikaciji novih biomarkera heterogenosti koji bi se mogli iskoristiti u dijagnostici u cilju poboljšanja procedura biomedicinski potpomognute oplodnje.

KLJUČNE REČI: humani spermatozoidi, α -tubulin, acetilovani α -tubulin, cink, ZIP, muška neplodnost, IUI, astenozoospermija, normozoospermija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

ACETILATION OF α -TUBULIN AND EXPRESSION OF ZINC TRANSPORTERS ZIP6, ZIP10 AND ZIP14 AS MARKERS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL HETEROGENEITY OF HUMAN SPERMATOZOA

SUMMARY

Male infertility is the primary or contributing cause in 40% of couples' infertility cases. In addition to the current diagnosis of male infertility, the question of new ways of assessing sperm fertilizing capacity arises.

Sperm motility, that is, its role in fertilization structurally depends on the tubulin code – the expression of specific types of tubulin that build centrioles and the flagellum, and tubulin acetylation, as the most abundant post-translational modification (PTM). Functionally, sperm motility depends on zinc code as well and is regulated by expression and localization of specific zinc (Zn^{2+}) transporters – ZIP and – ZnT.

The aim of this study was to determine the cellular and molecular basis of heterogeneity of the spermatozoa at the level of tubulin and zinc code. The sperm samples that were used were from the patients that were undergoing the process intrauterine insemination and were classified according to the WHO instructions as normo- and asthenozoospermic. In the analysis, native and processed samples were used according to the modified gradient centrifugation method. Immunocytochemistry was used to show expression and localization of α -tubulin and acetylated α -tubulin by light microscopy. Immunofluorescence was used to characterize the expression and localization of α -tubulin, acetylated α -tubulin, and three different types of ZIP transporters in ejaculated sperm of normo- and asthenozoospermic sperm samples.

Immunofluorescence detection showed heterogeneous localization and representation of α -tubulin and acetylated α -tubulin immunopositivity. Acetylated α -tubulin was present in the tail and nucleus of normozoospermic sperm samples. For acetylated α -tubulin, more immunopositivity was found in the tail and less in the nucleus of asthenozoospermic compared to normozoospermic samples. ZIP6, ZIP10, and ZIP14 showed heterogeneous sperm expression and different distribution in sperm subcompartments. In both types of samples, ZIP6 and ZIP14 were predominantly localized in the head, while ZIP10 was found along the tail of the sperm. Asthenozoospermia did not affect the localization of ZIPs. With the localization of the subcompartment in the regions of the sperm head, by ZIP6, asthenozoospermia decreased the immunoexpression of acorn / crescent formation. ZIP14 immunostaining was altered in favor of crescent-like formations.

Immunolocalization of acetylated α -tubulin may contribute to heterogeneity of nuclei between spermatozoa with respect to immunolocalization and different expression and distribution of ZIPs in sperm subcompartments, and our results show that there is heterogeneity between spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic samples.

Future detailed analysis of tubulin PTMs in human sperm could provide additional information on microtubule-based functions in cells. Many issues remain related to the mechanisms of Zn^{2+} transport, especially because they are induced by different environmental conditions, both physiological and pathological, and may be useful in the identification and/or treatment of male infertility. Due to individualised approach to patients growing more common, additional research is needed for contribution in identifying new biomarkers of heterogeneity that could be used in diagnostics with the aim of improving biomedically assisted fertilization procedures.

KEYWORDS: human sperm, α -tubulin, acetylated α -tubulin, zinc, ZIP, male infertility, IUI, asthenozoospermia, normozoospermia

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and Tissue Biology

SADRŽAJ:

1. Uvod	1
1.1 Heterogenost ćelija kao biološki pojam.....	1
1.2. Muški reproduktivni sistem.....	2
1.3. Spermatogeneza i sazrevanje spermatozoida.....	2
1.4. Građa spermatozoida.....	3
1.4.1. Građa aksoneme.....	4
1.5. Posttranslacione modifikacije i α -tubulin.....	5
1.6. Cink i muški reproduktivni sistem.....	6
1.6.1. Proteini iz porodice importera cinka (ZIP transporteri).....	7
1.6.2 Cink i transporteri u muškom reproduktivnom sistemu.....	8
1.7. Metoda IUI i biomedicinski potpomognuta oplodnja.....	8
2. Cilj	9
3. Materijali i metodi	10
3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka.....	10
3.2. Rutinska bojenja.....	10
3.3. Određivanje imunolokalizacije.....	10
3.3.1. Imunocitohemija.....	10
3.3.2 Imunofluorescenca.....	11
3.3.3. Imunogold	12
3.4. Kvantifikacija imunopozitivnosti.....	12
3.5 Statistička obrada rezultata.....	12
4. Rezultati	13
4.1. Rutinska bojenja spermatozoida.....	13
4.2.1. Imunopozitivnost za α -tubulin i acetilovani α -tubulin.....	14
4.2.2. Imunopozitivnost na antioksidativne enzime.....	15
4.3. Imunofluorescenca α -tubulina i acetilovanog α -tubulina.....	15
4.4. Imunogold obeležavanje jedra spermatozoida.....	17
4.5. Imunofluorescenca ZIP transportera.....	17
4.5.1. Imunofluorescenca ZIP6.....	17
4.5.2. Imunofluorescenca ZIP10.....	19
4.5.3. Imunofluorescenca ZIP14.....	19
5. Diskusija	22
5.1. Acetilacije.....	22
5.1.1. Acetilacija repova.....	22
5.1.2. Acetilacija glava.....	22

5.2. ZIP.....	23
5.2.1. ZIP su heterogeno eksprimirani u spermatozoidima, dok astenozoospermija indukuje nižu ukupnu imunopozitivnost ZIP6.....	23
5.2.2. ZIP su lokalizovani u različitim kompartmentima, ZIP6 i ZIP14 su nađeni u glavi, dok je ZIP10 lokalizovan potpuno duž repa spermatozoida-.....	23
5.2.3. Specifična subkompartmentalna lokalizacija u glavi za ZIP6 i ZIP14.....	24
6. Zaključci	26
7. Literatura.....	27

1. Uvod

Tokom poslednjih decenija neplodnost u humanoj populaciji je sve prisutnija. Neplodnost pogađa oko 15% populacije širom sveta i u porastu je u poslednjoj deceniji. Iako frekvencija neplodnosti nije precizno okarakterisana jer se razlikuje u različitim regionima sveta, oko 40% slučajeva neplodnosti može se pripisati muškom faktoru, drugih 40% ženskom, a 20% se vezuje za kombinovane probleme infertiliteta oba pola (Agarwal i sar., 2015; Leslie i sar., 2022).

U osnovi povećane incidence muške neplodnosti najčešće leži promena starog načina života i prelazak na moderni, kao i izloženost raznim štetnim faktorima u okruženju (stres, neadekvatna ishrana, pušenje, pretežno sedentarni poslovi itd). Tako problem neplodnosti postaje i javno zdravstveni problem.

Muška neplodnost se u zavisnosti od težine forme neplodnosti može uspešno prevazići putem različitih metoda biomedicinski potpomognute oplodnje (BMPO), metodom intrauterine inseminacije (IUI) ako je u pitanju medicinski blaga forma ili, za teže forme, metodima vantelesne oplodnje (VTO) kao što je klasična *in vitro* fertilizacija (IVF) i intracitoplazmatska injekcija spermatozoida (ICSI).

Uzimajući u obzir uspešnost navedenih tretmana, pored uobičajene dijagnostike za utvrđivanje muške neplodnosti (medicinski pregled, hormonske analize, genetika i spermogram), postavlja se pitanje novih načina procene fertilizaciono sposobnih spermatozoida. Naime, čak i u slučaju normozoospermije radi se o heterogenoj populaciji ćelija među kojima postoje razlike, i to u vidu postojanja spermatozoida sposobnih da oplode jajne ćelije na prirodan način i spermatozoida koji nisu sposobni za oplodnju. Pronalaženja ovih razlika između normalnih i patološki izmenjenih spermatozoida na ćelijskom i molekulskom nivou imperativ je savremene biomedicine radi povećanja uspešnosti oplodnje, bilo spontano ili metodima BMPO.

1.1. Heterogenost ćelija kao biološki pojam

Heterogenost predstavlja suštinsku odliku bioloških sistema koja doprinosi razvoju, diferencijaciji, imuno posredovanim odgovorima, i mnogim drugim funkcijama ćelija, tkiva, organa i organizma. Heterogenost može biti genetskog, negenetskog ili kombinovanog porekla. Negenetska heterogenost može biti izazvana spoljašnjim (npr. mikrookruženje unutar tkiva) i/ili unutrašnjim faktorima (npr. varijacije u ekspresiji proteina).

U medicinskim istraživanjima heterogenost se dugo posmatrala kao mana i razvijani su sve noviji statistički paketi radi smanjivanja njenog uticaja u analizi podataka. Vremenom je postalo jasno da je heterogenost pre pravilo nego izuzetak, tako da se homogenost podataka u analiziranoj populaciji pacijenata i/ili ćelija ne može umanjivati kada se podaci analiziraju i tumače. Analiza heterogenosti je izvor veoma važnih informacija u biološkim i biomedicinskim istraživanjima, a time i u medicinskoj dijagnostici. Merenje heterogenosti najčešće uključuje metode na pojedinačnim ćelijama, pored metoda zasnovanih na populaciji (Altschuler i sar., 2010).

Spermatozoidi predstavljaju ćelije sa najvećom heterogenošću (raznovršnošću), što je očekivano s obzirom na njihovu glavnu ulogu – obezbeđivanje oplodnje. Heterogenost spermatozoida se najčešće ogleda u morfološkim karakteristikama spermatozoida na nivou repa, akrozoma, jedra, citoplazmatskih ostataka itd. Pored tih tako očiglednih razlika u obliku, veličini i prisustvu ćelijskih subkompartmenta izuzetno je važna i raznovrsnost na molekulskom nivou, a koja je veoma malo istražena.

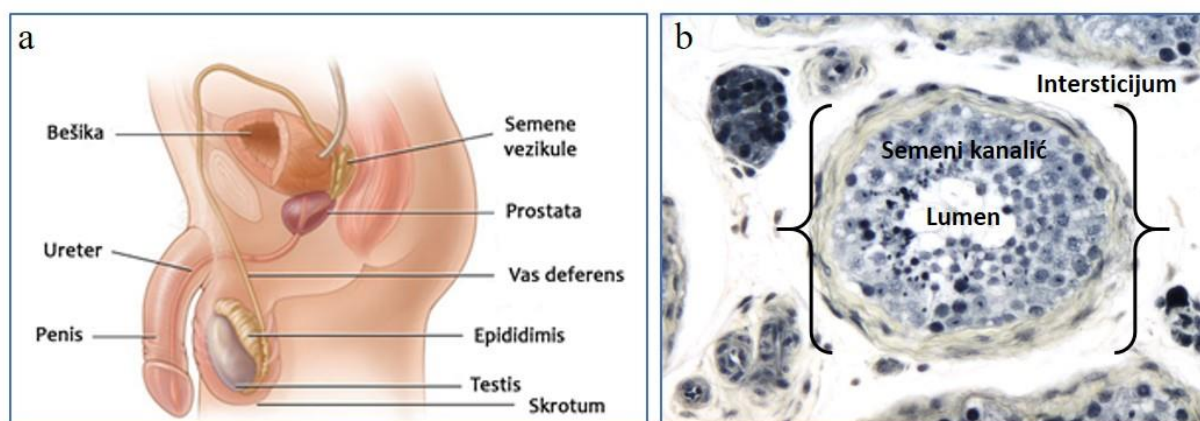
Do sada je jedino opisana heterogenost ejakuliranih spermatozoida kao posledica prolaska kroz epididimis, i koja se na molekulskom nivou ogleda u lokalizaciji i ekspresiji različitih proteina na nivou stabilnosti jedra (kondenzaciji hromatina) (Calvin and Bedford, 1971), kao i kapacitativnoj sposobnosti spermatozoida (Holt i Van Look, 2004; Aguado-García i sar., 2021). Pored pomenutih, moguće je da postoje drugi molekularski markeri koji doprinose heterogenosti spermatozoida, zbog čega su važna stalna istraživanja u nalaženju određenih karakteristika spermatozoida koja doprinose boljem objašnjenju reproduktivne sposobnosti muškaraca. Na taj način doprineće se i boljem tretmanu muške neplodnosti.

1.2. Muški reproduktivni sistem

Muški reproduktivni sistem se sastoji od parnih testisa (Slika 1a). Od testisa polazi jako izuvijan kanal – epididimis na koji se nastavlja *ductus deferens*, a na njega se nastavlja završni deo ovog kanala – *ductus ejaculatorius*. Uz kanale se nalaze žlezde koje stvaraju semenu tečnost: prostata, *glandulae bulbourethralis* i semene kesice a čiji sekreti ulaze u njen sastav. U reproduktivni sistem ulazi i muški polni organ – penis (Meniru, 2004).

Spermatozoidi se formiraju u zidu semenih kanalića testisa u vremenski i prostorno složenom procesu spermatogeneze (Slika 1b).

Poznato je da su spermatozoidi testisa nezreli i da stiču pokretljivost i sposobnost oplodnje (kapacitacije) i preživljavanja prolaskom kroz epididimis. Tokom prolaza kroz epididimis dolazi do oslobađanja i apsorpcije tečnosti (semena tečnost), jona i antioksidanata pod uticajem makromolekula koje luče akcesorne žlezde (James i sar., 2020).



Slika1. (a) Šematski prikaz bočnog preseka muškog reproduktivnog sistema, preuzeto i prerađeno sa biology4igcse.weebly.com; (b) Presek humanog testisa, orig. mikrografija sa svetlosnog mikroskopa, uvećanje x40.

1.3. Spermatogeneza i sazrevanje spermatozoida

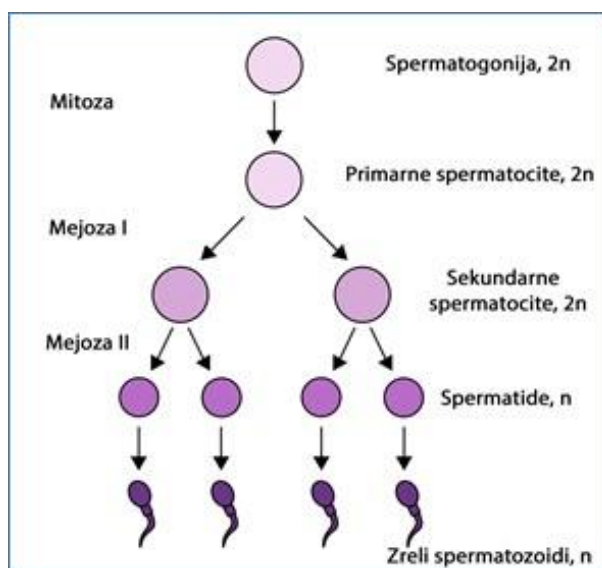
Spermatogeneza je proces formiranja spermatozoida od primarnih germinativnih ćelija koja se odvija od početka puberteta do kraja reproduktivnog perioda čoveka. Ceo ciklus traje oko 74 dana, odvija se u semenim kanalićima i izdelfen je na nekoliko faza (Slika 2).

Spermatogonijalna faza obuhvata formiranje spermatogonija. Primarne germinativne ćelije, mitotičkim deobama, daju spermatogonije tipa A. Nakon nekoliko deoba neke od spermatogonija tipa A prelaze u spermatogonije tipa B. Spermatogonije tipa B mitotičkim deobama daju primarne spermatocite.

U spermatocitnoj fazi dolazi do pripreme ćelije za mejotičku deobu tokom koje će doći do razmene genetskog materijala i redukcije broja hromozoma. Na kraju prve mejotičke deobe nastaju sekundarne spermatocite sa haploidnim brojem hromozoma, koje će na kraju mejoze II dati spermatide (Chen i sar., 2017).

U sledećoj i poslednjoj fazi, spermiogenezi, dolazi do formiranja spermatozoida od spermatida. U ovoj fazi dolazi do modifikacije jedra, formiranja repa i konačnog remodeliranja i oslobađanja formiranih spermatozoida u lumen testisa (spermijacija). U okviru modifikacije jedra dolazi i do remodeliranja jedra i do kondenzacije hromatina. Remodeliranje jedra i kondenzacija podrazumeva odstranjivanje histona iz DNK, na čije mesto dolaze prelazni proteini TP1 i TP2 (*eng.* transitional proteins), a zatim protamini (Ward i Coffey, 1991; Steger 1999). Disulfidne veze između cistein bogatih protamina su odgovorne za kompakciju hromatina koji postaje genetski inaktivan najvećim delom. Genom je na ovaj način zaštićen od oksidacije i rasta temperature u ženskom reproduktivnom traktu (Zini i Libman, 2006). To znači da se usled nedostatka

transkripcije, a radi sinteze proteina koji su neophodni za završetak spermiogeneze, najvećim delom koristi magacionirana iRNK (Steger, 1999).

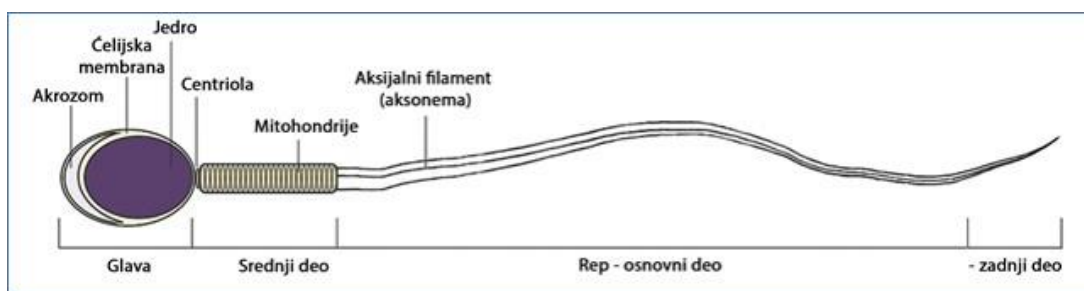


Slika. 2. Spermatogeneza, preuzeto i prerađeno sa *medbullets.com*.

Formiranje repa počinje neposredno nakon mejoze II obrazovanjem aksoneme pomoću distalne centriole. Kako se spermicide izdužuju dolazi do migriranja mitohondrija u osnovu repa gde se izdužuju, povećavaju svoju zapreminu i spiralno se uvijaju oko aksoneme. Rep se izdužuje dodavanjem subjedinića mikrotubula na distalne krajeve rastućih mikrotubula u aksonemi. Zreli spermatozoidi se oslobađaju u lumen kanalića testisa konstrikcijom, otklanjajući višak citoplazme sa spermatozoida (O'Donnell, 2015).

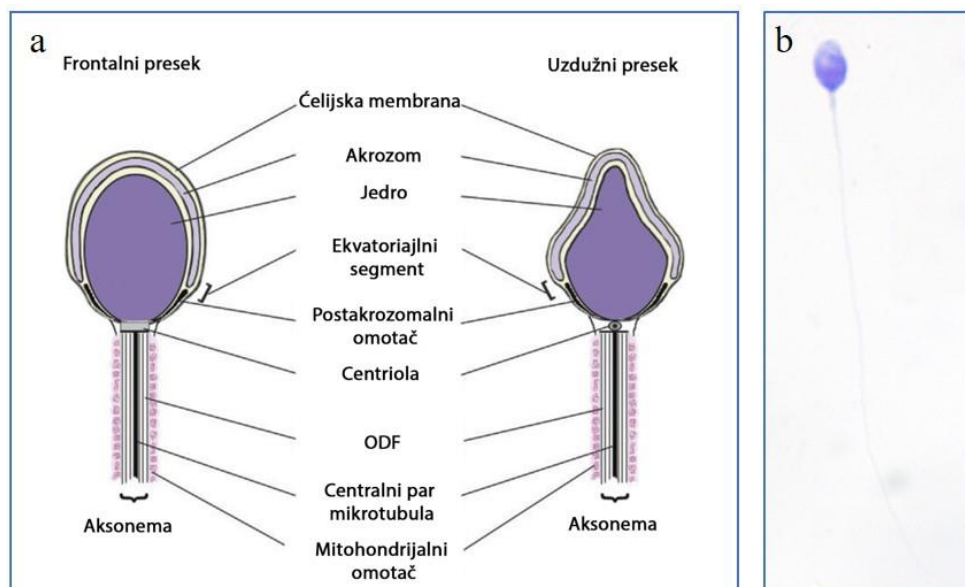
1.4. Građa spermatozoida

Glavni kompartimenti spermatozoida su glava, vrat/srednji deo i rep. Na repu, pored vrata, razlikujemo srednji deo, osnovni (*pars principalis*) i zadnji deo (*pars terminalis*) (Slika 3).



Slika 3. Građa spermatozoida, preuzeto i prerađeno iz Rothman i Bort, 2018.

Glava spermatozoida je ovalnog oblika gledano sa prednje strane, a kruškastog oblika posmatrano bočno i delimično spljoštena (Slika 4a i 4b). Jedro zauzima centralni deo glave, a u anteriornom delu, u vidu kape, nalazi se akrozom koji sadrži proteolitičke enzime neophodne za penetraciju oocite. Zadnji deo akrozoma koji je uži od prednjeg dela i različite gustine se naziva ekvatorijalni deo. Deo glave iza zadnje ivice akrozoma predstavlja postakrozomalno područje.



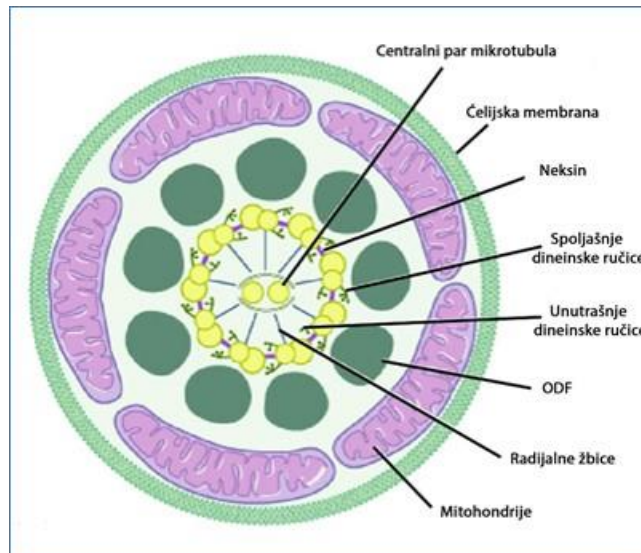
Slika 4. (a) Dijagram frontalnog i uzdužnog preseka spermatozoida u nivou glave i vrata, preuzeto i prerađeno iz Rothman i Bort, 2018; (b) Slika humanog spermatozoida, bojenje hematoksilinom. Orig. uvećanje x20.

Srednji deo uključuje vratni region kao i vezni i prednji deo repa. Glava se preko svoje konkavne depresije vezuje za konveksni vratni region koji se naziva vezni deo. Vratni region, kao osnova repa, sadrži proksimalnu centriolu koja se nalazi u depresiji u veznom delu i ostatke distalne centriole koja se odstranjuje za vreme razvića veznog dela. U središnjem delu se nalazi motorni aparat repa spermatozoida – aksonema koja je okružena spoljašnjim gustim vlaknima, ODF (*eng.* outer dense fibres), a oko njih spiralno raspoređenim mitohondrijama.

Rep ima ulogu u potpori i pokretljivosti spermatozoida. Glavni deo repa spermatozoida gubi mitohondrijalni omotač i sadrži aksonemu okruženu spoljašnjim gustim vlaknima, koje okružuje fibrozni omotač. U završnom delu spermatozoida dolazi do sužavanja pa se tako sastavne komponente repa istanjuju i nestaju, ostavljajući samo ostatke aksoneme okružene plazmalemom (Mortimer, 2018).

1.4.1. Građa aksoneme

Aksonema predstavlja motorni aparat repa spermatozoida koja se sastoji od para centralno postavljenih mikrotubula (MT) koje okružuju devet pari mikrotubula, dajući obrazac 9+2 (Mitchell 2004). Centralno postavljene mikrotubule su kompletne i sastoje se od 13 protofilamenata. Svaki spoljašnji dublet se sastoji od dve povezane mikrotubularne subjedinice, A i B (Slika 5). Subjedinica A je kompletna i sastoji se od 13 protofilamenata, dok je subjedinica B nekompletna (u obliku slova C) i sadrži 10 protofilamenata. Par slobodnih nastavaka – dineinske ručice, koje imaju ulogu ATP-aze i omogućavaju preobraćanje hemijske energije u mehaničke pokrete, su vezane za subjedinicu A i dopiru do subjedinice B (Gibbons i Grimstone, 1960; Tilney i sar. 1973). Neksin povezuje periferne dublete, a radijalne žbice prolaze između svakog od devet dubleta i centralnog para (Stephens i sar., 1989; Smith i Yang, 2004). Centralne mikrotubule su međusobno spojene mostom i okružene unutrašnjim omotačem. Aksonema je okružena sa devet ODF koji se protežu duž devet pari mikrotubula. ODF omogućavaju repu pasivnu elastičnost (Olson i sar., 1976; Eddy i sar., 2003). Spiralno raspoređene mitohondrije obezbeđuju energiju za pokretanje spermatozoida (Hirata i sar., 2002). Rep se nadovezuje na aksonemu preko MT i pored potporne uloge učestvuje i u pokretanju spermatozoida.



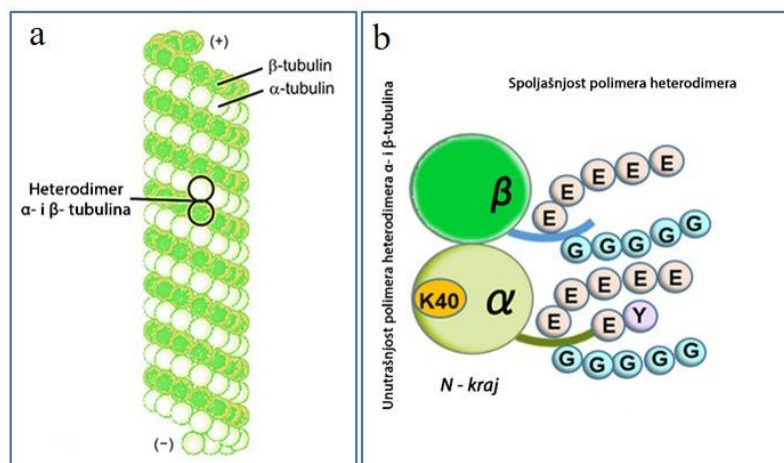
Slika 5. Šematski prikaz aksoneme, preuzeto i prerađeno iz Gunes i sar., 2020.

1.5. Posttranslacione modifikacije i α -tubulin

Izvorna struktura centrozoma i repa modifikuje se posttranslaciono doprinoseći prvenstveno stabilnosti, ali i samoj heterogenosti populacije spermatozoida.

Protofilamenti koji čine MT se sastoje od „end-to-end” polimera heterodimera α - i β -tubulina koji vezuju GTP (Yu i sar., 2015; Slika 6a). Heterodimeri tubulina koji formiraju centriolarne, cilijarne i flagelarne MT su posttranslaciono modifikovani (PTM). α - i β -tubulin prolaze kroz nekoliko PTM kao što su poliglutamilacija, poliglikozilacija, tirozinacija/detirozinacija i acetilacija/deacetilacija.

Acetilacija tubulina je jedinstvena među poznatim modifikacijama tubulina jer se proces odvija na epsilon amino grupi lizina, Lis-40 (K40) na N-terminalnom domenu (kraju) α -tubulina, modifikaciji rezidualnog ostatka koji se projektuje u lumen MT (Kierszenbaum, 2022; Inaba, 2003; Linck i sar., 2016; Slika 6b). Nekoliko enzima može acetilirati α -tubulin u MT (Verhey i Gaertig, 2007), a α -tubulin N-acetiltransferaza 1 (α TAT) predstavlja glavnu α -tubulin acetiltransferazu kod *Tetrahymena* i *C. elegans* (Kalebic i sar., 2013).



Slika 6. (a) Građa polimera heterodimera α - i β -tubulina; (b) šematski prikaz acetilacije α -tubulina, preuzeto i prerađeno: (a) Gunes i sar., 2020 (b) Nekooki-Machida i sar., 2020.

Uprkos tome što je glavna modifikacija, precizna uloga acetilovanog tubulina u

spermatozoidima nije poznata. Povezanost acetilacije sa dugovečnim MT sugerirše njihovu ulogu u stabilizaciji MT. Međutim, direktni testovi nisu pokazali uticaj acetilacije na dinamiku MT (Bhagwat i sar., 2014). Pored aksoneme, izvorna struktura centriolarnih MT i bazalnih tela je izuzetno stabilna i post-translaciono modifikovana. Mehanizmi koji omogućavaju stabilizaciju centriola kroz PTM još nisu razjašnjeni (Janke i Bulinski, 2011).

Kod većine eukariota α -tubulin se nalazi samo u citoplazmi, dok se u jedru može naći i α - and β -tubulin (Schwarzerova i sar., 2019). Za sada nije poznata uloga mikrotubula ili tubulina u nukleoplazmi osim tokom eukariotske zatvorene mitoze. Prisustvo α - i β -tubulina je takođe zabeleženo u nukleoplazmi humanih kancerskih ćelija u interfazi, kao i u oocitama žabe (*Xenopus sp.*) od istih autora (Schwarzerova i sar., 2019). U humanim spermatozoidima, α -tubulin postoji kao posebna traka (region) unutar apikalnog akrozoma pre i posle kapacitacije u normozoospermičnim uzorcima (Dvorakova i sar., 2005).

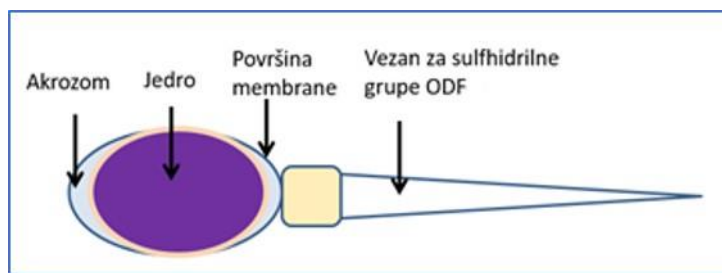
1.6. Cink i muški reproduktivni sistem

Na pokretljivosti spermatozoida utiču i različiti joni. Najviše proučavan svakako je jon kalcijuma (Ca^{2+}) koji najviše utiče na pokretljivost spermatozoida. Osim njega, proučavani su i uticaji jona natrijuma i kalijuma. U poslednje vreme raste broj podataka i o drugim jonima od značaja, kao što je cink (Zn^{2+}).

Cink predstavlja drugi esencijalni element po zastupljenosti u telu (Kambe i sar., 2017). Stalni unos Zn^{2+} je neophodan, pošto u telu nema poznatih specijalizovanih depoa Zn^{2+} (Scott i Bradwell, 1983). Iako je neophodan za svaku ćeliju, subćelijska distribucija i/ili sadržaj Zn^{2+} zavisi od tipa i uloge ćelije. Biološka uloga cinka uključuje signalizaciju, enzimske aktivnosti, regulaciju rasta i polno sazrevanje (Kerns i sar., 2018a). Brojni dokazi ukazuju da Zn^{2+} ima različite uloge u muškom reproduktivnom sistemu, a to su: regulacija strukture i funkcije spermatozoida, spermatogeneza (razvoj od germinativnih ćelija do spermatozoida), sazrevanje spermatozoida u epididimisu, pokretljivost spermatozoida, interakcije spermatozoida sa ženskim reproduktivnim traktom, kapacitacija, oplodnja i razvoj embriona (Foresta i sar., 2014; Kerns i sar., 2018b).

Zn^{2+} igra ključnu ulogu u spermatogenezi na nekoliko načina. Koncentracija Zn^{2+} u testisima se povećava tokom ranog perioda spermatogeneze, kako bi se regulisala spermatogonijalna proliferacija, a germinativne ćelije zaštitile od oštećenja tokom mejoze (Vickram i sar., 2021). Prisustvo Zn^{2+} je relativno visoko tokom razvoja spermatocita zbog njegove uloge tokom kondenzacije DNK, mejoze i njegove opšte akumulacije u ćeliji (Croxford i sar., 2011; Vickram i sar., 2021). Tokom završnih faza diferencijacije, Zn^{2+} spremno ulazi u ćelije spermatida olakšavajući kondenzaciju DNK (Croxford i sar., 2011). Veruje se da cink stabilizuje hromatin tokom kondenzacije DNK vezivanjem za disulfidne veze dajući precizan broj SH-Zn-SH struktura (Khosronezhad i sar., 2015). Pretpostavlja se da dodatna inkorporacija Zn^{2+} u jedro ejakuliranih spermatozoida ima zaštitnu ulogu u dekondenzaciji hromatina, pokretljivosti, metaboličkoj inhibiciji, stabilizaciji membrane i antioksidativnoj aktivnosti (Foresta i sar., 2014; Kerns i sar., 2018a).

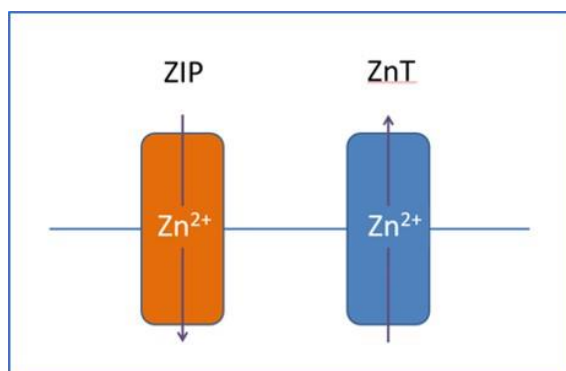
Tokom poslednjih faza spermatogeneze cink se inkorporira u rep spermatozoida gde se vezuje za sulfhidrilne grupe ODF koje obezbeđuju zaštitu od prevremene oksidacije (Lee, 2018). Visoka koncentracija cinka je takođe nađena u akrozomu. On može i posredno da obezbedi energiju za pokretljivost spermatozoida podsticanjem katabolizma lipida u srednjem delu spermatozoida (Fallah i sar., 2018). Zn^{2+} se povezuje sa membranama spermatozoida preko lipoproteina dovodeći do stabilizacije membrane (Bettger i O'Dell, 1981) (Slika 7).



Slika 7. Šematski prikaz prisustva Zn^{2+} u kompartmentima ejakuliranih spermatozoida.

1.6.1. Proteini iz porodice importera cinka (ZIP transporteri)

Pored aksoneme i repa, pokretljivost spermatozoida je regulisana i jonskim transporterima koji direktno doprinose izmeni jonskog sastava spermatozoida njihovim unošenjem ili izbacivanjem. U pogledu ćelijske i subćelijske homeostaze cinka, njegova sofisticirana regulacija preuzimanja, distribucije, skladištenja i efluksa-prenosa kroz biološke membrane se postiže kroz dve porodice proteina (Kambe i sar., 2015), i to proteina iz porodice importera cinka (ZIP; Zrt-, Irt-like) koji transportuju Zn^{2+} u citoplazmu i proteina iz porodice eksportera cinka (ZnT) koji transportuju Zn^{2+} iz citoplazme (Slika 8). Sekvenciranjem genoma identifikovano je 14 članova ZIP i 10 članova ZnT porodica (Kerns i sar., 2018b). ZIP transporteri funkcionišu tako što nadoknađuju citosolni cink iz vanćelijskog prostora i lumena unutarćelijskih kompartmenta. Većina ZIP transportera je lokalizovana u membrani ćelija (Kambe i sar., 2004).



Slika 8. Šematski prikaz transportera cinka: importeri (ZIP; Zrt-, Irt-like) i eksporteri (ZnT).

Humani ZIP su klasifikovani u I, II, LIV-1 i gufA podfamilije. Podfamilija LIV-1 je trenutno ograničena na eukariote. Veliki broj humanih ZIP članova pripada ovoj potporodici uključujući ZIP6, ZIP10 i ZIP14 (Kambe i sar., 2004).

U somatskim ćelijama ekspresija, lokalizacija i funkcija ZIP transportera je relativno dobro proučena kako u fiziološkim, tako i u patološkim uslovima. U polnim ćelijama, transporteri cinka najbolje su proučeni kod jajne ćelije sisara gde je unos cinka neophodan za pravilnu oogenezu i sazrevanje jajne ćelije.

Dosadašnji podaci u pogledu ZIP6, ZIP10 i ZIP14 su uglavnom vezani za različite vidove kancerogenih stanja u različitim tipovima tkiva. Njihova izmenjena ekspresija tokom infliksa cinka iz vanćelijskog prostora može biti povezana sa progresijom kancera i predstavljati faktor rasta (Zhao i sar., 2007; Shen i sar., 2013). ZIP10 je nezamenjiv u ranom razvoju i preživljavanju B limfocita, kao i u njihovom sazrevanju za ispravan imunski humani humoralni odgovor nakon stimulacije odgovora B limfocita (Hojyo i sar., 2014; Miyai i sar., 2014). ZIP10, zajedno sa ZIP6, s obzirom da su bliski homolozi maternalnog porekla, utiče na ćelije kancera dojke tako što stimuliše povećani unos glukoze (Liuzzi i sar., 2005; Taylor i sar., 2016). ZIP14 ima dve izoforme, ZIP14A i

ZIP14B (Girijashanker i sar., 2008), koje pored cinka mogu da mobilišu različite dvovalentne katjone (Fujishiro i sar., 2012).

1.6.2. Cink i transporteri u muškom reproduktivnom sistemu

Ekspresija i funkcija transportera cinka u muškim germinativnim ćelijama, iako se retko nalaze u literaturi, jasno sugerišu da je njihova uloga u kontroli unosa cinka. Različiti ZIP proteini su prisutni tokom spermatogeneze u različitim tipovima ćelija kod miševa (ZIP1, ZIP5, ZIP6, ZIP8, ZIP10 i ZIP14) i ljudi (ZIP1, ZIP5, ZIP6, ZIP8), što sugeriše njihovu ulogu u unosu Zn^{2+} u određenoj fazi formiranja spermatozoida (Croxford i sar., 2011; Foresta i sar., 2014). Međutim, podaci o njihovom ukupnom doprinosu tek treba da se razjasne (Foresta i sar., 2014). Kod miševa je ZIP6 eksprimiran u okruglim i izduženim spermatidima, dok je humani ZIP6 detektovan među svim stadijumima spermatogonijalnih ćelija i spermatozoidima testisa. ZIP10 je imunoeksprimiran u primarnim spermatocitima i okruglim spermatidima miševa, dok ZIP10 nije istraživao u uzorcima testisa kod ljudi. Zanimljivo je da je ZIP14, koji je ustanovljen u gore pomenutoj studiji na miševima, bio prisutan u spermatogonijama, ali nije pronađen u studiji na ljudima. Zhu i saradnici (2022) su ispitivali ZIP12 imunolokalizaciju u humanim testisima, gde su otkrili njegovo prisustvo u glavi spermatozoida i središnjem delu spermatozoida. Što se tiče ekspresije ZIP6, ZIP10 i ZIP14 u humanim spermatozoidima, mali broj studija se bavio ispitivanjem ekspresije ovih transportera.

1.7. Metoda IUI i biomedicinski potpomognuta oplodnja

Različiti parametri u nativnim uzorcima sperme mogu biti ograničavajući faktori i narušavati kvalitet sperme. Ovo uključuje leukocite, nezrele spermatozoide, spermatozoidna antitela, hiperviskozitet semena i biohemijske markere koji odražavaju funkcionalni status pomoćnih polnih žlezda. Obradom nativne sperme za postupke IUI se pomenuti ograničavajući faktori mogu prevazići. IUI (intrauterina inseminacija) predstavlja jednostavnu i neinvazivnu tehniku, koja se najčešće koristi za prevazilaženje neobjašnjenih i blagih faktora muške neplodnosti. Trenutne globalne preporuke za korišćenje IUI kao prve opcije lečenja za neplodne parove koji uključuju blagu mušku neplodnost zahteva ukupan broj pokretnih spermatozoida veći od 10 miliona (Cohlen i sar., 2018). Normozoospermični uzorci sperme treba, prema određenim kriterijumima, da sadrže spermatozoide sa normalnim fertilizacionim potencijalom za razliku od astenozoospermičnih uzoraka koji sadrže spermatozoide niske pokretljivosti. Sa androloškog stanovišta, slaba pokretljivost kod astenozoospermije se definiše prema preporukama SZO iz 2010. ili 2021. godine (WHO, 2010, 2021). Iako se spermatozoidi mogu klasifikovati kao „normalni“ ako se samo posmatra njihova morfologija, pokretljivost i koncentracija, oni mogu biti defektni na subćelijskom i/ili molekulskom nivou (Amargant i sar., 2019). Ovo postavlja pitanje koji se tiče pokretljivosti i sposobnosti za oplodnju spermatozoida nakon obrade za IUI, tako da je veoma važno da se detaljno istraži ćelijski i molekulski osnov različitosti (heterogenosti) spermatozoida.

2. Cilj

Spermatozidi se međusobno razlikuju po fertilizacionoj sposobnosti kroz strukturnu zrelost i pokretljivost ali i sposobnost kapacitacije, akrozomalne reakcije i samog procesa oplodnje. Sve te karakteristike zavise ne samo od elemenata na ćelijskom već i na molekulskom nivou. Spermatozidi mogu biti klasifikovani kao normalni u smislu morfologije, pokretljivosti i koncentracije, a pritom biti izmenjeni na subćelijskom i/ili molekulskom nivou. Raznovrsnost razlika (strukturnih i funkcijskih), doprinosi heterogenosti spermatozida koja se direktno odražava na njihovu glavnu ulogu, postizanje uspešne oplodnje.

S obzirom na raznovrsnost problema u utvrđivanju uzroka muške neplodnosti na nivou spermatozoida, sagledavanje njihove heterogenosti u cilju upoznavanja molekulskih markera i razlika među njima postavljeno je kroz ciljeve rada:

- utvrđivanje ćelijske i molekulske osnove njihove heterogenosti;
- praćenje strukturne heterogenosti na nivou PTM α -tubulina;
- praćenje funkcijske heterogenosti na nivou ekspresije transportera cinka ZIP6, ZIP10 i ZIP14;
- ispitivanje njihovog prisustva, imunolokalizacije i distribucije u subdomenima spermatozoida;
- utvrđivanje i poređenje efekata obrade sperme za IUI u odnosu na nativan uzorak.

Ovako dobijeni rezultati mogu dati doprinos identifikaciji novih biomarkera heterogenosti koji mogu da se iskoriste u dijagnostici a radi poboljšanja uspešnosti asistiranе reprodukcije.

3. Materijali i metodi

3.1. Prikupljanje i priprema uzoraka

U ovoj studiji korišćeni su spermatozoidi normozoospermičnih i astenozoospermičnih muških pacijenata koji su bili na postupku IUI sa svojim partnerkama na Odeljenju za medicinski potpomognutu oplodnju Klinike za ginekologiju i akušerstvo „Višegradska” Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Uzorci semena (ćelije spermatozoida) su sakupljeni nakon dobijanja pismene informisane saglasnosti u cilju prikupljanja uzoraka u naučno-istraživačke svrhe. Odobrenje za rad je dobijeno od Etičkog odbora Univerzitetskog Kliničkog centra Srbije, na sednici održanoj 17.09.2015. (broj 1730/12).

Klasifikacija uzoraka spermatozoida je urađena prema kriterijumima koje je utvrdila Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO), 2010 ili 2021. Procenjeni su parametri na osnovu kojih se uzorci semena klasifikuju kao normozoospermija u slučaju: koncentracije >15 ili unutar opsega $10-20 \times 10^6$ spermatozoida ml^{-1} , sa progresivnom pokretljivošću >32 ili $>35\%$, ukupnom pokretljivošću spermatozoida >40 ili 50% i spermatozoida sa normalnom morfologijom >4 ili unutar opsega $4-13\%$. Astenozoospermične uzorke odlikuju spermatozoidi smanjene pokretljivosti koji se definišu kao <40 ili 50% normalne pokretljivosti spermatozoida; <32 ili 35% progresivne pokretljivosti prema SZO (WHO, 2010, 2021).

Analize su vršene na nativnim i ispranim uzorcima razmaza spermatozoida. Da bi se uklonile nespermatične ćelije, leukociti i nepokretni spermatozoidi, uzorci su prečišćeni centrifugiranjem modifikovanom metodom gradijenta gustine. Za centrifugiranje su korišćeni pripremljeni rastvori SpermGrad od 90% i 45% (Vitrolife®, Švedska). Prvo je rađeno centrifugiranje 20 min na 300 g, a zatim dva centrifugiranja $300-600$ g u trajanju od $10-15$ min, uz jednostruko ispiranje između svakog centrifugiranja sa 5 ml 0.9% natrijum-hlorida (NaCl 9 g/L). Na kraju, centrifugiran talog je resuspendovan u $0,5$ ml 0.9% rastvora NaCl (Protić i sar., 2022).

3.2. Rutinska bojenja

Razmazi spermatozoida su bojeni različitim bojama za posmatranje na nivou svetlosne mikroskopije (hematoksilin, toluidin, anilinsko plavo-oranž G, sudan crno B, metilensko zeleno) za prikaz morfologije spermatozoida. Razmazi spermatozoida su dobijeni putem metode „swim-up“ odnosno isplivavanja spermatozoida. Seme se ispira sa 5 ml prethodno ekvilibrisanog medijuma (Sperm rinse, Vitrolife®, Švedska), koji se centrifugira brzinom od $600-900$ g, nakon čega dobijeni talog se resuspenduje i preliva sa 1 ml prethodno ekvilibrisanog medijuma (G-IVF, Vitrolife®, Švedska). Boje su držane do 2 minuta na pločicama, koje su potom ispirane česmenskom vodom za odstranjivanje viška boje, i nakon sušenja na vazduhu posmatrane svetlosnim mikroskopom (Leica mikroskop DMLB sa Leica kamerom DFC295, Nemačka).

3.3. Određivanje imunolokalizacije

3.3.1. Imunocitohemija

Imunocitohemija je urađena na razmazima nativnih normozoospermičnih uzoraka sperme. Uzorci su nakon fiksacije $10-15$ minuta u metanolu, dodatno fiksirani u acetonu 5 minuta, uz dalju permeabilizaciju sa $0,2\%$ Triton X-100 u PBS-T (*eng.* Phosphate-buffered saline sa Tween, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u trajanju od 4 minuta. Pločice sa razmazima su potom ispirane tri puta po 5 minuta u PBS-T. Blokiranje nespecifičnog vezivanja je urađeno sa Protein Block (Abcam, UK). Razmazi sperme na pločicama mikroskopa su inkubirani sa anti α -tubulin primarnim antitelom ($1:500$, T5168, Sigma-Aldrich, Nemačka) i anti acetilovanim α -tubulin primarnim antitelom ($1:100$, sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, SAD) preko noći na 4 °C. Sledećeg dana pločice su tri puta ispirane u PBS-T, inkubirane sa Biotinylated Goat Anti Polyvalent Plus (Abcam, UK), ispirane četiri puta u PBS-T i inkubirane sa streptavidin peroksidazom (Streptavidin Peroxidase Plus, Abcam, UK). Nakon tretiranja sa DAB ($3,3'$ -diaminobenzidin, Sigma-Aldrich, Nemačka), pločice su kratko ispirane prvo česmenskom vodom a potom redestilovanom vodom.

Kontrabojenje hematoksilinom je urađeno u trajanju od 2 minuta. Dehidracija je urađena rastućom serijom rastvora alkohola od 96% i 100%, u trajanju od 2 minuta i dva puta po dva minuta u ksilolu, a montirane sa DPX (medijum za montiranje, Sigma-Aldrich, Nemačka) i nakon sušenja pregledane Leica DMLB mikroskopom (Leica Microsystems, Nemačka) (Golić i sar., 2014).

Imunocitohemija je urađena za različite tipove proteina na razmazima ispranih normozoospermičnih uzoraka sperme prema već prethodno opisanom protokolu. Analize su urađene za katalazu (CAT, ab1877, 1:250, Abcam, UK), endotelnu azot oksid sintazu (eNOS; ab66127; 1:80, Abcam, UK), neuronalnu azot oksid sintazu (nNOS, ab95436, 1:100, Abcam, UK), hem oksigenazu 1 (HO1, ab 13243, 1:200), peroksizomalnu acil-koenzim A oksidazu (ACOX1, 1:250, ab184032, Abcam, UK) i fosforilisanu formu histona H3 (pH3, 1:200, ab5176, Abcam, UK).

3.3.2. Imunofluorescenca

Za detekciju imunofluorescence α -tubulina razmazi obrađenih uzoraka sperme na mikroskopskim predmetnim pločicama (Superfrost+) su fiksirani 15 minuta u metanolu i osušeni na vazduhu. Razmazi su potom dodatno fiksirani i permeabilizovani acetonom 5 minuta, uz dalju permeabilizaciju sa 0,3% Triton X-100 u TBS (*eng.* Tris-buffered saline) u trajanju od 10 minuta. Nakon blokiranja sa 0,1% albuminom goveđeg seruma (*eng.* bovine serum albumin, BSA), 3% NGS (normalni kozji serum), 0,2% Triton i 0,05% Tween-20 u TBS tokom 30 minuta, razmazi su inkubirani sa anti α -tubulin primarnim antitelom (1:500, T5168, Sigma-Aldrich, Nemačka) u istom rastvoru za blokiranje 1 h na 37 °C u vlažnoj komori. Nakon što su tri puta isprani u TBS-T (Tris-buffered saline, sa dodatkom deterdženta Tween 20), razmazi sperme su inkubirani sekundarnim antitelom sa Alexa Fluor 488 (1:400, A-11029, Invitrogen, SAD) u rastvoru za blokiranje na sobnoj temperaturi.

Za kolokalizaciju α -tubulina sa acetilovanim α -tubulinom, pločice su potom isprane tri puta u TBS-T, blokirane rastvorom za blokiranje tokom 30 minuta i inkubirane sa anti acetilovanim α -tubulin primarnim antitelom (1:100, sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u istom puferu za blokiranje 1 h na 37 °C. Zatim, isprani u TBS-T tri puta, razmazi su inkubirani sa Alexa Fluor 633 sekundarnim antitelom (1:400, A-21052, Invitrogen, SAD). Kontrabojenje je urađeno nukleusnom bojom Sytox Orange (1:1000, S11368, Life Technologies,) tokom 5 min. Nakon ovog poslednjeg koraka, pločice su isprane u TBS-u i montirane u Mowiolu (SigmaAldrich-Nemačka) (Golić i sar., 2016).

Za detekciju imunofluorescence za ZIP6, ZIP10 i ZIP14, protokol je urađen na razmazima opranih i obrađenih uzoraka semena prema već prethodno opisanom protokolu, gde su korišćena primarna antitela ZIP 6 (1:50, PA5-21071, Invitrogen, SAD), ZIP 10 (1:50, PA5-21064, Invitrogen, SAD) and ZIP 14 (1:50, PA5-21077, Invitrogen, SAD) u rastvoru za blokiranje na 1 h na 37 °C u vlažnoj komori. Nakon ispranja tri puta u TBS-T, razmazi su inkubirani sekundarnim antitelom Alexa Fluor 488 (1:400, A-11029, Invitrogen, SAD) u rastvoru za blokiranje na sobnoj temperaturi. Posle su pločice isprane u TBS i montirane Mowiolom (Sigma-Aldrich, Nemačka).

Dodatne analize imunofluorescence su urađene za antitela na polimerazu II (pol II, sc-899, 1:250, Santa Cruz Biotechnology, SAD), bazalno telo (Lhs28, sc-53224, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, SAD), ninein (sc-376420, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, SAD), naponsko zavisnog anjonskog kanala 1 (*eng.* voltage-dependent anion channel VDAC1, ab34726, 1:100, Abcam, UK) i gama tubulin (ab27076, 1:100, Abcam, UK).

Slike su dobijene pomoću Leica TCS SP5 II konfokalnog mikroskopa (Leica Microsystems) u sekvencijalnom režimu da bi se izbeglo preklapanje između odgovarajućih kanala. Uzorci su ekscitovani Ar laserom talasne dužine od 488 nm i HeNe laserom talasne dužine od 633 nm. Nukleusi su detektovani korišćenjem HeNe lasera talasne dužine od 543 nm i vizualizovani plavom bojom za jasno razlikovanje zelenih (α -tubulin i ZIP) i crvenih kanala (acetilovani α -tubulin). Specifičnost imunofluorescencije je ispitivana izostavljanjem primarnih antitela. Negativne kontrole su urađene da bi se proverilo neselektivno bojenje.

Validacija anti acetilovanog α -tubulin antitela je potvrđena korišćenjem smrznutih preseka moždanog tkiva pacova kao pozitivne kontrole. Ukratko, delovi moždanog tkiva pacova su inkubirani sa rastvorom za blokiranje 30 minuta, a kasnije inkubirani sa anti acetilovanim α -tubulin primarnim antitelom (1:100, sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u istom rastvoru za blokiranje 1 h na 37 °C. Nakon tri ispiranja u TBS-T, preseci su inkubirani sa Alexa Fluor 633 sekundarnim antitelom (1:400, A-21052, Invitrogen, SAD). Kasnije su preseci isprani u TBS i montirani Mowiolom.

3.3.3. Imunogold

Da bismo identifikovali lokalizaciju acetilovanog α -tubulina na nivou ultrastrukture, koristili smo imunogold analizu. Korišćeni su ultra tanki preseci uzoraka ukalupljenih u Araldit smoli i nasečenih na Leica UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems, Nemačka). Oni su montirani na niklovane mrežice presvučene olovkom za poboljšanje adhezije preseka (Coat-Quick "G", Agar Scientific Ltd, UK). Nakon otkrivanja epitopa antigena u citratnom puferu i blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela inkubacijom u 5% BSA u TBS-T, mrežice su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa primarnim antitelom anti acetilovanog α -tubulina (1:100, sc-23950, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Nakon ispiranja u TBS-T, mrežice su inkubirane sa anti-zečjim sekundarnim antitelom obeleženog česticama zlata dijametra 10 nm (1:20, ab27234, Abcam, UK). Nakon ispiranja 10 puta u TBS-T i pet puta u dH₂O, mrežice su osušene na vazduhu. Preseci su posmatrani i snimani na transmisionom elektronskom mikroskopu Philips CM12 (Philips/FEI, Holandija) (Golić i sar., 2016).

3.4. Kvantifikacija imunopozitivnosti

Imunopozitivnost za spermatozoide je analizirana korišćenjem softvera ImageJ (1.52p, NIH, SAD). Za kvantifikaciju su uzimana polja sa više od 100 spermatozoida. Za procenat imunopozitivnog bojenja acetilovanog α -tubulina i α -tubulina spermatozoida za svaki uzorak analizirano je pet nasumično odabranih polja gde su izbrojani imunopozitivni spermatozoidi. Za utvrđivanje imunopozitivnih spermatozoida u procentima za ZIPove, njihovih delova (glava, srednji deo i rep), subkompartmenta anteriornog regiona (formacije poput žira, polumeseca, žira/polumeseca) i posteriornog regiona glave pri brojanju je analizirano šest nasumično odabranih polja.

3.5. Statistička obrada rezultata

Statističke analize su urađene korišćenjem Prism 8, verzija 8.4.3. softvera (GraphPad Software, SAD).

Za analizu za acetilovani α -tubulina, normalna distribucija je testirana primenom Šapiro-Vilkovog testa (Shapiro-Wilk normality test). Značajnost razlika između srednjih vrednosti dve grupe testirana je korišćenjem neuparenog dvosmernog t-testa. Za više grupa, primenjena je jednofaktorska dvosmerna analiza varijanse (ANOVA) za poređenje varijacije unutar grupe. Nakon procene ukupnih razlika (varijansi) F testom, poređenja razlika između grupa su procenjena preko višestrukog poređenja Takijevim (Tukey's post hoc) testom. Za najniži stepen značajnosti uzeta je $p < 0.05$.

Za analizu posmatranja prisustva ZIP transportera u kompartmentima i subkompartmentima spermatozoida urađen je neparаметarski Kruskal-Valisov (Kruskal-Wallis) test. Ovaj test je korišćen za testiranje poređenja unutar grupe (između kompartmenata). Ukoliko bi F test pokazao sveukupnu razliku, Dunov (Dunn) test višestrukog poređenja je korišćen za procenu značajnosti razlike. Man-Vitnijev (Mann-Whitney U test) je korišćen za ispitivanje ukupne imunopozitivnosti uzoraka sperme i značajnosti razlika između srednjih vrednosti subkompartmenta glave pojedinačno između dve grupe. Statistička značajnost je uzeta u obzir pri $p < 0,05$.

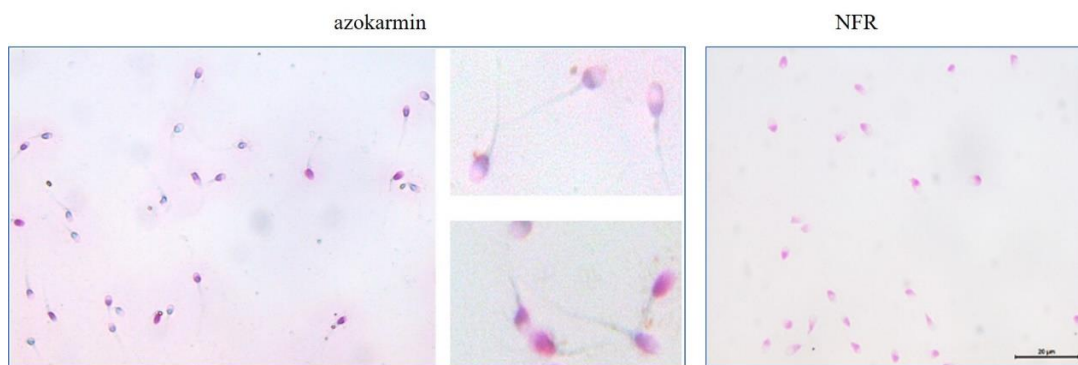
4. Rezultati

Ekperimenti su rađeni na normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima. Isprano i obrađeno seme je dobijeno modifikovanom metodom gradijenta ili „swim-up“ metodom što podrazumeva da su dobijeni spermatozoidi pokretni. Razmazi spermatozoida korišćeni su za rutinsko bojenje i imunolokalizaciju α -tubulina i acetilovanog α -tubulina, kao i cink transportera ZIP6, ZIP10 i ZIP14.

4.1. Rutinska bojenja spermatozoida

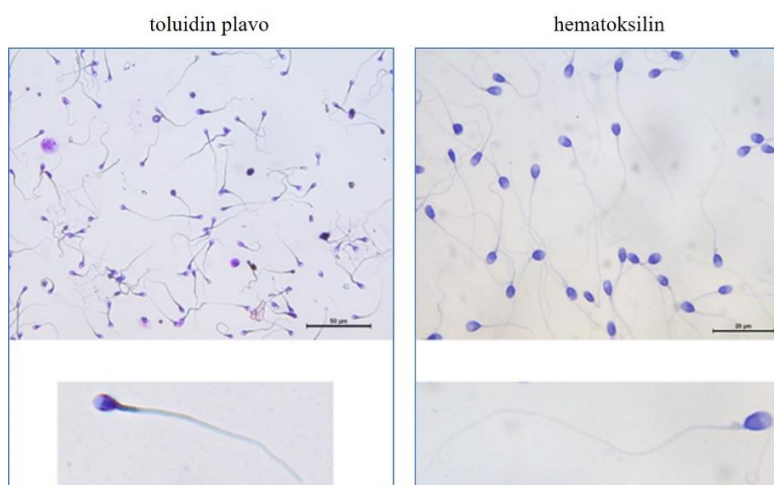
Metode rutinskog bojenja smo iskoristili za opis morfologije spermatozoida. Različitim vidovima bojenja su prikazani različiti subkompartimenti spermatozoida. S obzirom da većina boja ima afinitet prema acidofilnim komponentama ćelija (sastav jedra: hromatin, DNK, RNK), nije neobično da je na većini slika najjače obojeno jedro spermatozoida.

Bojenje sa NFR (*eng.* nuclear fast red) i azokarminom (*eng.* azocarmine) je dosta slično (Slika 9). Jedro je obojeno tamnijom nijansom crvene (ružičasto na slikama), u skladu sa interakcijom pozitivno naelektrisanog crvene boje i negativno naelektrisanog i acidifikovanog jedra. Akrozomalni region je posvetlijeniji u odnosu na jedro, dok je rep bio najsvetlije obojen.



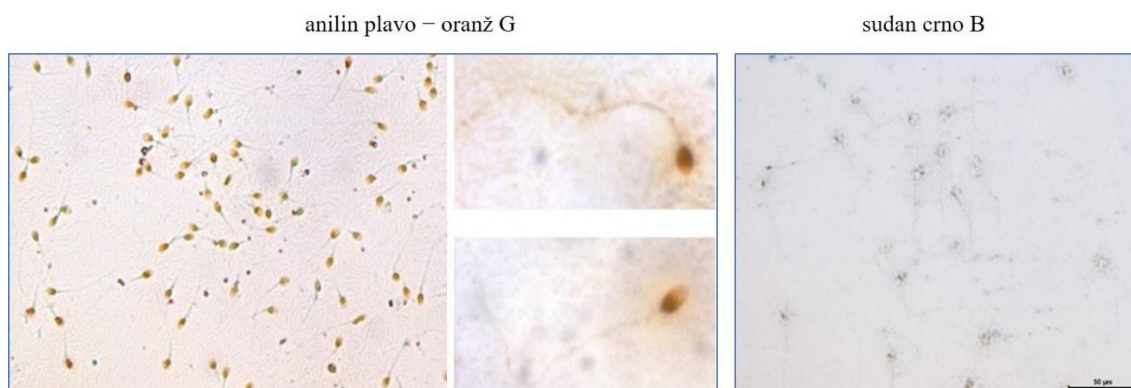
Slika 9. Razmaz spermatozoida obojen azokarminom i NFR. Inseti orig. uvećanje x40; bar = 20µm.

Bojenje toulidin plavim (*eng.* toluidine blue) i hematokslinom (*eng.* haematoxylin) je bilo slično (Slika 10) i u skladu sa afinitetom boja prema acidofilnim komponentama. Jedro je obojeno tamnije, akrozomalno područje je svetlije, dok je rep bio izraženo tamno obojen u slučaju toluidin plave a svetlije plavo-lila u slučaju hematoksilina.



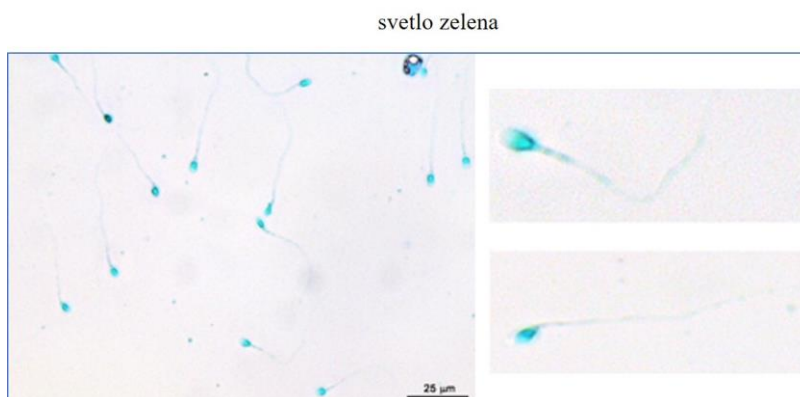
Slika 10. Razmaz spermatozoida obojen toluidin plavim ili hematokslinom. Inseti orig. uvećanje x40; bar = 20µm.

Bojenje sudan crnim B (*eng.* Sudan Black B Stain), s obzirom da je rastvorljiv u mastima i boji lipide (neutralne masti i fosfolipide), bojenje samih spermatozoida je svetlije u odnosu na plavu boju toluidina i hematoksilina (Slika 11b). Uglavnom je vidljiva obojenost membrana i okolnih granularnih ćelija na razmazu.



Slika 11. Razmaz spermatozoida obojen anilin plavim – oranž G i sudan crnim B. Inseti orig. uvećanje x40; bar = 20μm.

Bojenje kiselim bojama anilin plavim – oranž G (*eng.* aniline blue – orange G) je dovelo do toga da je glava spermatozoida najjače obojena (Slika 11a). Anilin plavo omogućava postizanje narandžaste boje koja je izrazito vidljiva i to posebno u citoplazmatskim delovima postakrozomalnog područja spermatozoida. Ostali delovi spermatozoida su slabije obojeni.



Slika 12. Razmaz spermatozoida obojen svetlo zelenom (*eng.* light green). Inseti orig. uvećanje x40; bar = 25μm.

Bojenje spermatozoida svetlo zelenom je svetlije tirkiz nijanse, upadljivo u jedru, a manje u ostalim delovima spermatozoida (Slika 12).

4.2.1. Imunopozitivnost za α -tubulin i acetilovani α -tubulin

Da bismo potvrdili da diferencijalna lokalizacija α -tubulina i acetilovanog α -tubulina u spermatozoidima nije posledica načina pripreme, koristili smo nativni normozoospermični razmaz semena gde smo uradili imunocitohemijsko obeležavanje da bismo detektovali acetilovani α -tubulin.

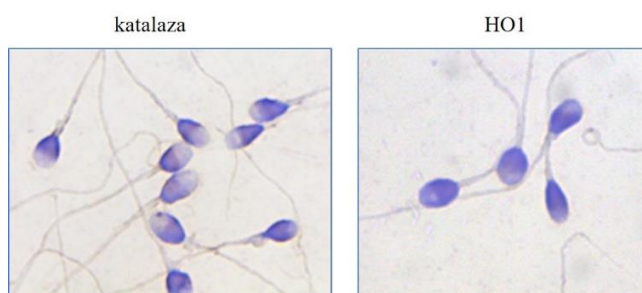
Slabija imunopozitivnost za acetilovani α -tubulin u poređenju sa α -tubulinom je viđena u okviru srednjeg dela i repa (Slika 13). Nekoliko jedara je sadržalo acetilovani α -tubulin. Pošto je imunocitohemija korišćena za cele ćelije spermatozoida, postavilo se pitanje detekcije acetilovanog α -tubulina zbog osetljivosti metode i debljine samih ćelija.



Slika 13. Imunocitohemijska detekcija α -tubulina i acetilovanog α -tubulina u neispiranim (nativnim) normozoospermičnim uzorcima semena korišćenjem svetlosne mikroskopije. Imunopozitivnost (smeđe bojenje) je prisutna u srednjem delu i repu spermatozoida, sa nekoliko jedara koja pokazuju prisustvo acetilovanog α -tubulina (strelice). Nk – negativna kontrola. Jedra su obojena hematoksilinom. Bar = 20 μ m.

4.2.2. Imunopozitivnost za antioksidativne enzime

Imunocitohemijskim analizama je, pored diferencijalne lokalizacije α -tubulina i acetilovanog α -tubulina u spermatozoidima, pokazana i imunopozitivna reakcija na katalazu i hem oksigenazu 1 (HO1) u ispranim normozoospermičnim uzorcima spermatozoida (Slika 14). Reakcija oba antioksidativna enzima je bila slaba i uočena u regionu između akrozoma i jedra. Imunopozitivnost katalaze je bila nešto zastupljenija među ćelijama u poređenju sa hem oksigenazom koja je bila zastupljena u tragovima.



Slika 14. Imunocitohemijska detekcija katalaze i HO1 na razmazima spermatozoida. Orig. uvećanje x100.

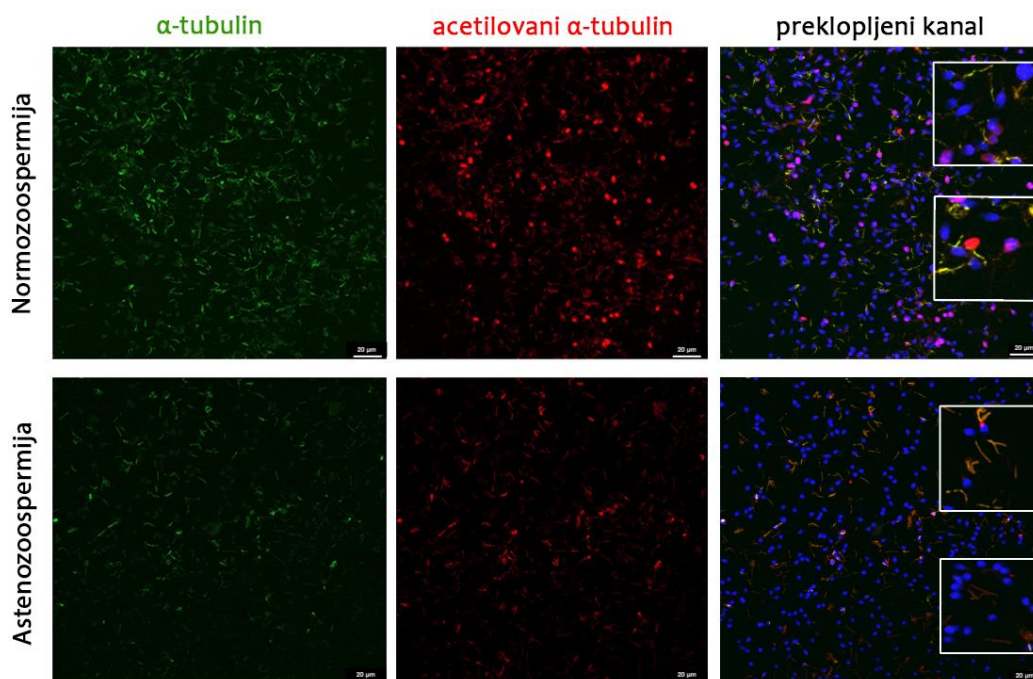
Heterogenost ćelija se pokazala i kroz negativne reakcije na nivou imunocitohemije ispranih normozoospermičnih uzoraka za endotelsku azot oksid sintazu (eNOS, *eng.* endothelial NO synthase), neuronalnu azot oksid sintazu (nNOS, *eng.* neuronal NO synthase), peroksozomalnu acil-koenzim A oksidazu 1 (ACOX1, *eng.* acyl coenzyme A oxidase 1) kao i fosforilisanu formu histona H3 (pH3).

4.3. Imunofluorescenca α -tubulina i acetilovanog α -tubulina

Detekcija imunofluorescencom je pokazala heterogenu lokalizaciju i zastupljenost imunopozitivnost α -tubulina i acetilovanog α -tubulina. Ćelijsku lokalizaciju i imunoekspresiju α -tubulina (zeleno) i acetilovanog α -tubulina (crveno) smo pokazali konfokalnom mikroskopijom u normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima sperme (Slika 15).

Oba uzorka pokazuju jasnu imunolokalizaciju α -tubulina u srednjem delu i repu, dok su normozoospermični uzorci pokazali istaknutu imunolokalizaciju acetilovanog α -tubulina u glavi,

srednjem delu i repu. Kod astenozoospermičnih uzoraka je imunolokalizacija uglavnom pokazana u srednjem delu i repu u poređenju sa glavom (Slika 15).



Slika 15. Prikaz imunofluorescence α -tubulina i acetilovanog α -tubulina u normozoospermičnim i astenoospermičnim uzorcima semena pomoću konfokalnog laser skenirajućeg mikroskopa. Jedra su obojena Sytox Orange (plava boja). Inseti pokazuju uvećane detalje lokalizacije α -tubulina i acetilovanog α -tubulina u spermatozoidima. Bar = 20 μ m.

U kontekstu acetilovanog α -tubulina uočena je znatna razlika upoređivanjem normozoospermičnih i astenoospermičnih uzoraka (Tabela 1). Procenat obeleženog α -tubulina između uzoraka je vrlo slična. Distribucija acetilovanog α -tubulina je skoro jednako podeljena između glave (53.26%), srednjeg dela i repa (46.74%). Nasuprot tome, kod astenoospermičnih uzoraka, skoro sva imunopozitivnost acetilovanog α -tubulina je bila uočena u srednjem delu i repu (99.12%) spermatozoida u poređenju sa glavom (0.88%). U oba uzorka imunopozitivnost α -tubulina je bila izražena u srednjem delu i repu spermatozoida (99.20% u normozoospermičnim i 98.55% u astenoospermičnim uzorcima). Kolokalizacija α -tubulina i acetilovanog α -tubulina nije pokazala razliku između normozoospermičnih i astenoospermičnih uzoraka, redom 2.42% i 2.73% od ukupnog broja posmatranih ćelija.

Tabela 1. Procenat acetilovanog α -tubulina i α -tubulina lokalizovan na nivou ćelijskih kompartmenata u imunopozitivnim spermatozoidima. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM (SD).

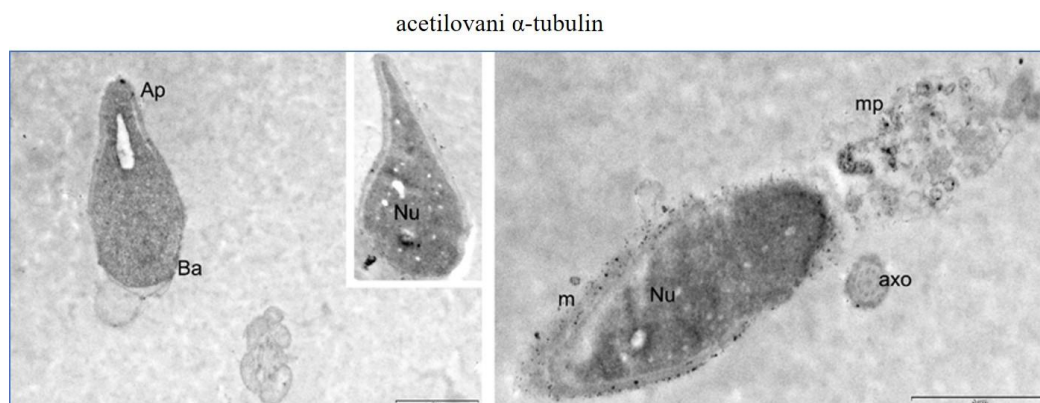
	Normozoospermija		Astenoospermija	
	Glava (%)	Srednji deo i rep (%)	Glava (%)	Srednji deo i rep (%)
Acetilovani α -tubulin	53.26 \pm 7.53 (16.83)	46.74 \pm 7.53 (16.83)	0.88 \pm 0.33 (0.74)###	99.12 \pm 0.33 (0.74)***,###
α -tubulin	0.80 \pm 0.70 (1.57)	99.20 \pm 0.70 (1.57)***	1.45 \pm 1.45 (3.24)	98.55 \pm 1.45 (3.24)***

SEM-standardna srednja greška; SD-standardna devijacija; n=5. Poređenje: *između kompartmenata u okviru iste grupe, #između istih kompartmenata u poređenju sa normozoospermijom. ***/### p < 0.001.

Za razliku od imunofluorescence α -tubulina i acetilovanog α -tubulina, reakcija nije primećena u slučaju antitela na protein bazalnog tela cilije (Lhs28), ninein, i gama tubulin, ali ni na voltažno zavisni anjonski kanal 1, VDAC1 (*eng.* Voltage-Dependent Anion Channel 1), kao i polimerazu II.

4.4. Imunogold obeležavanje jedra spermatozoida

Da bismo bili potpuno sigurni u jedarnu lokalizaciju acetilovanog α -tubulina, dodatno smo uradili imunogold obeležavanje istog uzorka. Imunogold obeležavanje je jasno pokazalo da je acetilovani α -tubulin lokalizovan u jedrima i membranama spermatozoida, takođe u heterogenom obrascu. Svi ispitivani spermatozoidi su bili imunopozitivni na acetilovani α -tubulin u bazalnom telu i flagelumima (Slika 16).



Slika 16. Imunogold (IG) obeležavanje acetilovanog α -tubulina (crne partikule zlata) u normozoospermičnim uzorcima semena. Acetilovani α -tubulin je lokalizovan u apikalnom (Ap) i bazalnom (Ba) delu glave spermatozoida, jedru (Nu) i ćelijskoj membrani (m). Pored toga, imunopozitivnost je primećena u srednjem delu (mp) i aksonemi (axo) repa. Bar = 1 μ m.

4.5. Imunofluorescenca ZIP transportera

Imunofluorescentna detekcija ZIP6, ZIP10 i ZIP14 je urađena na normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima, koji su pokazali heterogenu ekspresiju u spermatozoidima. Pored toga, uočena je heterogenost u ćelijskim delovima i subkompartimentima glave spermatozoida: u prednjem (anteriornom) regionu (žirolika, polumesečasta (srp), žirolika/polmesečasta forma) i zadnjem (posteriorom) regionu.

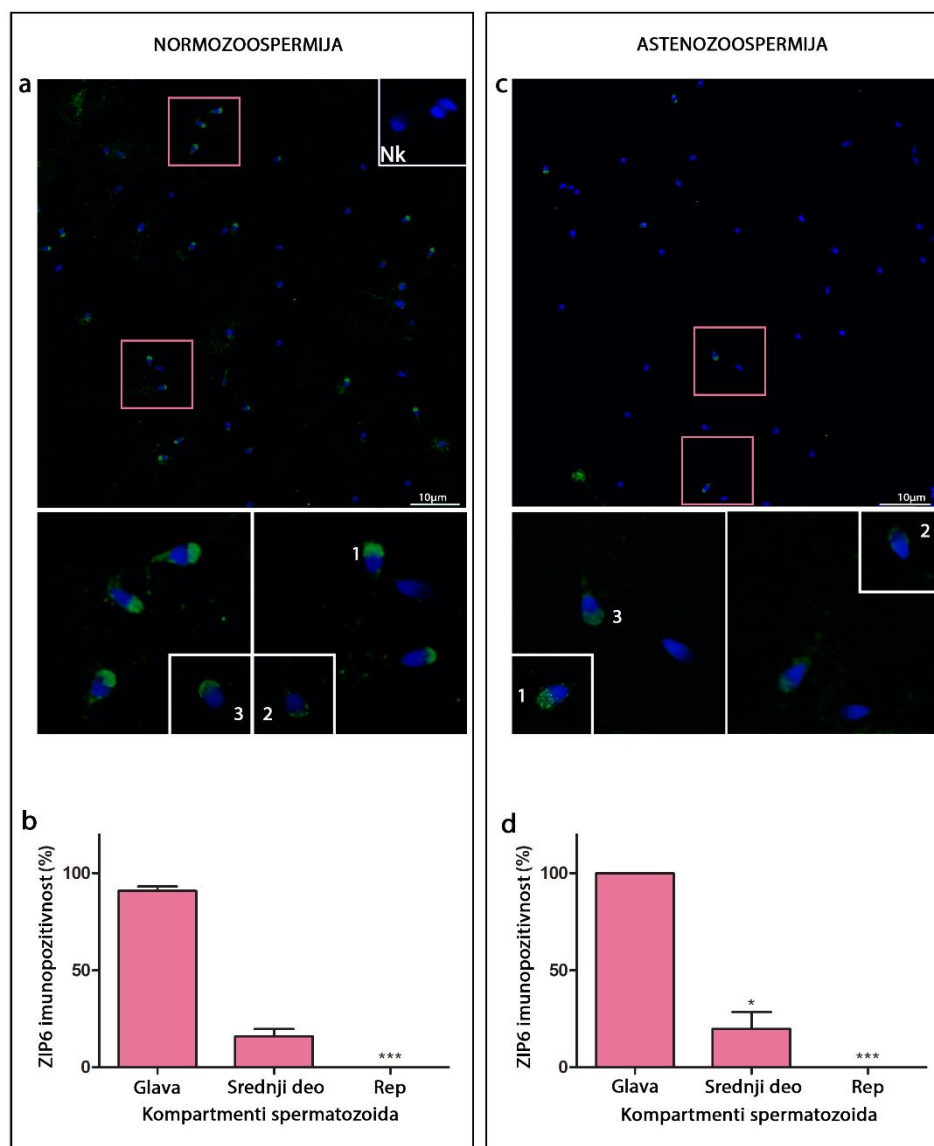
4.5.1. Imunofluorescenca ZIP6

Ukupna imunopozitivnost za ZIP6 je smanjena kod astenozoospermije ($30.28\% \pm 4.136$) u poređenju sa normozoospermijom ($79.05\% \pm 2.075$, $p \leq 0,001$).

U normozoospermičnim uzorcima ZIP6 je bio pretežno lokalizovan u glavi spermatozoida (Slika 17a, 17b, Tabela 2). U prednjem delu glave ZIP6 je formirao klastere sa specifičnim formama poput izraženog žira, manje prisutnog polumeseca i njihovom kombinacijom. Imunopozitivnost je takođe primećena i u zadnjem delu glave.

Interesantno je da je ZIP6 takođe bio prisutan i u vezikulama smeštenim oko glave nekih spermatozoida. U srednjem delu ZIP6 je bio lokalizovan u nekoliko ćelija, dok reakcija nije uočena duž repa.

U astenozoospermičnim uzorcima (Figura 17c, 17d, Tabela 2), imunolokalizacija ZIP6 u subkompartimentima glave je ostala nepromenjena, osim snižene ekspresije forme žira/polumeseca u prednjem regionu. U astenozoospermiji nije bilo razlike u imunoekspresiji ZIP6 u srednjem delu i repu u poređenju sa normozoospermijom.



Slika 17. Detekcija imunofluorescence ZIP6 transportera u normozoospermičnim (a) i astenozoospermičnim (c) uzorcima semena korišćenjem konfokalne laser skenirajuće mikroskopije. Subkompartimenti anteriornog regiona glave: žirolika (1), polumesečasta (2), žirolika/polmesečasta (3) forma, i posteriorni region glave. Nk – negativna kontrola. Bar = 10 μm . Relativna imunopozitivnost ZIP6 u kompartmentima u normozoospermičnim (b) i astenozoospermičnim (d) uzorcima semena. *poređenje sa glavom spermatozoida, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

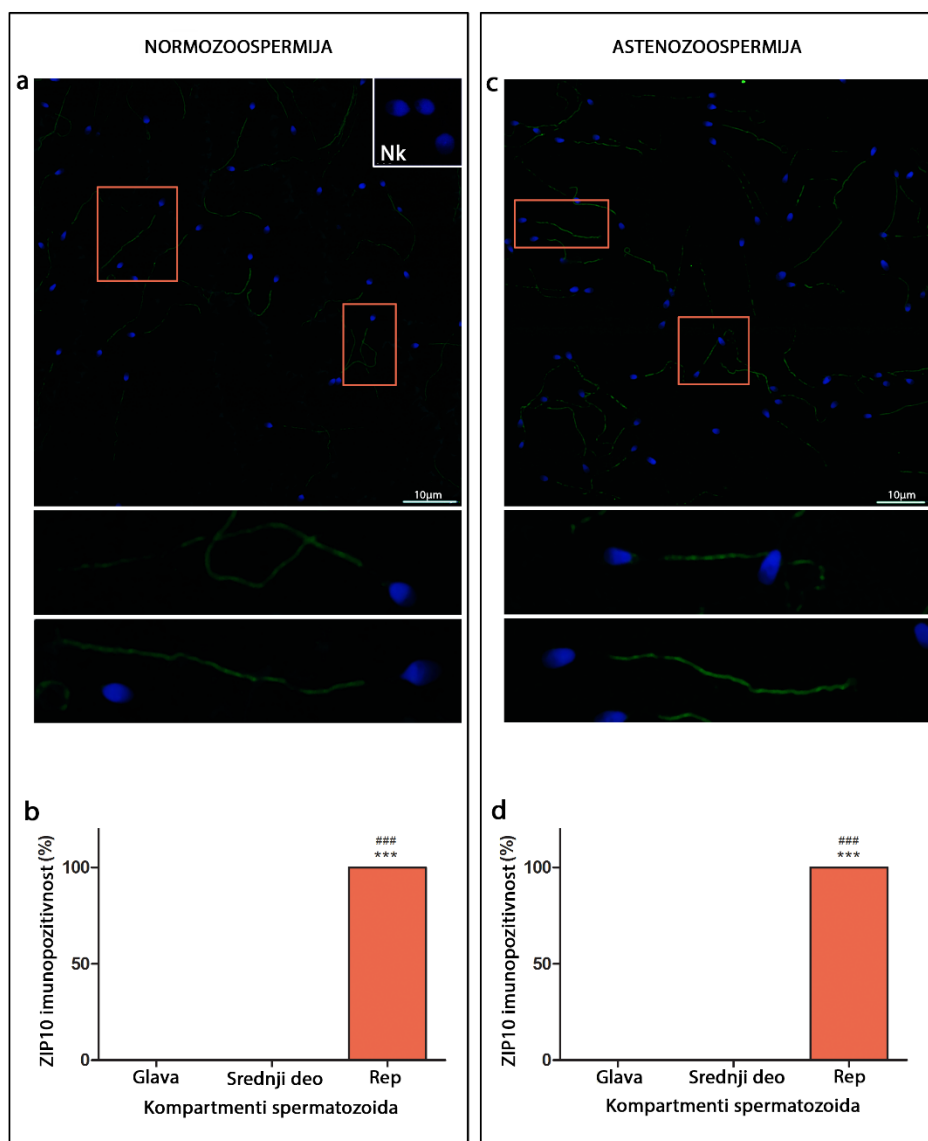
Tabela 2. Procenat ZIP6 imunolokalizacije u subkompartmentima glave spermatozoida.

	Glava spermatozoida			
	Anteriorni region glave (%)			Posteriorni region glave (%)
	žirolika forma	polumesečasta (srp) forma	žirolika/polumesečasta forma	
Normozoospermija	64.61 \pm 6.18	19.81 \pm 4.09	12.68 \pm 2.89	33.45 \pm 7.63
Astenozoospermija	71.32 \pm 9.94	21.54 \pm 8.28	1.515 \pm 1.51 **	56.49 \pm 14.84

Rezultati su izraženi u procentima, kao srednja vrednost \pm SEM; *poređenje sa normozoospermijom. ** $p \leq 0.01$.

4.5.2. Imunofluorescenca ZIP10

Ukupna imunopozitivnost ZIP10 između normo- i astenozoospermičnih uzoraka nije se promenila (Slika 18). Imunoreakcija je lokalizovana duž repova spermatozoida, dok je odsutna u glavi i središnjem delu.



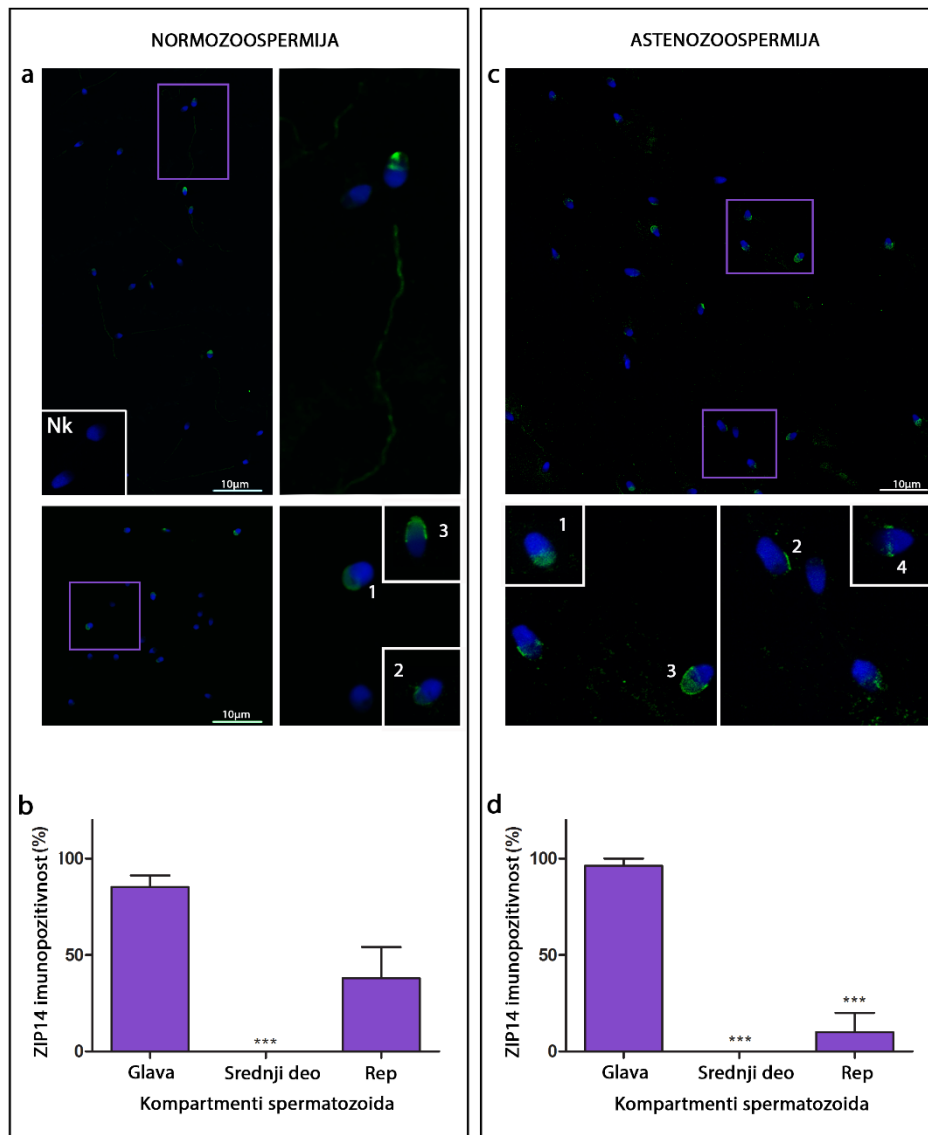
Slika 18. Detekcija imunofluorescence ZIP10 transportera u normozoospermičnim (a) i astenozoospermičnim (c) uzorcima semena korišćenjem konfokalne laser skenirajuće mikroskopije. Relativna imunopozitivnost ZIP10 u kompartmentima u normozoospermičnim (b) i astenozoospermičnim (d) uzorcima semena. *poređene sa glavom, #poređenje sa srednjim delom, *** $p \leq 0.001$, ### $p \leq 0.001$.

4.5.3. Imunofluorescenca ZIP14

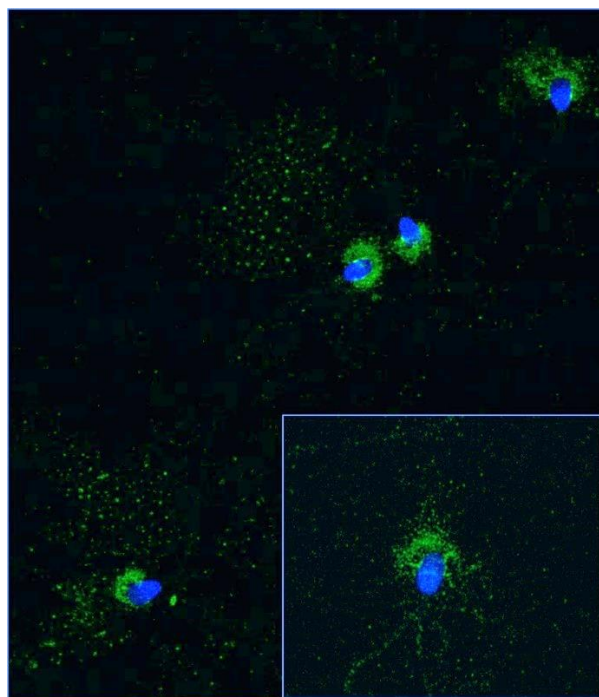
Ukupna imunopozitivnost ZIP14 smanjena je kod astenozoospermije ($39.00\% \pm 8.77$) u poređenju sa normozoospermijom ($60.01\% \pm 7.30$). Imunopozitivnost je uglavnom lokalizovana u glavi i repu (Slika 19, Tabela 3).

Astenozoospermija najviše utiče na subkompartimente glave, menjajući specifično imunološko bojenje u korist polumesečaste forme, nasuprotno formi žira i žira/polmeseca.

U astenozoospermiji, za ZIP14 je uočen obrazac imunolokalizacije nalik vencu, lokalizovan u ekvatorijalnom regionu nekoliko glava spermatozoida (Figura 19c). I kod normo- i kod astenozoospermije ZIP14 imunopozitivnost je uočena u i repu, dok je odsutna u srednjem delu.



Slika 19. Detekcija imunofluorescence ZIP14 transportera u normozoospermičnim (a) i astenozoospermičnim (c) uzorcima semena korišćenjem konfokalne laser skenirajuće mikroskopije. Subkompartimenti anteriornog regiona glave: žirolika (1), polumesečasta (2), žirolika/polmesečasta (3) i venačna (4) forma, i posteriorni region glave. Nk – negativna kontrola. Bar = 10 μ m. Relativna imunopozitivnost ZIP14 između kompartmenata u normozoospermičnim (b) i astenozoospermičnim (d) uzorcima semena. *poređenje sa glavom, *** $p \leq 0.001$.



Slika 20. Detekcija imunofluorescence ZIP14 transportera u normozoospermičnim uzorcima semena korišćenjem konfokalne laser skenirajuće mikroskopije. Brojne vezikule imunopozitivne na ZIP14 vidljive su oko anteriornog dela glave spermatozoida. Org. uvećanje x63.

U normozoospermičnim uzorcima ZIP14 imunobojenje u vezikulama oko glave primećeno je u slučaju nekoliko spermatozoida (Slika 20).

Tabela 3. Procenat ZIP14 imunolokalizacije u subkompartimentima glave spermatozoida.

	Glava spermatozoida			Posteriorni region glave (%)
	Anteriorni region glave (%)			
	žiolika forma	polumesečasta (srp) forma	žiolika/polumesečasta forma	
Normozoospermija	68.08 ± 2.58	18.50 ± 2.91	14.66 ± 3.22	0.00
Astenoospermija	17.57 ± 6.57 ***	67.63 ± 9.36 ***	2.381 ± 2.38**	0.00

Rezultati su izraženi u procentima, kao srednja vrednost ± SEM; *poređenje sa normozoospermijom. **p ≤ 0.01, ***p < 0.001.

5. Diskusija

5.1. Acetilacije

5.1.1. Acetilacija repova

Tubulinski kod, odnosno sastav i stabilnost mikrotubula (MT) repa spermatozoida otvara pitanje da li su MT stabilne zbog same svoje građe od heterodimera tubulina ili se strukturna stabilnost uspostavlja posttranslacionim modifikacijama od kojih je acetilacija najzastupljenija (Eshun-Wilson i sar., 2019)? Način na koji veoma specifična acetilacija tubulina na mestu K40 može uticati na dinamiku MT je strukturno preuređenje, koje najverovatnije modulira njegova fizička svojstva. Iako studije nisu pokazale uticaj acetilacije na promene u konformaciji tubulina, acetilacija na K40 dovodi do slabljenja lateralne interakcije između protofilamenata. Oslabljene interakcije između protofilamenata olabavljaju MT, što omogućuje MT u živim ćelijama, koje su često izložene mehaničkim silama, da ih lakše podnesu i produže njihov život (trajanje) (Janke i Montagnac, 2017). Povezanost acetilacije i dugoživećih MT sugerise ulogu acetilacije u stabilizaciji MT (Bhagwat i sar., 2014).

Interesantno je da, nakon obrade za IUI, imunolokalizacija acetilovanog α -tubulina je bila praktično vidljiva samo u srednjem delu i repu ćelija astenozoospermičnog uzorka u poređenju sa normozoospermičnim uzorkom. Imajući to u vidu, povišen nivo α -tubulin acetilacije u repu ćelija astenozoospermičnih uzoraka može doprineti stabilizaciji MT, što omogućava bolju otpornost na mehanički stres (opterećenje) i posledično obezbeđuje duži opstanak acetilovanih MT, što takođe može uticati na pokretljivost spermatozoida (Bhagwat i sar., 2014). Naši rezultati su u skladu sa prethodno pomenutim, jer smo u ovoj studiji koristili samo pokretne spermatozoide. Međutim, još uvek treba proveriti da li postoji direktna uzročno-posledična veza između povećane acetilacije repa i pokretljivosti spermatozoida.

Heterogenost među spermatozoidima u pogledu smanjene pokretljivost je često povezana sa različitim tipovima defekata u strukturi repa, poremećajem u funkciji jonskih kanala spermatozoida i njihovih efektorskih molekula lociranih u membrani repa, poremećenom funkcijom mitohondrija (koje obezbeđuju potrebnu energiju za pokretljivost), genetskim mutacijama koje negativno utiču na aktivnost ili sintezu proteina koji učestvuju u razvoju spermatozoida i različitim faktorima rizika vezanim za način života (Shahrokhi i sar., 2020).

Zapažanja Bhagwat i sar. (2014) sugerisu da neki urođeni defekti u spermatozoidima astenozoospermičnih muškaraca kao što je smanjena acetilacija u nepokretnoj frakciji normalnih spermatozoida nije ustanovljena. Uprkos činjenici da su pomenuti autori pronašli manju imunopozitivnost acetilovanog α -tubulina u repu spermatozoida astenozoospermičnih uzoraka nego mi, naši rezultati se međusobno ne isključuju. Veća imunopozitivnost acetilovanog α -tubulina u repu spermatozoida u astenozoospermičnim uzorcima sugerise moguću subkompartmentalnu translokaciju acetilacije iz drugog ćelijskog kompartmenta (jedra) u rep. Razlike u imunoekspresiji mogu biti posledica i različite osetljivosti/specifičnosti antitela, pripreme uzorka kao i analitičkih procedura. Isto važi i za imunoreaktivnost α -tubulina u našoj studiji, kada je pozitivnost slabo viđena u akrozomalnom regionu za razliku od prethodnih studija Dvorakove i sar. (2005). Vredi napomenuti da acetilacija takođe utiče na centriole i bazalna tela, najverovatnije učestvovanjem u obezbeđivanju ili održavanju njihove stabilnosti (Wloga i Gaertig, 2011).

5.1.2. Acetilacija glava

Kao što je ranije rečeno, kod većine eukariota se samo α -tubulin nalazi u citoplazmi, dok se u jedru mogu naći i α - i β -tubulin (Schwarzerova i sar., 2019). Razlog prisustva acetilovanog α -tubulina u spermatozoidima nije potpuno jasan, s obzirom da je proces acetilacije prisutan tokom kondenzovanja hromatina u procesu zamene histona protaminima (Bao i Bedford, 2016). U jedru spermatozoida histoni se zamenjuju protaminima što dovodi do kondenzacije hromatina spermatozoida u spermatidnoj fazi spermatogeneze. Acetilacija u glavi spermatozoida se dešava na N-terminalnim lizinskim ostacima H4 neposredno pre zamene histona protaminima. Acetilacija

lizina smanjuje pozitivno naelektrisanje histona, što dovodi do slabije interakcije sa negativno naelektrisanim molekulima DNK. Ovo povećava fluidnost nukleozoma čime se povećava dostupnost hromatina za zamenu molekula (Verdone i sar., 2006). Modifikacija hromatina putem acetilacije takođe može da obezbedi specifična mesta za vezivanje represora i transkripcionih aktivatora. Acetilacija i deacetilacija histona takođe reguliše transkripciju promenom svojstava hromatinskih vlakana višeg nivoa (Verdone i sar., 2006). Kao što su Brunner i sar. (2014) pokazali, acetilacija histona/protamina specifična za spermatozoide doprinosi epigenetici, čini hromatin dostupnim za regrutovanje transkripcione mašinerije. Očigledno, potrebna su dalja istraživanja da bi se razumela uloga jedarnog tubulina u zrelih spermatozoidima kako bi se bolje procenio fertilizacioni potencijal spermatozoida u odnosu na vrstu i stepen muške neplodnosti.

Istraživanje na lizin-acetil proteomu kapacitiranih ljudskih spermatozoida je pokazalo bitnu ulogu acetilacije u funkciji spermatozoida i pokazalo prisustvo različitih deacetilaza za regulaciju nehistske acetilacije (Sun i sar., 2014). Uloga jedarnog tubulina u zrelih spermatozoidima pre oplodnje je takođe nejasna. Smatra se da je on povezan sa hromatinom, da interaguje sa linker histonima i transkripcionim koaktivatorima *in vitro* (Akoumianaki i sar., 2009). U našoj studiji, postojala je veoma niska imunoreaktivnost α -tubulina u jedrima spermatozoida astenozoospermičnih uzoraka. Acetilovani α -tubulin je bio prisutan u jedru normozoospermičnih uzoraka (53,26%), prevashodno viđen blizu baze glave spermatozoida, za razliku od astenozoospermičnih uzoraka (0,88%).

Ove razlike potvrđuju da acetilacija u jedru doprinosi heterogenosti spermatozoida. To bi moglo biti objašnjenje za nisku stopu uspešnosti oplodnje kod astenozoospermije, čak i kada se koristi ICSI (Oseguera-Lopez i sar., 2019). Naime, nedostatak acetilacije α -tubulina u jedru astenozoospermičnih uzoraka, iako indirektno, može biti znak nepristupačnosti ovog kompartmenta za acetilaciju hromatina. Shodno tome, ovo može dovesti do smanjenog vezivanja transkripcionih faktora i na taj način utiče na važan paternalni doprinos zigotu.

Podaci o acetilaciji α -tubulina tokom spermatogeneze i dalje su oskudni. Kalebić i sar. (2013) nisu otkrili acetilaciju α -tubulina u testisima *Atat1*^{-/-} miševa, uprkos tome što su spermatozoidi i njihovi repovi prisutni i netaknuti, što sugeriše da je *Atat1* glavni enzim uključen u acetilaciju α -tubulina. Međutim, oni nisu opisali jedarnu imunopozitivnost spermatozoida u testisima kontrolne grupe (iako su koristili isto antitelo kao i mi). Ovo može biti zbog razlika u ispitivanim vrstama i uzorku (spermatozoidi testisa u odnosu na ejakulirane spermatozoide). Takvi rezultati su intrigantni i istovremeno pozivaju na buduće studije kako bi se razumelo vreme i lokacija acetilacije α -tubulina, i da bi se utvrdilo šta se dešava na molekulskom nivou unutar spermatozoida kada su u ženskom reproduktivnom traktu.

5.2. ZIP

5.2.1. ZIP su heterogeno eksprimirani u spermatozoidima, dok astenozoospermija indukuje nižu ukupnu imunopozitivnost ZIP6

Ekspresija ZIP1, ZIP5, ZIP6, ZIP8 i ZIP12 uglavnom je ispitivana u humanim testisima (Foresta i sar., 2014, Zhu i sar., 2022). Foresta i sar. (2014) su detektovali prisustvo ZIP6 transportera u svim ćelijskim fazama spermatogeneze. Što se tiče ZIP10 i ZIP14, njihovo prisustvo nije procenjeno (ZIP10) niti pronađeno (ZIP14) kod ljudi (Foresta i sar., 2014). Samo nekoliko studija se bavilo ejakuliranim humanim spermatozoidima gde su pronađeni ZIP1, ZIP5, ZIP6 i ZIP8 (Foresta i sar., 2014). S obzirom na izraženu ekspresiju transportera tokom spermatogeneze i ograničeno prisustvo u ejakuliranim spermatozoidima, postavlja se pitanje njihovog porekla. S jedne strane, jasno je da bi se neki od njih mogli zadržati nakon spermatogeneze. S druge strane, kod svinja je pokazano da spermatozoidi mogu unositi vezikule koje potiču iz semene plazme (Du i sar., 2016). Murdica i sar. (2019) su takođe našli da su ejakulirani humani spermatozoidi prijemčivi i sposobni da preuzmu egzozome iz semene plazme. Prethodno publikovano prisustvo transportera cinka u različitim regionima epididimisa podržava ovu tvrdnju (Bedwal i Bahuguna, 1994). Zanimljivo je da su Park i sar. (2011) pokazali da spermatozoidi mogu da steknu Ca^{2+} signalnu

mašineriju neophodnu za pokretljivost, fuzijom egzozomskih semena sa srednjim delom. Ovo može objasniti heterogenost u broju imunopozitivnih spermatozoida u ovoj studiji, iako je potrebno više dodatnih eksperimenata da bi se razjasnio osnovni mehanizam(i). Ovo takođe može dati odgovor na pitanje da li je uočena niža ukupna ZIP6 imunopozitivnost kod astenozoospermije nasledna ili stečena.

5.2.2. ZIP su lokalizovani u različitim kompartmentima, ZIP6 i ZIP14 su nađeni u glavi, dok je ZIP10 lokalizovan potpuno duž repa spermatozooida

U disertaciji je pokazana specifična ćelijska kompartmentalizacija ZIP6, ZIP10 i ZIP14, u pogledu glave, srednjeg dela i repa spermatozoida. U oba tipa uzoraka, ZIP6 i ZIP14 su bili pretežno lokalizovani u glavi, dok je ZIP10 pronađen u repu spermatozoida. Ova lokalizacija je u skladu sa autometalografskom studijom koja pokazuje lokalizaciju Zn^{2+} u sva tri kompartmenta spermatozoida u razmazu humanog ejakuliranog semena (Stotenberg i sar., 1997). Zanimljivo je da su Zhu i sar. (2022) pronašli ZIP12 u središnjem delu i glavi spermatozoida humanog testisa, što ukazuje na njegovu ranu kompartmentalizaciju. U skladu sa ovim, naši rezultati dodatno sugerišu da različiti ZIP mogu doprineti različitom prostornom i vremenski zavisnom unosu Zn^{2+} .

Ukupna niža ekspresija ZIP6 u astenozoospermičnim uzorcima implicira da bi ZIP6 mogao biti marker zrelosti spermatozoida. Kerns i sar. (2018a, 2018b) su pokazali različite cink kodove među spermatozoidima i njihovu korelaciju sa zrelošću sperme i uspehom oplodnje. Dakle, primećena heterogena ekspresija cink transportera može biti posledica prethodno ustanovljene različite međućelijske varijabilnosti jedarne koncentracije cinka i cink koda (Kvist i sar., 1985; Kerns i sar., 2018a, 2018b).

5.2.3. Specifična subkompartmentalna lokalizacija u glavi za ZIP6 i ZIP14

U odnosu na jedan od kompartmenta, region glave, opisali smo specifične subkompartmentalne imunolokalizacione forme ZIP u anteriornom (žir, polumesec, žir/polumesec) i posteriornom delu glave. Korišćenjem atomske apsorpcione spektrometrije Henkel i sar. (1999) su ustanovili da glave spermatozoida sadrže 6,5% ukupne količine cinka koja se nalazi u humanim spermatozoidima. Zanimljivo je da smo mi pronašli imunopozitivnost za ZIP6 i za ZIP14 u glavi spermatozoida uprkos potvrđenim iznenađujuće niskim koncentracijama Zn^{2+} u glavi. Što se tiče prednjeg regiona glave, lokalizacija ZIP6 je nepromenjena, osim za subkompartment žir/polumesečaste forme koja je smanjena u astenozoospermiji. Što se tiče ZIP14, subkompartmentalna ekspresija se promenila između dve grupe i nejasna je. Zn^{2+} igra ulogu u stabilizaciji hromatina, posebno u ćelijama spermatozoida, pošto spermatozoidi unose dodatni Zn^{2+} iz semene tečnosti tokom ejakulacije (Björndahl i sar., 1986). Pošto je inaktivnost hromatina na nivou ejakulacije (Mirnamniha i sar., 2019) heterogena kao i jedarna koncentracija cinka (Kvist i sar., 1985), moglo bi se spekulirati da se astenozoospermija kod spermatozoida ne odnosi samo na smanjenu pokretljivost, već i na relativni integritet/stabilnost jedra (Colleu i sar., 1988; Kumar i sar., 2011).

Specifično prisustvo ZIP6 u posteriornom delu glave spermatozoida je prisutno u obe vrste uzorka, dok je ZIP14 potpuno odsustan. Pošto jedarnoj ovojnici spermatozoida nedostaju pore, osim u veoma ograničenom regionu između zadnjeg prstena i bazalne ploče (Mortimer, 2018), sve opet ide u prilog održavanju stabilnosti hromatina u ejakuliranim spermatozoidima.

Zanimljivo je da smo takođe otkrili pozitivnu imunoreakciju za ZIP6 i ZIP14 transportere lokalizovane oko glave nekih ćelija normo- i astenozoospermičkih uzoraka. Humana semena plazma sadrži egzozome za koje se pokazalo da igraju važnu ulogu u povećanju pokretljivosti spermatozoida, odlažući akrozomalnu reakciju (Du i sar., 2016). Studije na egzozomima semene plazme svinja su pokazale produženo efektivno vreme pokretljivosti spermatozoida (Du i sar., 2016). Iako smo koristili isprane uzorke, moguće je da, pošto su ekstracelularne vezikule endogeni nosioci genetskog materijala, proteina i lipida, neke vezikule ostale sa specifičnim proteinskim teretom transportera, čija uloga može biti u obezbeđivanju prisustva Zn^{2+} za buduću oplodnju od

strane spermatozida (Murđica i sar., 2019). Ovaj rezultat je veoma intrigantan i potrebne su dalje studije da bi se razjasnio ovaj fenomen.

ZIP6 je nađen u srednjem delu nekih ćelija, dok je uloga ZIP transportera u srednjem delu i dalje nepoznata. Središnji deo spermatozoida obezbeđuje Zn^{2+} za unutrašnje skladištenje i potencijalnu upotrebu od strane mitohondrija za pokretljivost (Kvist i sar., 1985; Kerns i sar., 2018). Neke studije su pokazale da cink takođe stabilizuje vezu glava-rep i inhibira njihovo odvajanje (Björndahl i Kvist, 1982).

Molekulska osnova metabolizma cinka je takođe povezana sa pokretljivošću spermatozoida. Pronašli smo da je ZIP10 čvrsto lokalizovan u repu spermatozoida u oba uzorka. Što se tiče ZIP14, imunopozitivnost je bila prisutna, ali izraženo smanjena u astenozoospermiji. Neke grupe istraživača su otkrile da visoko pokretni spermatozoidi pokazuju značajno niži prosečan sadržaj Zn^{2+} u poređenju sa sporim ili nepokretnim spermatozoidima (Foresta i sar., 2014), dok su drugi otkrili da kada su koncentracije cinka u repovima visoke, pokretljivost i brzina spermatozoida su niske (Henkel i sar., 1999). Ovo poslednje sugerise da je smanjena krutost ODF rezultat prekomerne količine cinka u repovima, a može biti uzrok astenozoospermije (Henkel i sar., 1999). Pored toga, odsustvo ZIP6 u repu spermatozoida u oba uzorka sugerise da on ne igra nikakvu ulogu u pokretljivosti. Sudeći po kontradiktornim rezultatima u pogledu uloge cinka u repu spermatozoida, potrebna su dalja istraživanja da bi se otkrila njegova precizna uloga. Takođe, potrebno je dodatno pojašnjenje imunološkog bojenja repa za ZIP10 i ZIP14.

Naši rezultati pokazuju jasnu heterogenost među ćelijama spermatozoida u normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima u odnosu na imunolokalizaciju ZIP. Tako pokazani cink kod jasno ukazuje na specifičnu kompartmentalizaciju transportera koja garantuje spermatozoidima prostorno preuzimanje cinka. Sa druge strane, subkompartmentalno prisustvo transportera može se dovesti u vezu sa vremenskom zavisnošću njihovog prisustva i/ili njihovim preuzimanjem fuzijom sa egzovezikulama. Mnoga pitanja je još potrebno istražiti u vezi sa mehanizmima transporta cinka, posebno jer su njegove uloge izazvane različitim uslovima životne sredine, od fizioloških do patoloških. Posebno je važno ispitati cink kod jer se u vreme pandemije kovida cink suplementacija pokazala kao izuzetno korisna. Sa druge strane ostaje da vidimo kako je to uticalo na ekspresiju transportera neophodnih za održavanje homeostaze cinka u humanim spermatozoidima.

6. Zaključci

U ovoj studiji je pokazan ćelijski i molekularni osnov heterogenosti humanih spermatozoida kroz tubulinski i cink kod, kao i njihove razlike u astenozoospermičnim u odnosu na normozoospermične uzorke.

U odnosu na tubulinski kod pokazano je izrazito prisustvo acetilovanog α -tubulina u jedru normozoospermičnih uzoraka, u poređenju sa njegovom slabom zastupljenosti u astenozoospermičnim uzorcima. S obzirom da je jedarni tubulin povezan sa hromatinom, da interaguje sa histonima, linkerima i koaktivatorima transkripcije *in vitro*, dobijeni rezultati sugerišu da bi jedan od markera slabe uspešnosti astenozoospermičnih spermatozoida bio i sniženi paternalni doprinos zigotu.

Nakon obrade za IUI, imunolokalizacija acetilovanog α -tubulina je bila vidljiva samo u srednjem delu i repu astenozoospermičnih ćelija u poređenju sa normozoospermičnim. Veća imunopozitivnost acetilovanog α -tubulina u repu spermatozoida astenozoospermičnih uzoraka koju smo pokazali sugeriše moguću subkompartmentalnu translokaciju acetilacije iz jedra u rep. Acetilovani α -tubulin u jedru spermatozoida mogao bi biti novi molekularni biomarker, pored onih koji se trenutno koriste, kako bi se poboljšao uspeh IUI procedura u budućnosti.

U odnosu na cink kod, heterogenost među spermatozoidima u normozoospermičnim i astenozoospermičnim uzorcima u odnosu na kompartmentalnu i subkompartmentalnu imunolokalizaciju ZIP se razlikuje. Generalna imunopozitivnost za ZIP6 i ZIP14 je opala u astenozoospermiji u poređenju sa normozoospermijom, dok je za ZIP10 ostala slična. ZIP6 i ZIP14 su nađeni u glavi, dok je ZIP10 lokalizovan duž repa. Snižena ekspresija ZIP6 u astenozoospermičnim uzorcima mogla bi biti jedan od markera zrelosti spermatozoida.

Subkompartmentalna lokalizacija je izražena za ZIP6 i ZIP14 u glavi, za ZIP6 izražena u anteriornom i posteriornom regionu glave, dok je za ZIP14 uočena samo u anteriornom delu. Pošto je neaktivnost hromatina u ejakuliranim spermatozoidima heterogena kao i koncentracija jedarnog Zn^{2+} , naši rezultati sugerišu da se uticaj astenozoospermije na spermatozoide ne odražava samo u smanjenoj pokretljivosti, već i na njihov relativni jedarni integritet/stabilnost.

Lokalizacija ZIP6 u srednjem delu nekih ćelija nije potpuno jasna u odnosu na uloge Zn^{2+} u tom delu spermatozoida. Imunopozitivnost repa ZIP10 je bila prisutna, takođe i ZIP14 ali smanjena u astenozoospermičnim uzorcima. Povezanost koncentracije Zn^{2+} i pokretljivosti repa je kontradiktorna, tako da su potrebna dalja istraživanja da bi se otkrila njegova jasna uloga.

Ovo je prva studija koja ukazuje na razlike između pojedinačnih spermatozoida na ćelijskom i molekularskom nivou. U eri individualizovanog pristupa pacijentu u medicini, naši podaci govore o jedinstvenosti pojedinačnih spermatozoida, među kojima samo jedan može oploditi oocitu. Čak i najmanje promene u jednom spermatozoidu mogu biti specifičan molekularni potpis ključan za potencijalnu prednost ili neuspeh oplodnje.

7. Literatura

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, *13*, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Aguado-García, A., Priego-Espinosa, D. A., Aldana, A., Darszon, A., & Martínez-Mekler, G. (2021). Mathematical model reveals that heterogeneity in the number of ion transporters regulates the fraction of mouse sperm capacitation. *PloS one*, *16*(11), e0245816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245816>
- Akoumianaki, T., Kardassis, D., Polioudaki, H., Georgatos, S. D., & Theodoropoulos, P. A. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells. *Journal of cell science*, *122*(Pt 8), 1111–1118. <https://doi.org/10.1242/jcs.043034>
- Altschuler, S. J., & Wu, L. F. (2010). Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell*, *141*(4), 559–563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.033>
- Amargant, F., Barragan, M., Vassena, R., & Vernos, I. (2019). Insights of the tubulin code in gametes and embryos: from basic research to potential clinical applications in humans†. *Biology of reproduction*, *100*(3), 575–589. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy203>
- Bao, J., & Bedford, M. T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)*, *151*(5), R55–R70. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0562>
- Bedwal, R. S., & Bahuguna, A. (1994). Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*, *50*(7), 626–640. <https://doi.org/10.1007/BF01952862>
- Bettger, W. J., & O'Dell, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life sciences*, *28*(13), 1425–1438. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90374-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90374-x)
- Bhagwat, S., Dalvi, V., Chandrasekhar, D., Matthew, T., Acharya, K., Gajbhiye, R., Kulkarni, V., Sonawane, S., Ghosalkar, M., & Parte, P. (2014). Acetylated α -tubulin is reduced in individuals with poor sperm motility. *Fertility and sterility*, *101*(1), 95–104.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.016>
- Björndahl, L., & Kvist, U. (1982) Importance of zinc for human sperm head-tail connection. *Acta Physiol Scand.*, *116* (1), 51-55, [doi:10.1111/j.1748-1716.1982.tb10598.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1982.tb10598.x)
- Björndahl, L., Kjellberg, S., Roomans, G. M., & Kvist, U. (1986). The human sperm nucleus takes up zinc at ejaculation. *International journal of andrology*, *9*(1), 77–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00869.x>
- Brunner, A. M., Nanni, P., & Mansuy, I. M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics & chromatin*, *7*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-2>
- Calvin, H. I., & Bedford, J. M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *13*, 65–75.
- Chen, H., Mruk, D., Xiao, X., & Cheng, C.Y. (2017). Human Spermatogenesis and Its Regulation. In: Winters, S., Huhtaniemi, I. (eds) *Male Hypogonadism. Contemporary Endocrinology*. Humana Press, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53298-1_3
- Cohlen, B., Bijkerk, A., Van der Poel, S., & Ombelet, W. (2018). IUI: review and systematic assessment of the evidence that supports global recommendations. *Human reproduction update*, *24*(3), 300–319. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx041>

- Colleu, D., Lescoat, D., Boujard, D., & Le Lannou, D. (1988). Human spermatozoal nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. *Archives of andrology*, 21(3), 155–162. <https://doi.org/10.3109/01485018808986737>
- Croxford, T. P., McCormick, N. H., & Kelleher, S. L. (2011). Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. *The Journal of nutrition*, 141(3), 359–365. <https://doi.org/10.3945/jn.110.131318>
- Du, J., Shen, J., Wang, Y., Pan, C., Pang, W., Diao, H., & Dong, W. (2016). Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget*, 7(37), 58832–58847. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11315>
- Dvoráková, K., Moore, H. D., Sebková, N., & Palecek, J. (2005). Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)*, 130(1), 61–69. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00549>
- Eshun-Wilson, L., Zhang, R., Portran, D., Nachury, M. V., Toso, D. B., Löhr, T., Vendruscolo, M., Bonomi, M., Fraser, J. S., & Nogales, E. (2019). Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(21), 10366–10371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900441116>
- Eddy, E. M., Toshimori, K., & O'Brien, D. A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy research and technique*, 61(1), 103–115. <https://doi.org/10.1002/jemt.10320>
- Fallah, A., Mohammad-Hasani, A., & Colagar, A. H. (2018). Zinc is an essential element for male fertility: a review of zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *Journal of reproduction & infertility*, 19(2), 69–81.
- Foresta, C., Garolla, A., Cosci, I., Menegazzo, M., Ferigo, M., Gandin, V., & De Toni, L. (2014). Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(6), 1134–1145. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu075>
- Fujishiro, H., Yano, Y., Takada, Y., Tanihara, M., & Himeno, S. (2012). Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*, 4(7), 700–708. <https://doi.org/10.1039/c2mt20024d>
- Gibbons, I. R., & Grimstone A.V. (1960). On flagellar structure in certain flagellates. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 7(4), 697–716. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.4.697>
- Girijashanker, K., He, L., Soleimani, M., Reed, J. M., Li, H., Liu, Z., Wang, B., Dalton, T. P., & Nebert, D. W. (2008). Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Molecular pharmacology*, 73(5), 1413–1423. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043588>
- Golic, I., Aleksic, M., Lazarevic, A., Bogdanovic, M., Jonic, S., & Korac, A. (2016) Methods for studying the localization of mitochondrial complexes III and IV by immunofluorescent and immunogold microscopy. *Archives of biological sciences*, 68 (4), 767–772. <https://doi.org/10.2298/ABS150618061G>
- Golic, I., Velickovic, K., Markelic, M., Stancic, A., Jankovic, A., Vucetic, M., Otasevic, V., Buzadzic, B., Korac, B., & Korac, A. (2014). Calcium-induced alteration of mitochondrial morphology and mitochondrial-endoplasmic reticulum contacts in rat brown adipocytes. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(3), 2377. <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2377>
- Gunes, S., Sengupta, P., Henkel, R., Alguraigari, A., Sinigaglia, M. M., Kayal, M., Joumah, A., & Agarwal, A. (2020). Microtubular dysfunction and male infertility. *The world journal of men's health*, 38(1), 9–23. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180066>

- Henkel, R., Bittner, J., Weber, R., Hüther, F., & Miska, W. (1999). Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and sterility*, 71(6), 1138–1143. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00141-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00141-7)
- Hirata, S., Hoshi, K., Shoda, T., & Mabuchi, T. (2002). Spermatozoon and mitochondrial DNA. *Reproductive medicine and biology*, 1(2), 41–47. <https://doi.org/10.1046/j.1445-5781.2002.00007.x>
- Hojyo, S., Miyai, T., Fujishiro, H., Kawamura, M., Yasuda, T., Hijikata, A., Bin, B. H., Irie, T., Tanaka, J., Atsumi, T., Murakami, M., Nakayama, M., Ohara, O., Himeno, S., Yoshida, H., Koseki, H., Ikawa, T., Mishima, K., & Fukada, T. (2014). Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(32): 11786–11791. <https://doi.org/10.1073/pnas.132355711>
- Holt, W. V., & Van Look, K. J. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(5), 527–535. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00134>
- Inaba, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoological science*, 20(9), 1043–1056. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.1043>
- James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5377. <https://doi.org/10.3390/ijms21155377>
- Janke, C., & Bulinski, J. C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(12), 773–786. <https://doi.org/10.1038/nrm3227>
- Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Causes and consequences of microtubule acetylation. *Current biology : CB*, 27(23), R1287–R1292. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>
- Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C., & Heppenstall, P. A. (2013). α TAT1 is the major α -tubulin acetyltransferase in mice. *Nature communications*, 4, 1962. <https://doi.org/10.1038/ncomms2962>
- Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R., & Nagao, M. (2004). Overview of mammalian zinc transporters. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3148-y>
- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., & Itsumura, N. (2015). The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiological reviews*, 95(3), 749–784. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2014>
- Kambe, T., Nishito, Y., & Fukue, K., (2017) Chapter 23 - Zinc transporters in health and disease. In: *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*; Collins, J.F., Ed.; Academic Press: Boston; pp. 283–291 ISBN 978-0-12-802168-2.
- Khosronezhad, N., Hosseinzadeh Colagar, A., & Jorsarayi, S. (2015) C26232T Mutation in Nsun7 gene and reduce sperm motility in asthenoteratospermic men. *Journal of genetic resources*.1(1):25–30. doi: [10.22080/JGR.2015.1118](https://doi.org/10.22080/JGR.2015.1118)
- Kerns, K., Zigo, M., & Sutovsky, P. (2018a). Zinc: A necessary ion for mammalian sperm fertilization competency. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4097. <https://doi.org/10.3390/ijms19124097>
- Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2018b). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature communications*, 9(1), 2061. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04523-y>

- Kierszenbaum, A. L. (2002). Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. *Molecular reproduction and development*, 62(1), 1–3. <https://doi.org/10.1002/mrd.10139>
- Kumar, D., Kalthur, G., Mascarenhas, C., Kumar, P., & Adiga, S. K. (2011). Ejaculate fractions of asthenozoospermic and teratozoospermic patients have differences in the sperm DNA integrity. *Andrologia*, 43 (6), 416-421. <https://doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01105.x>
- Kvist, U., Björndahl, L., Roomans, G. M., & Lindholmer, C. (1985). Nuclear zinc in human epididymal and ejaculated spermatozoa. *Acta physiologica Scandinavica*, 125(2), 297–303. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1985.tb07719.x>
- Lee, S. R. (2018). Critical Role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 9156285. <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>
- Leslie, S. W., Siref, L. E., Soon-Sutton, T. L., & Khan, M. (2022). Male Infertility. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Linck, R. W., Chemes, H., & Albertini, D. F. (2016). The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(2), 141–156. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0652-1>
- Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., Knutson, M. D., Ganz, T., & Cousins, R. J. (2005). Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6843–6848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502257102>
- Miyai, T., Hojyo, S., Ikawa, T., Kawamura, M., Irié, T., Ogura, H., Hijikata, A., Bin, B. H., Yasuda, T., Kitamura, H., Nakayama, M., Ohara, O., Yoshida, H., Koseki, H., Mishima, K., & Fukada, T. (2014). Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(32), 11780–11785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323549111>
- Meniru, G. I. (2004) The male reproductive system, in *Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction*. Cambridge University Press, 2004, p: 3-9
- Mirnamniha, M., Faroughi, F., Tahmasbpour, E., Ebrahimi, P., & Beigi Harchegani, A. (2019). An overview on role of some trace elements in human reproductive health, sperm function and fertilization process. *Reviews on environmental health*, 34(4), 339–348. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0008>
- Mitchell, D. R. (2004). Speculations on the evolution of 9+2 organelles and the role of central pair microtubules. *Biology of the cell*, 96(9), 691–696. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.07.004>
- Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Molecular human reproduction*, 24(12), 567–592. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay040>
- Murdica, V., Giacomini, E., Alteri, A., Bartolacci, A., Cermisoni, G. C., Zarovni, N., Papaleo, E., Montorsi, F., Salonia, A., Viganò, P., & Vago, R. (2019). Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertility and sterility*, 111(5), 897–908.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.030>
- Nekooki-Machida, Y., & Hagiwara, H. (2020). Role of tubulin acetylation in cellular functions and diseases. *Medical molecular morphology*, 53(4), 191–197. <https://doi.org/10.1007/s00795-020-00260-8>
- O'Donnell, L. (2015). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis*, 4(2), e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>

- Olson, G. E., Hamilton, D. W., & Fawcett, D. W. (1976). Isolation and characterization of the fibrous sheath of rat epididymal spermatozoa. *Biology of reproduction*, *14*(5), 517–530. <https://doi.org/10.1095/biolreprod14.5.517>
- Oseguera-López, I., Ruiz-Díaz, S., Ramos-Ibeas, P., & Pérez-Cerezales, S. (2019). Novel techniques of sperm selection for improving IVF and ICSI outcomes. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 298. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00298>
- Park, K. H., Kim, B. J., Kang, J., Nam, T. S., Lim, J. M., Kim, H. T., Park, J. K., Kim, Y. G., Chae, S. W., & Kim, U. H. (2011). Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Science signaling*, *4*(173), ra31. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001595>
- Protic, I., Golic, I., Aleksic, M., Vidakovic, S., Korac, B., & Korac, A. (2022). Presence of acetylated α -tubulin in human sperm nuclei: a contributor to sperm heterogeneity. *Medical hypotheses*. 161, 110800, doi:10.1016/j.mehy.2022.110800.
- Rothman, S., & Bort, AM. (2018) Sperm Morphology In: [Encyclopedia of Reproduction](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64936-x), 85-95. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64936-x>
- Schwarzerová, K., Bellinvia, E., Martinek, J., Sikorová, L., Dostál, V., Libusová, L., Bokvaj, P., Fischer, L., Schmit, A. C., & Nick, P. (2019). Tubulin is actively exported from the nucleus through the Exportin1/CRM1 pathway. *Scientific reports*, *9*(1), 5725. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42056-6>
- Scott, B. J., & Bradwell, A. R. (1983). Identification of the serum binding proteins for iron, zinc, cadmium, nickel, and calcium. *Clinical chemistry*, *29*(4), 629–633.
- Shahrokhi, S. Z., Salehi, P., Alyasin, A., Taghiyar, S., & Deemeh, M. R. (2020). Cellular and molecular contributing factors and treatment strategies. *Andrologia*, *52* (2). <https://doi.org/10.1111/and.13463>.
- Shen, R., Xie, F., Shen, H., Liu, Q., Zheng, T., Kou, X., Wang, D., & Yang, J. (2013). Negative correlation of LIV-1 and E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells. *PloS one*, *8*(2), e56542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056542>
- Smith, E. F., & Yang, P. (2004). The radial spokes and central apparatus: mechano-chemical transducers that regulate flagellar motility. *Cell motility and the cytoskeleton*, *57*(1), 8–17. <https://doi.org/10.1002/cm.10155>
- Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anatomy and embryology*, *199*(6), 471–487. <https://doi.org/10.1007/s004290050245>
- Stephens, R. E., Oleszko-Szuts, S., & Linck, R. W. (1989). Retention of ciliary nine fold structure after removal of microtubules. *Journal of cell science*, *92* (Pt 3), 391–402. <https://doi.org/10.1242/jcs.92.3.391>
- Stoltenberg, M., Sørensen, M. B., & Danscher, G. (1997). Histochemical demonstration of zinc ions in ejaculated human semen. *International journal of andrology*, *20*(4), 229–236. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00060.x>
- Sun, G., Jiang, M., Zhou, T., Guo, Y., Cui, Y., Guo, X., & Sha, J. (2014). Insights into the lysine acetylproteome of human sperm. *Journal of proteomics*, *109*, 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.002>
- Taylor, K. M., Muraina, I. A., Brethour, D., Schmitt-Ulms, G., Nimmanon, T., Ziliotto, S., Kille, P., & Hogstrand, C. (2016). Zinc transporter ZIP10 forms a heteromer with ZIP6 which regulates embryonic development and cell migration. *The Biochemical journal*, *473*(16), 2531–2544. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160388>

- Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., & Snyder, D. H. (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *The Journal of cell biology*, 59(2 Pt 1), 267–275. <https://doi.org/10.1083/jcb.59.2.267>
- Verdone, L., Agricola, E., Caserta, M., & Di Mauro, E. (2006). Histone acetylation in gene regulation. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 5(3), 209–221. <https://doi.org/10.1093/bfpg/ell028>
- Verhey, K. J., & Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(17), 2152–2160. <https://doi.org/10.4161/cc.6.17.4633>
- Vickram, S., Rohini, K., Srinivasan, S., Nancy Veenakumari, D., Archana, K., Anbarasu, K., Jeyanthi, P., Thanigaivel, S., Gulothungan, G., Rajendiran, N., & Srikumar, P. S. (2021). Role of zinc (Zn) in human reproduction: A journey from initial spermatogenesis to childbirth. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2188. <https://doi.org/10.3390/ijms22042188>
- Ward, W. S., & Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of reproduction*, 44(4), 569–574. <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569>
- Wloga, D., & Gaertig, J. (2011). Post-translational modifications of microtubules. *Journal of Cell Science*, 124(1), 154. <https://doi.org/10.1242/jcs.083576>
- World Health Organization, editor. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. Available online: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240030787> (accessed on 11 April 2022).
- Yu, I., Garnham, C. P., & Roll-Mecak, A. (2015). Writing and reading the tubulin code. *The Journal of biological chemistry*, 290(28), 17163–17172. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.637447>
- Zhao, L., Chen, W., Taylor, K. M., Cai, B., & Li, X. (2007). LIV-1 suppression inhibits HeLa cell invasion by targeting ERK1/2-Snail/Slug pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 363(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.127>
- Zhu, X., Yu, C., Wu, W., Shi, L., Jiang, C., Wang, L., Ding, Z., & Liu, Y. (2022). Zinc transporter ZIP12 maintains zinc homeostasis and protects spermatogonia from oxidative stress during spermatogenesis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 20(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00893-7>
- Zini, A., & Libman, J. (2006). Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 175(5), 495–500. <https://doi.org/10.1503/cmaj.060218>
https://biology4igcse.weebly.com/162_reproduction-in-humans.html
<https://step1.medbullets.com/reproductive/116008/spermatogenesis>

Biografija autora

Isidora Protić je rođena 09.07.1984. godine u Beogradu. Završila je OŠ Starina Novak, a srednje obrazovanje prema četvorogodišnjem programu u V beogradskoj gimnaziji.

Na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu izborna oblast joj je bila Histologija i embriologija (Diplomski rad: „Preembrionalni period razvića – rano razviće“, ocena 10). Diplomirani je biolog sa pravima na akademski naziv Master sa naznakom zvanja drugog stepena diplomskih akademskih studija (prosečna ocena 8.53). Doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisuje školske 2012/2013. godine, studijski program Biologija, modul Biologija ćelija i tkiva.

Od 2013. godine radi kao biolog, master – zdravstveni saradnik na odeljenju Medicinski potpomognute oplodnje Ginekološko akušerske Klinike Univerzitetskog kliničkog centra Srbije u Beogradu.

Član je Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju (SDMSRF) i European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Učesnik je nekoliko kurseva u inostranstvu: Pre-congress Course of the 34th Annual Meeting of ESHRE: „Male gametogenesis: will new research developments change infertility management“ Barcelona, Spain 01 July 2018; ESHRE Campus Symposium: Evidence-based practice in the IVF laboratory from 17 to 19 May 2018, Athens, Greece; Pre-congress Course of the 32th Annual Meeting of ESHRE: „PCC 12: ASRM exange course: Procedures and technique for embryo transfer in humans“ Helsinki, Finland, 02 July 2016.

Samostalno ili kao koautor objavila je tri (3) rada u časopisima međunarodnog značaja, ima četiri kongresna saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i tri kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja.

Govori engleski jezik – CPE exam (Certificate of Proficiency in English), završila je B nivo Državnog instituta ruskog jezika Puškin i ima osnovno poznavanje španskog jezika.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Исидора С. Протић _____
број индекса _____ Б3009/2012 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као

_____ маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида _____

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Исидора Протић

Број индекса Б3009/2012

Студијски програм Биологија, модул Биологија ћелија и ткива

Наслов рада Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14
као маркера структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида

Ментори Др Александра Кораћ, редовни професор

Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Др Снежана Видаковић, редовни професор

Универзитет у Београду-Медицински факултет

Потписани/а Исидора С. Протић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:
Ацетилација α -тубулина и експресија транспортера цинка ZIP6, ZIP10 и ZIP14 као

маркери структурне и функцијске хетерогености хуманих сперматозоида

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.