

ANTIBODIES AGAINST BULLS SPERM CELLS IN THE BLOOD SERUM AND CERVICAL MUCUS OF HEIFERS AND COWS

Jačević Vesna¹, Lazarević M.², Jakovljević G.³, Subotin L.⁴ and Jovičin M.⁵

¹ National poison control center, VMA, Belgrade; ² Faculty of veterinary medicine;

³ PKB Agro-economic, INI Padinska Skela; ⁴ SEMEX, PKB, Padinska Skela;

⁵ Scientific veterinary institute, Novi Sad

АНТИТЕЛА ПРОТИВ СПЕРМАТОЗОИДИ ОД БИК ВО КРВЕН СЕРУМ И ЦЕРВИКАЛНА СЛУЗ ОД ЈУНИЦИ И КРАВИ

Јакевиќ Весна¹, Лазаревиќ М.², Јаковљевиќ Г.³, Субојин Л.⁴, Јовичин М.⁵

¹ Национален центар за контрола на тројења, ВМА Белград; ² Факултет по ветеринарна медицина, Белград; ³ ПКБ Агро-економик, ИНИ Падинска Скела;

⁴ СЕМЕКС, ПКБ, Падинска Скела; ⁵ НИВ Нови Сад

INTRODUCTION

Recently we have analyzed numerous scientific papers dealing with the problem of antibodies directed towards sperm cells in the sera and cervical mucus of artificially inseminated cows (Lazarević and Jačević 1998). From the presented data, it could be concluded that there is a connection between asymptomatic sterility (repeat breeding) and the presence of anti-sperm antibodies in the above mentioned body fluids (Griffin et al. 1972, Farahani et al 1981, Vukotić 1982, Hunter, 1989). So far, one group of authors expressed different opinion (Park et al. 1977). Unfortunately, exact causes of repeat breeding are not well understood and, therefore, there is no appropriate treatment. We and others (Matoušek 1985, Hunter 1988) think that it is necessary to assess the possible role of the immunological factors influencing sterility for two obvious reasons. The first one lies in fact that artificial insemination (AI) changes physiological conditions prior to fertilization especially by diluting immunosuppressive seminal plasma (SP) and the second one lies in antigenic changes of sperm cell membrane during the technological procedure, freezing and thawing.

In this paper we will present results of our investigations conducted during the last two years in which we estimated spermagglutinin titer in

ВОВЕД

Неодамна анализираме поголем број на научни трудови кој ја обработуваа проблематиката за присуството на антитела против сперматозоидите во серумот и цервикалната слуз кај крави кои вештачко се осеменуваат (Lazarević i Jačević 1998). Од податоците кои се овде прикажани може да се заклучи дека постои врска помеѓу безсимптомскиот стерилитет (феномен преводување) и присуството на спермаглутинации во овие две телесни течности (Griffin i sor. 1972, Farahaini i sor. 1981, Vukotić 1982, Hunter 1989). Постојат автори кој изнесуваат и други мислења (Park i sor. 1977). За жал, вистинските причини за овој вид на неплодност кај кравите не се потполно познати така да правилен третман сеуште не постои. Ние и некои други автори (Matoušek 1985, Hunter 1989.) на мислење сме дека е потребно да се испита можната улога на имунолошките фактори кои делуваат на субфертилитетот и тоа од две основни причини. Првата лежи во податокот дека вештачкото осеменување (ВО) ги менува физиолошките односи пред фертилизацијата, пред се поради разредувањето на имуносупресивната семена плазма (СП), втората причина се однесува во промената на антигенската структура на мембраната од сперматозоидите после техно-

the cervical mucus and sera of heifers and cows with different insemination index. We had an additional reason for this kind of investigation because recently a new semen extender (Biociphos plus, IMV, France), containing no animal proteins, was introduced in the field practice. For all tests we used ejaculates originating from the same bulls but diluted with different extenders as well as native sperm cells from the same animals.

MATERIAL AND METHODS

Our investigations were conducted on 37 heifers and 38 cows of Holstein -Friesian breed. Animals were divided in six groups according to their reproductive results. The first group of heifers consisted of virgile animals that were not previously inseminated. The second group involved heifers that did not conceived after the first insemination and the third one of the heifers that did not conceived after the second insemination. The first group of cows consisted of animals that became pregnant after the first insemination, the second one of those animals that conceived after the second insemination and the third of the cows that were unsuccessfully inseminated more than three times. All heifers (except virgin animals) and cows were inseminated with bulls' semen diluted in TRIS egg yolk extender. Animals were kept under the normal farm environmental conditions of feeding and care (PK Belgrade).

Cervical mucus samples and blood sera were collected from healthy non-pregnant animals at the day of AI. Cervical mucus was obtained after the rectal cervix massage, cooled at +4 °C and kept frozen (- 20 °C) till the day of analyses. Blood samples were obtained by sterile jugular vein puncture and the sera were kept frozen (- 20 °C) until use.

The presence of spermagglutinin antibodies was estimated by the gelatin agglutination test (KBM - test - Kibrick, Belding and Merrill, 1952).

лошката обработка на семето за вештачко осеменување, замрзнување и одмрзнување.

Во овој труд ќе бидат изнесени резултатите од нашите испитувања извршени во последните две години во кои го одредувавме присуството на спермаглутининот во крвниот серум и цервикалната слуз кај јуници и крави со различен индекс на осеменување. Додатен мотив за нашите испитувања беше и почетокот на примената на новиот разредувач за сперма од бик кој не содржи анимални протеини (Biociphos plus IMV, Франција). При изведувањето на сите тестови користени се сперматозоиди од исти бикови суспендирани во два различни разреждатели како и сперматозоиди од истите животни од неразреден ејакулат.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Нашите испитувања се извршени на вкупно 37 јуници и 38 крави од Холштајн-фризиска раса. Животните беа поделени врз основа на репродуктивните резултати во 6 групи. Првата група јуници представуваа првотелни животни, кои не биле предходно осеменувани. Втората група ја сочинуваа јуници кои не останале гравидни после првото осеменување, а третата група се јуници кој не останале гравидни ниту после второто осеменување. Првата група крави ја сочинуваа животни кои концепираше по првото осеменување, втората крави кој останале стелни после второто ВО., а третата група се крави кои биле неуспешно осеменувани повеќе од три пати. Сите плоткињи кои беа вклучени во овие испитувања (со исклучок на првотелните јуници) се осеменувани со сперма од бик разрежена во ТРИС-жолточен разредувач. Јуниците и кравите беа држени под вообичаени услови на исхрана, чување и нега (ПК Белград).

Примероците од цервикалната слуз и крвниот срум од јуниците и кравите, добиени се од здрави негравидни животни на денот на ВО. Цервикалната слуз е добиена со мануелна масажа на цервиксот и е разладена до +4°C, а потоа чувана на -20°C до моментот на употребата. Примероците од крв се добиени по пат на стерилна венепункција на в. јунгуларис, а серумот потоа е замрзнуван и чуван на температура од -20°C до моментот на употреба.

This test belongs to the group of methods for the detection of reaction between antibodies and particles (i.e. cells). KBM test has been used for a long time because of its satisfactory sensitivity and reproducibility. At the very beginning, it was employed for the detection of antibodies in heterogeneous sera, but later on, with the same success for the iso- and autoantibodies detection (Noel et al., 1974).

We have used ejaculates of Holstein - Friesian bulls collected by means of an artificial vagina in the Regional Center for Reproduction and Embryotechnology (PKB - Agro-economic). After ejaculate collection motility and viability of sperm cells were estimated and samples were cooled at + 4 °C. For further use we selected only ejaculates that were of high quality standards according to usual criteria (volume 3-7 ml, at least 80 % of viable cells, 1×10^9 sperm cells/ml and pH 6.7 - 7.5). To obtain suspension of sperm cells prepared for AI we used bulls semen kept in plastic straws at - 196 °C. Spermatozoa from the same bulls were used, but diluted in different extenders: TRIS egg yolk extender and Biociphos plus.

TRIS egg yolk extender:

TRIS	13.0 g
Fructose	4.8 g
Citric acid	6.08 g
Glycerin	6.0 g
Penicilline	5 mil IU
Streptomycine	0.5 g
H ₂ O redest.	400.0 ml
Egg yolk	100.0 ml

Biociphos plus extender: Physiological saline solution, glycerol, kryoprotector, Gentamycine, Tylosine, Lincomycin, Spectinomycine

The thawed semen (usually from 10 straws of 0.45 ml) was placed in plastic 15 ml tubes and suspended in app. 12 ml of Backers buffer saline pH 7.2 (BBS). The suspension was centrifuged for 10 min at 2000 rpm and supernatant was discarded. The washing procedure was repeated twice under the same conditions.

Доказувањето на присуството на спермаглутинаинот вршено е со методата аглутинација во желатин (KBM test - Kibrick, Belding i Merrill, 1952). Овој тест се вбројува во групата медоти кои се користат за докажување на реакцијата помеѓу антителата и уобичаените честици (на пример клетките). KBM тестот се користи веќе подолго време бидејќи се одликува со висока репродукцибилност и осетливост. Во почетокот, оваа метода се користела за докажување на антителата во хетерологични серуми, додека покасно се приманува со иста точност и за докажување на изо и ауто-антитела (Noel i sog., 1974).

Во текот на испитувањето користени се ејакулати од бикови од Холштајн-фризиската раса кои се добиени по пат на вештачка вагина во регионалниот центар за вештачко осеменување ПКБ АГРОЕКОНОМИК, Центар за репродукција и ембриотехнологија. Веднаш по добивањето на ејакулатот одредувана е подвижноста и виталноста на сперматозоидите а потоа примероците беа ладени до +4°C. За понатамошна употреба издвоени се само оние ејакулати кои по вообичаените критериуми се оценети како квалитетни (волумен 3-7 мл, најмалку 80% живи сперматозоиди, број на сперматозоиди 1×10^9 клетки/мл и pH 6,5-7,5). За добивање на суспензија од сперматозоидите кои се припремени за ВО, користевме семе од бикови е чувано во облик на пајети во течен азот на -196°C. Во текот на испитувањето го користевме семето од истите бикови приоремено за ВО со помош на 2 различни разредувачи: ТРИС-жолточен разредител и разредувач Biociphos plus (IMV Francija).

ТРИС-жолточен разредувач:

ТРИС	13.0 г
Фруктоза	4.8 г.
Лимунска киселина	6.05 г.
Глицерин	6.00 г.
Пеницилин	5000000 ИЈ
Стрептомицин	0.5 г.
H ₂ O ад	400 мл.
Жолчка од кокошкино јајце	100 мл.

Разредител Biocophos plus: физиолошки раствор, глицерол, замена за жолчка и антибиотици (Гентамицин, Тилосин, Линкомицин, Спецтиномицин).

Backers buffer saline:

Glucose	3.00 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	0.46 g
NaCl	0.20 g
KH ₂ PO ₄	0.01 g
H ₂ O dest.	d 1000.00 ml

The concentration of sperm cells was estimated by hemocytometer using 3 % NaCl solution and the number of cells in the suspension was adjusted with BBS (37 °C) to reach the final concentration of 40 x 10⁶/ml. Finally, the same volume of 10 % gelatin solution (37 °C) was added to sperm cells suspension.

The cervical mucus samples were thawed, centrifuged (10 min, 3000 rpm) inactivated (20 min, 56 °C) and subjected to liquefaction using a papain like enzyme Bromelin (Sigma No B-2252). Bromelin (0.1 g of powder) was dissolved in 16 ml of 0.01 M PBS, pH 7.2. In addition, 0.06 ml of Bromelin solution was added to 1 ml of cervical mucus. At the end, 0.2 ml of each cervical mucus sample was placed in plastic serological tubes. From this point, the procedure was same as for the serum samples.

The cervical mucus samples were diluted with BBS as follows: 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 while the sera samples were diluted in the following order: 1:16, 1:64, 1:256 and 1: 1024.

In order to obtain a positive control antiserum 4 rabbits of Chinchilla breed were immunized weekly, over a five week period, subcutaneously with the mixture of sperm cells and TRIS egg yolk extender (from straws) in the complete Freund adjuvant. Rabbit sera before immunization served as negative control.

Gelatin agglutination test was performed according to the original references (Kibrick et al. 1952, Noel et al 1974.). The results were registered after two hours of incubation at 37 °C and agglutination was seen as white flocculates in the transparent surrounding medium.

Растопеното семе, најчесто од 10 пајети од по 0,45 мл, префрлувано е во пластични епрувети со волуман од 12 мл кои подоцна до врвот се дополнуваат со Becker-ов пуфер (pH 7.2). Супензијата подоцна се центрифугира на 2000 вртења во 10 минути, после тоа се одлива супернатантот. Постапката на испирање се повторува уште два пати под исти услови.

Becker-ов пуфер:

Глукоза	3.00г.
Na ₂ HPO ₄ x7H ₂ O	0.46g.
NaCl	0.2g.
KH ₂ PO ₄	0.01g.
H ₂ O	ad 1000

За одредување на вкупниот број на сперматозоиди користена е комора за броење крвни клетки и 3% NaCl а бројот на клетките во супензијата е подесен со Becker-ов пуфер (37°C) до финалната концентрација од 40x10⁶ клетки /мл. На крај на вака разредената супензија и се додава иста количина раствор на 10% желатин во Becker-ов пуфер, исто така загреан на 37°C.

Примероците од цервикалната слуз од јуниците и кравите се потопувани и центрифугирани (10мин. 3000rpm) и инактивирани (20 min, 56°C) а потоа подложени на ликфифакција со ензим сличен на папаин-бромелин (SIGMA No. B-2252). За растварање на Бромелинот (0,1гр.) се користи 16мл. 0.01M раствор PBS со pH = 7,2. Цервикалната слуз (1мл.) се меша со 0.06мл. растворен Бромелин а потоа во секоја серолошка епрувета се одмерува по 0.2 мл разредена цервикална слуз. Понатамошната постапка со примероците на цервикална слуз е иста како и со крниот срум.

Примероците од цервикалната слуз беа разредени со Becker-ов пуфер и користени се 4 разредувања: 1:4, 1:8, 1:16 и 1:32 додека од секој примерок на крвен срум направени се следниве разредувања 1:16, 1:64, 1: 256 и 1:1024.

Со цел да се добие позитивен контролен антисерум извршена е имунизација на 4 куникули, од Чинчила раса со траење од 5 недели. Куникулите се имунизирани неделно со смеса од разредувач и Freund-ов адјуванс и смеса од супензија на сперматозоиди во адјуванс, во доза од по 1мл. с/ц. Серумот добиен пред имунизацијата е користен како негативна контрола.

STATISTICAL ANALYSES

The results were analyzed statistically and the mean values and standard deviations were calculated. The spermagglutinin titer was expressed as $-\log_2 n$ (Sjurin et al. 1984). For the estimation of statistical significance of the obtained differences we used as non-parametric method Mann - Whitney test.

RESULTS

The spermagglutinin titer values ($-\log_2 n$) in the sera of heifers and cows inseminated with bulls semen diluted in TRIS - egg yolk extender, when KBM test was performed with the sperm cells previously suspended in the same extender, are presented on the Graph 1. and the statistical significance of the obtained differences in the Table 1.

Пробата на аглутиназија во желатин е изведена на начин опишан во оргиналните текстови (Кибрицк и сор. 1952, Ноел и сор. 1974). Резултатите се читани после инкубација на 37°C со траење од 2 часа, а аглутинацијата се забележува како појава на бели флокули со разбистрување на околниот медиум.

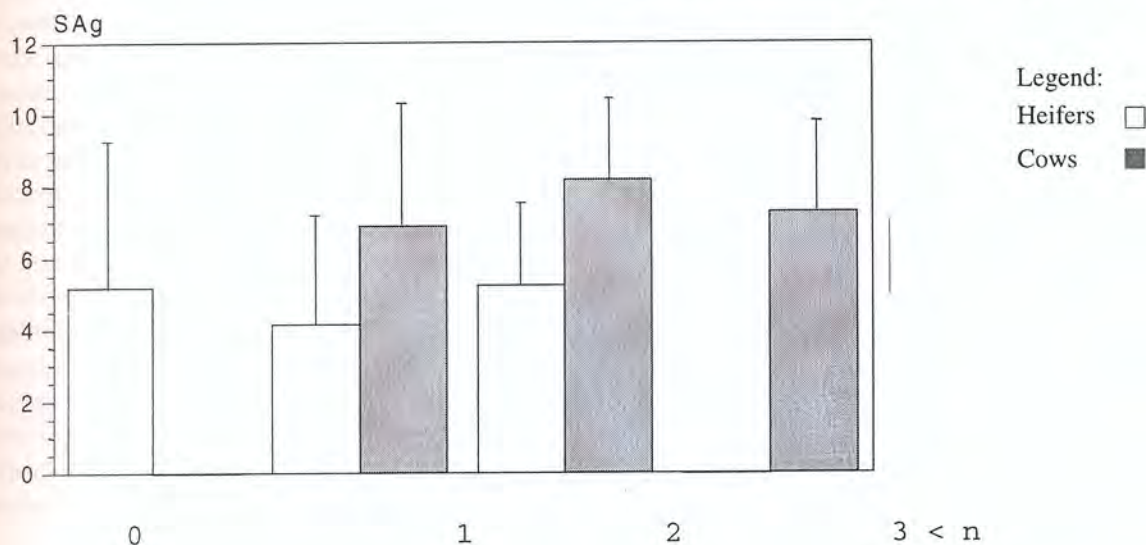
СТАТИСЧКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите добиени со овие испитувања обработени се со примена на основните статистички параметри: средна вредност (\bar{x}) и стандардна девијација (SD).

Титарот на спермаглутинините е изразен како $-\log_2 n$ (Sjurin i sor. 1988). За одредување на статистичката значајност на утврдените разлики користен е Mann-Whitney тест.

РЕЗУЛТАТИ

Резултатите од испитувањето за висината на титарот на спермаглутинините во крвниот серум кај јуниците и кравите со раз-



SAg spermagglutinin titre ($-\log_2 n$)
0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 1. Mean spermagglutinin titre in the sera of heifers and cows with different insemination index (TRIS - egg yolk extender)

Графикон 1: Средна вредност на титарот на спермаглутинините во крвниот серум на јуници и крави со различен индекс на осеменување (ТРИС-жолтјочен разреувач)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				NS	NS	$p < 0.05^*$
H - 1	$p < 0.05^*$			$p < 0.05^*$	$p < 0.01^{**}$	$p < 0.05^*$
H - 2	NS	NS		NS	NS	$p < 0.05^*$
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

Table 1. Statistical differences of the spermagglutinin titre values - blood serum of heifers and cows with different insemination index (TRIS - egg yolk extender)

Табела 1: Оцена на статистичката значајност на разликите во титарот на спермаглутинините во крвниот серум кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (ТРИС-жолточен разредувач)

H - heifers (крави); C - cows (јуници)
0, 1, 2, 3 - total number of inseminations
(вкупен број на осеменувања)
NS - non significant (без статистички
значајни разлики)

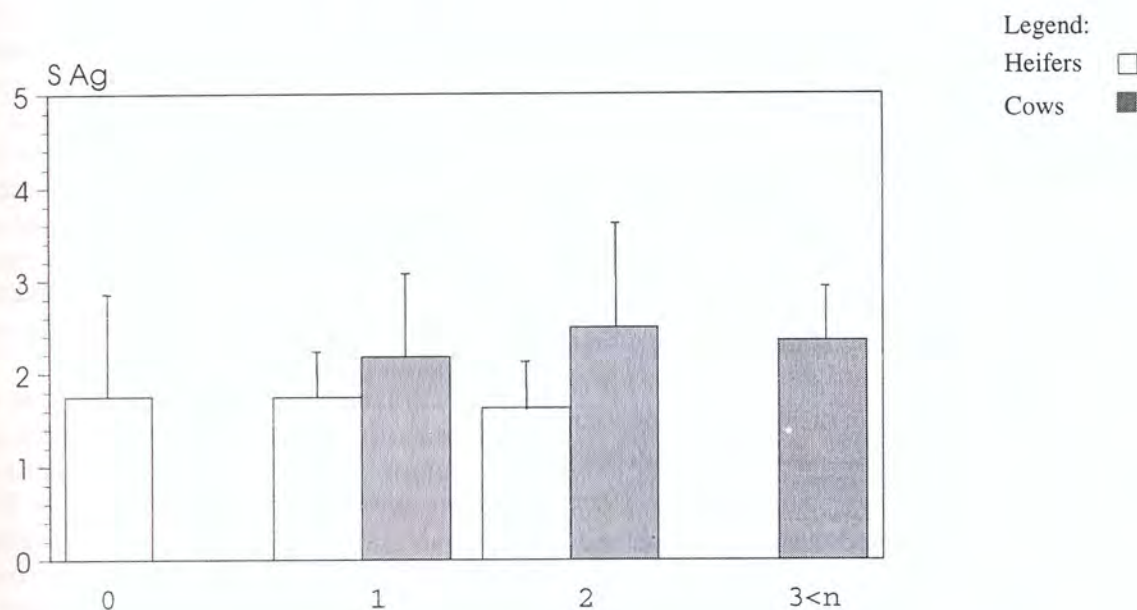
The statistical analyses of the spermagglutinin titer in the sera of heifers and cows with different insemination index (Mann Whitney test) revealed the presence of the significant differences between the heifers inseminated once and the all group of cows ($p < 0.01$ or 0.05). Furthermore, the significant differences were obtained between cows inseminated more than three times and all groups of heifers ($p < 0.05$) and finally between heifers inseminated once and virgile heifers ($p < 0.01$). Between other groups of animals the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). However, the spermagglutinin titer was constantly higher in cows than in heifers.

The spermagglutinin titer values in the cervical mucus samples of heifers and cows inseminated with bull semen diluted in TRIS - egg yolk extender, when KBM test was performed with the sperm cells previously suspended in the same extender, are presented on the Graph 2. and the statistical significance of the obtained differences in the Table 2.

личен индекс на осеменување (осеменети со семе од бик кое е припремено во ТРИС-жолточен разредувач) кога е изведувач КБМ со примена на сперматозоиди кои предходно биле суспендирани во истиот разредувач прикажани се на графиконот бр. 1, а статистичката значајност за утврдените разлики прикажана е на табела бр. 1.

По пат на статистичка анализа на вредностите на титарот на спермаглутинините (Mann-Withney test) во крвниот серум кај крави и јуници со различен индекс на осеменување, утврдени се статистички значајни разлики помеѓу јуниците кој се осеменети еднаш и сите останати групи на крави ($p < 0.01$ или 0.05). Покрај тоа, статистички значајни разлики утврдени се помеѓу каравите кои се осеменети повеќе од три пати и сите групи на јуници ($p < 0.05$) и на крај, помеѓу првотелните јуници и јуниците кои се осеменети еднаш ($p < 0.01$). Кај останатите набљудувани групи на животни овие разлики не се забележани ($p > 0.05$). Титарот на спермаглутинините скоро секогаш имал поголема вредност кај кравите одколку кај јуниците.

Резултатите од испитувањата за висината на титарот на спермаглутинините во узорците од цервикалната слуз на кравите и јуниците кои се осеменети со семе од бик кое е разредено во ТРИС-жолточен разредувач кога КБМ тестот е изведен со семе кое претходно е суспендирано во истиот разредувач прикажани се на графикон бр. 2, а статистичката значајност за утврдените разлики на табела бр. 2.



S Ag spermagglutinin titre ($-\log_2 n$)
0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 2. Mean spermagglutinin titre in the cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (TRIS - egg yolk extender)

Графикон 2: Средна вредносћ на спермаглућининије во цервикалној служ на јуници и крави со различен индекс на осеменување (ТРИС-жолћочен разредувач)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				NS	$p < 0.01^{**}$	NS
H - 1	NS			NS	NS	NS
H - 2	NS	NS		NS	NS	$p < 0.05^{*}$
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

H - heifers (крави); C - cows (јуници)

0, 1, 2, 3 - total number of inseminations (вкупен број на осеменувања)

NS - non significant (без статистички значајни разлики)

Table 2. Statistical differences of the spermagglutinin titre values - cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (TRIS-egg yolk extender)

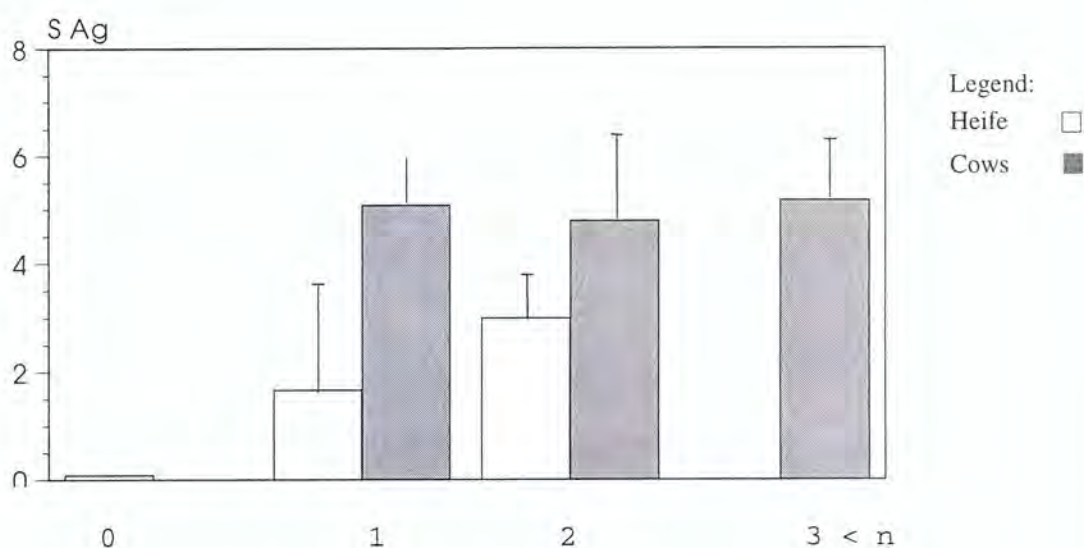
Табела 2: Оцена на статистичката значајност на разликите во спермаглућининије во цервикалној служ кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (ТРИС-жолћочен разредувач)

As estimated by Mann Whitney test, the spermagglutinin titer in the cervical mucus was significantly lower in the heifers inseminated once than in the cows inseminated twice ($p < 0.01$) and in the heifers inseminated twice compared to the cows inseminated three or more times ($p < 0.05$). Between other groups of animals the differences were not statistically significant ($p > 0.05$). As in the blood serum the spermagglutinin titer was constantly higher in cows than in heifers.

The spermagglutinin titer values ($-\log_2$) in the sera of heifers and cows inseminated with bulls semen diluted in TRIS-egg yolk extender, when KBM test was performed with the sperm cells previously suspended in the Biociphos plus extender, are presented on Graph 3 and their statistical significance on Table 3.

Како што е потврдено со Mann-Witney тестот, титарот на спермаглутинините беше статистички значително помал кај јуници кои се осеменети два пати во однос на кравите кои се осеменети два пати ($p < 0,01$), како и кај јуниците кои се осеменети два пати во однос на кравите кои се осеменети три и повеќе пати ($p < 0,05$). Помеѓу останатите групи на плод-кињи немаше статистички значајни разлики ($p > 0,05$). Како и кај крвниот серум титарот на спермаглутинините константно имаше поголема вредност кај кравите.

Резултатите од испитувањата за висината на титарот на спермаглутинините (\log_2) во крвниот серум кај јуници и крави кои се осеменети со семе од бик разредено во ТРИС-жолточен разредувач, кога за изведување на KBM тестот користени се сперматозоиди предходно суспендирани во разредувач Biociphos plus, прикажани се на графикон бр. 3, а статистичката значајност на утврдените разлики во табела бр. 3.



S Ag spermagglutinin titre ($-\log_2$)
0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 3. Mean spermagglutinin titre in the sera of heifers and cows with different insemination index (Biociphos plus extender)

Графикон 3. Средна вредност на титарот на спермаглутинините во крвниот серум на јуници и крави со различен индекс на осеменување (Biociphos plus)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				p<0.001***	p<0.001***	p<0.001***
H - 1	p<0.001***			p<0.001***	p < 0.01**	p<0.001***
H - 2	p<0.001***	p<0.001***		p < 0.01**	p<0.001***	p<0.001***
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

Table 3. Statistical differences of the spermagglutinin titre values – blood sera of heifers and cows with different insemination index (Biociphos plus extender)

Табела 3: Оцена на статистичката значајност на разликите во титарот на спермаглутинините во крвниот серум кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (Biociphos plus)

H - heifers (крави); C - cows (јуници)
0, 1, 2, 3 - total number of inseminations
(вкупен број на осеменувања)
NS - non significant (без статистички
значајни разлики)

The statistical analyses of the spermagglutinin titer in the sera of heifers and cows with a different insemination index (Mann Whitney test) when KBM test was performed with sperm cells suspended in Biocipsos plus extender, revealed the presence of significant differences between heifers vs heifers and heifers vs cows. ($p < 0.01$ or 0.001) but not between cows. The spermagglutinin titer was again constantly higher in cows than in heifers.

Almost the same results were obtained in the cervical mucus of heifers and cows as presented on Graph 4 and table 4.

The spermagglutinin titer values ($-\log_2$) in the sera of heifers and cows inseminated with bull semen diluted in TRIS - egg yolk extender, when KBM test was performed with the washed sperm cells from native ejaculates, are presented on Graph 5. Statistical significance of the obtained differences are shown in Table 5.

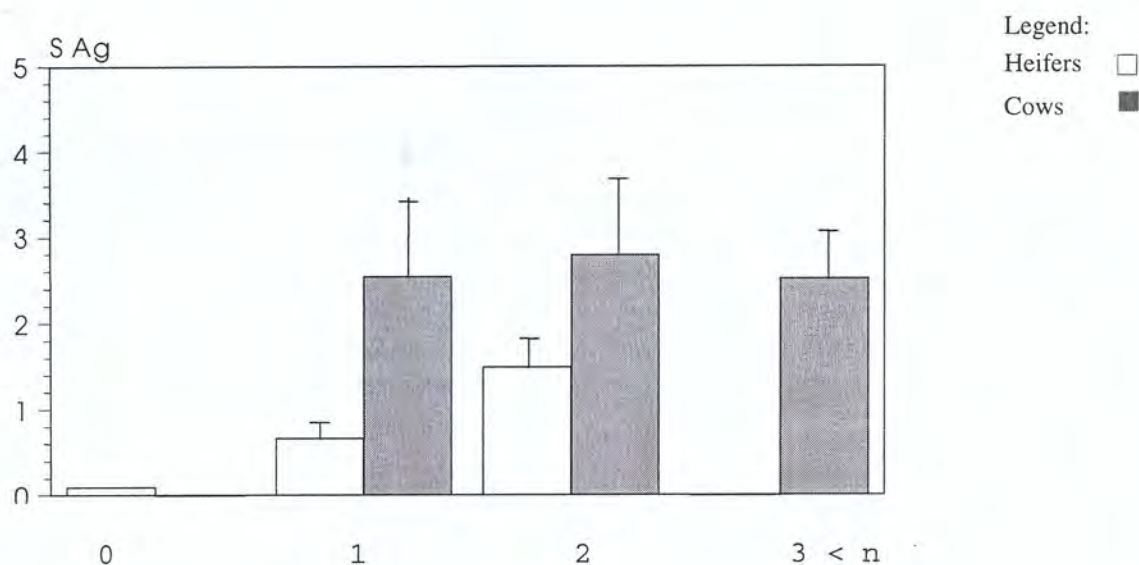
The statistical analyses of the spermagglutinin titer in the sera of heifers and cows with a different insemination index (Mann Whitney test) when KBM test was performed with washed sperm cells, revealed the presence of the significant differences between heifers vs heifers and heifers vs cows. ($p < 0.001$) but not between cows vs cows ($p > 0.01$). As can be seen on Graph 5, spermagglutinin titer was again constantly higher in cows than in heifers.

По пат на статистичка анализа титарот на спермаглутините од крвниот серум на јуниците и кравите со различен индекс на осеменување, (Mann-Witney), кога за изведување на KBM тестот користени се сперматозоиди предходно суспендирани во разредавачот Biociphos plus, утврдено е дека постои висока статистички значајна разлика помеѓу испитуваните групи на јуници како и јуници и крави ($p < 0.001$ или $p < 0.01$) додека помеѓу испитуваните групи крави не постои статистички значајна разлика.

Добиени се скоро исти резултати и при испитувањето на висината на титарот на спермаглутинините во цервикалната слуз кај јуниците и кравите со различен индекс на осеменување како што е прикажано на графиконот бр. 4 и во табела бр. 4.

Резултатите од испитувањата за висината на титарот на спермаглутинините во крвниот серум на јуници и крави со различен индекс на осеменување, осеменети со семе од бик разредадено во ТРИС-жолточен разредавач, кога при изведувањето на аглутинациониот тест користени се сперматозоиди од бик добиени од нативен ејакулат, прикажани се на графиконот бр. 5, додека статистичката значајност на утврдените разлики прикажана е во табела бр. 5.

Статистичката анализа за вредностите на титарот на спермаглутинините во крвниот серум на јуници и крави со различен индекс на осеменување, кога за испитување користени се испрани сперматозоиди од ејакулат на бик, со помош на Mann-Witney тестот, докажа постоење на статистички значајни разлики (0.001) помеѓу јуниците од сите групи, како и помеѓу јуниците и кравите, но не и помеѓу самите крави. Како што се гледа на графиконот бр. 5 титарот на спермаглутинините во сите случаи бил поголем кај кравите отколку кај јуниците.



S Ag spermagglutinin titre ($-\log_2 n$)
0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 4. Mean spermagglutinin titre in the cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (Biociphos plus extender)

Графикон 4. Средна вредности на титијароти на спермаглутининије во цервикалнајта слуз на јуници и крави со различен индекс на осеменување (Biociphos plus)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				$p < 0.001^{**}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 1	$p < 0.001^{***}$			$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 2	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$		$p < 0.05^*$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

H - heifers (крави)

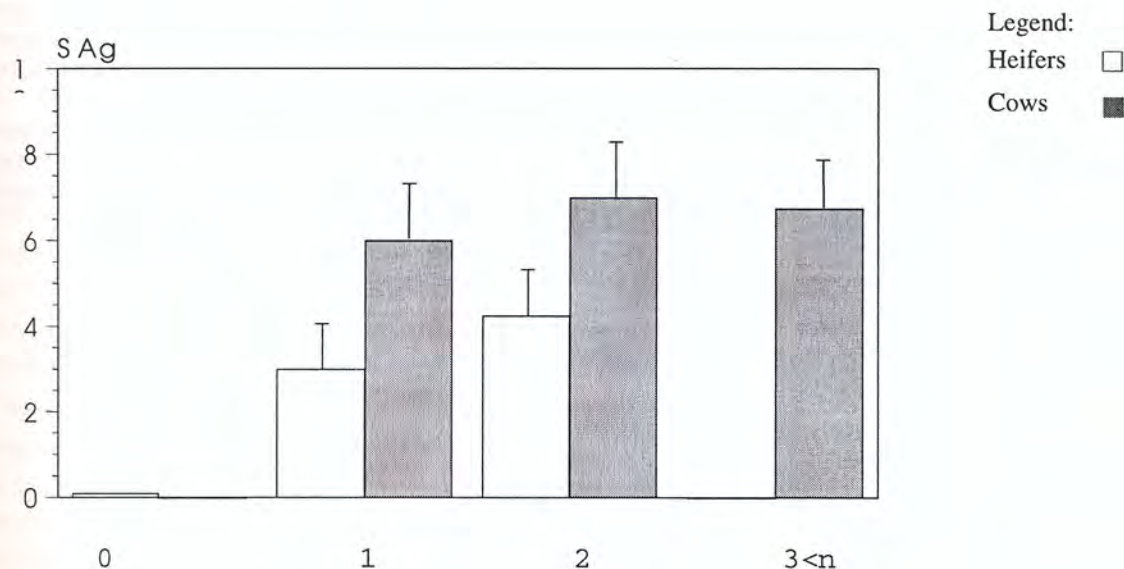
C - cows (јуници)

0, 1, 2, 3 - total number of inseminations (вкупен број на осеменувања)

NS - non significant (без статистички значајни разлики)

Table 4. Statistical differences of the spermagglutinin titre values - cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (Biociphos plus extender)

Табела 4: Оцена на статистичкајта значајности на разликије во титијароти на спермаглутининије во цервикалнајта слуз кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (Biociphos plus)



S Ag spermagglutinin titre ($-\log_2 n$)

0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 5. Mean spermagglutinin titre in the sera of heifers and cows with different insemination index (native spermatozoa)

Графикон 5: Средна вредност на титрот на спермаглутинација во крвниот серум на јуници и крави со различен индекс на осеменување (нативни сперматозоиди)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 1	$p < 0.001^{***}$			$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 2	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$		$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

H - heifers (крави)

C - cows (јуници)

0, 1, 2, 3 - total number of inseminations (вкупен број на осеменувања)

NS - non significant (без статистички значајни разлики)

Table 5. Statistical differences of the spermagglutinin titre values – blood sera of heifers and cows with different insemination index (native sperm cells)

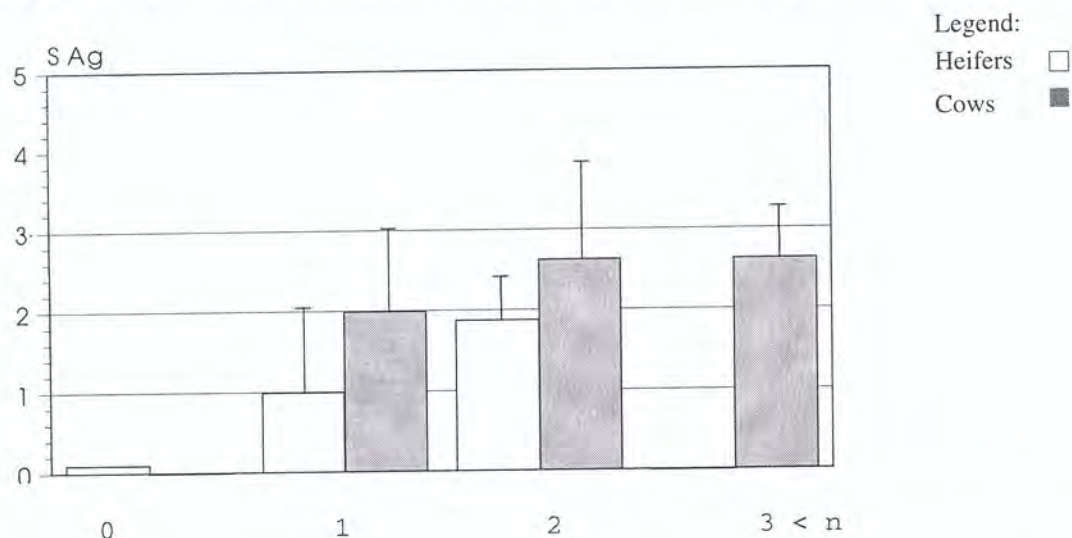
Табела 5: Оцена на статистичката значајност на разликите во титрот на спермаглутинација во крвниот серум кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (истирени сперматозоиди од ејакулат на бик)

As in the previous case, nearly the same results were obtained in the cervical mucus of heifers and cows as presented on Graph 6. and Table 6.

In this case there were not statistical differences between heifers inseminated twice and all groups of cows and also between cows vs cows.

Како и во претходниот случај скоро идентични резултати се добиени и од примероците на цервикалната слуз од јуниците и кравите како што е прикажано на графиконот бр. 6 и табела бр. 6.

Во овој случај немаше статистички значајни разлики помеѓу јуниците осеменети два пати и кравите од сите групи, како и помеѓу самите кравите.



S Ag spermagglutinin titre ($-\log_2 n$)
0, 1, 2, 3 and more - total number of AI

Graph 6. Mean spermagglutinin titre in the cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (native spermatozoa)

Графикон 6: Средна вредност на титрацијата на спермаглутиназиниите во цервикалната слуз кај јуници и крави со различен индекс на осеменување (најивни сперматозоиди)

	H - 0	H - 1	H - 2	C - 1	C - 2	C - 3 <
H - 0				$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 1	$p < 0.01^{**}$			$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$	$p < 0.001^{***}$
H - 2	$p < 0.01^{**}$	$p < 0.01^{**}$		NS	NS	NS
C - 1						
C - 2				NS		
C - 3 <				NS	NS	

H - heifers (крави); C - cows (јуници)
0, 1, 2, 3 - total number of inseminations (вкупен број на осеменувања)
NS - non significant (без статистички значајни разлики)

Table 6. Statistical differences of the spermagglutinin titre values - cervical mucus of heifers and cows with different insemination index (native sperm cells)

Табела 6: Оцена на статистичката значајност на разликите во титрацијата на спермаглутиназиниите во цервикалната слуз кај крави и јуници со различен индекс на осеменување (најивни сперматозоиди)

DISCUSSION

The analyses of the spermagglutinin titer values in the blood sera and cervical mucus of heifers and cows with a different insemination index (all animals were inseminated with bull semen diluted in TRIS - egg yolk extender), using sperm cells from native ejaculates and sperm cells from AI straws, revealed antigenic differences between the spermatozoa suspended in different extenders. Therefore, the validity of the KBM test has been confirmed for discovering of antigenic changes. The assessment of the spermagglutinin titer in blood sera and cervical mucus is a step forward in the investigation of possible causes of the asymptomatic sub-fertility of heifers and cows. In future extended investigations of this kind could confirm the hypothesis (Vukotić, 1986) that the interaction between sperm cells, seminal plasma and extender leads to changes in antigenic structure of the cell membrane and has influence on the seminal plasma functions.

We have noticed that the elevation of the spermagglutinin titer in the blood sera of females correlates with the number of AI, as stated by other authors (Griffin et al., 1973., Hunter, 1989.). In our investigations, this correlation was not always clear, possibly because of a small number of animals in some groups. Besides that, it is well known that in humoral immune response Ig G antibodies are the most important class and can be discovered by other methods, i.e. immunofluorescence (Vukotić et al., 1982).

Our results in the estimation of the spermagglutinin titer in the cervical mucus of heifers and cows are in agreement with Hansen (1972) who stated that there is a correlation between antisperm antibodies in the cervical mucus and the number of A.I. The antibodies in the cervical mucus belong to Ig A class that is well documented in human medicine, as well as in laboratory rodents. In that prospect, our findings can contribute in explaining the role of local immunity in the development of asymptomatic sterility in domestic animals.

ДИСКУСИЈА

Анализирајќи ги вредностите за титарот на спермаглутинините во крвниот серум и цервикалната слуз кај јуници и крави со различен индекс на осеменување, осеменети со семе од бик припремено во ТРИС-жолточен разредувач, кога при изведувањето на аглутинациониот тест во желатин се користени сперматозоиди од пајети за ВО и испитани сперматозоиди од бикови ејакулати, го потврдивме постоењето на антигенските разлики помеѓу сперматозоидите од различни разредувачи. Покрај тоа, ја потврдивме и валидноста на применетата метода за откривање на промените во антигенската структура. Одредувањето на вредноста на титарот на спермаглутинините во крвниот серум и цервикалната слуз представува чекор напред во проучувањето на можните причини во безсимптоматскиот стерилитет кај јуниците и кравите. Идните истражување би можеле да ја потврдат хипотезата (Vukotić, 1986) дека интеракцијата помеѓу сперматозоидите, семената плазма и разредувачот доведуваат до промена на антигенската структура на мембраната од сперматозоидите и има влијание врз функцијата на семената плазма.

Ние увидовме дека порастот на титарот на спермаглутинините во крвниот серум од испитуваните плоткињи пропорционален е на бројот на ВО како што изнесуваат и другите автори (Griffin i sor. 1973, Hunter 1989). Во нашите испитување оваа корелација не беше сосема јасна веројатно поради малиот број на животни во поединечните групи. Покрај тоа, познато е дека за хуморалната имунолошка реакција одговорни се IgG антителата, кои попрецизно се докажуваат со други имунолошки техники, како што е имунофлуоресцентниот тест (Vukotić i sor. 1982).

Нашите резултати во врска со одредување на висината на титарот на спермаглутинините во цервикалната слуз од јуници и крави се сложуваат со резултатите на Hans (1972), кој тврди дека постои корелација помеѓу присуството на антитела во цервикалната слуз и бројот на ВО. Антителата во цервикалната слуз припаѓаат на IgA класата што е познато од хуманата медицина

Apart from that, TRIS egg yolk extender changes the antigenic structure of the sperm cell membrane as confirmed by the semiquantitative KBM test. This finding is in agreement with the opinion of numerous authors (Omran and Hulka, 1971, Coulter et al., 1976, Foulkes et al., 1977, O'Connor and Saacke, 1978) that standard semen extenders contain numerous antigens in high concentrations and that most of them originate from the egg yolk. The degree of agglutination in the majority of samples was significantly reduced when sperm cells previously suspended in Biociphos plus extender, were used for the test.

Despite the increasing spermagglutinin titer value, it is necessary to stress out that females are usually sub - fertile rather than sterile. Their reproductive performance is significantly improved if they are subjected to natural breeding (Vukotić 1986). In an analyses of these results, we must keep in mind, that, especially in animals with estrus disorders and in animals that are not inseminated at the right time, chances for immunization with sperm and extender antigens are quite high. Additionally, the amount of seminal plasma, containing numerous immunosuppressive factors, is 50-100 times higher in natural breeding compared to the AI, and, therefore, chances for immunization are even bigger. We had demonstrated earlier that immunosuppressive effects of bulls seminal plasma are not completely lost during semen processing (Lazarević 1991). Bovines have a vaginal type of semen deposition, so the exact amount of seminal plasma reaching the upper portions of the genital tract is not known, but for sure, this amount is much smaller than in AI.

It is our belief that in technology of semen preparation for AI both extenders (TRIS - egg yolk and Biociphos plus) should be used. In the cases of a repeat breeding, we should use the semen diluted in the extender not been previously used. There are some indications that this approach can yield better reproductive results. Now we are waiting for the confirmation from the field practice.

како и од испитувањата што се вршени на глодари. Во таа смисла, нашите наоди претставуваат придонес во расветлувањето на улогата на локалната имунолошка реакција во настанувањето на безсимптоматскиот стерилитет кај домашните животни.

Покрај тоа, ТРИС-жолточниот разреducач значително ја менува антигенската структура на семето од бик припремено за ВО што е потврдено со семиквантитативната постапка (КБМ-Тест). Овој наш наод е во склад со мислењето на бројни автори (Omran and Hulka 1971, Coulter isor. 1976, Foulkes i sor. 1977, O-Conor and Saacke, 1978) дека стандардните сперморазредувачите содржат бројни антигени (во висока концентрација) и дека поголем дел од нив потекнуваат од жолчката на кокошкиното јајце. Степенот на аглутинација на сперматозоидите со антителата од крвниот серум и цервикалната слуз од јуниците и кравите во поголем број примероци е значително намален кога при изведувањето на тестот се употребени сперматозоиди претходно суспендирани во разреducачот Biociphos plus.

Меѓутоа и покрај порастот на титарот на спермаглутинините, потребно е да се истакне дека плодките главно се субфертилни, а не стерилни. Кај природниот припуст нивните репродуктивни резултати видно се подобруваат ($p < 0,001$) (Vukotić, 1986). При набљудувањето на овие резултати не смее да се занемари податокот дека кај животните со пореметен естрален циклус како и кај животните кои не се осемениваат во правиот момент зголемени се шансите за имунизација со антигените од ејакулатот и разреducачот. Покрај тоа, мора да се знае дека количината на семената плазма, која содржи бројни имуносупресивни фактори, при природното парење е 50-100 пати поголема одколку при ВО, што уште повеќе ја зголемува шансата за имунизација. Ние порано докажавме дека имуносупресивните ефекти на семената плазма од бик не се губат потполно за време на технолошката обработка на семето (Lazarević, 1991). Кај говедата постои вагинален тип на депонирање на семето така да не е познато колкава количина од семената плазма пристигнува во утерусот, но секако таа количина е поголема одколку при ВО.

CONCLUSION

In this study we were able to demonstrate the existence of the antigenic difference between the native bull spermatozoa and spermatozoa suspended in different extenders. Furthermore, the validity of the semiquantitative KBM test has been confirmed for discovering of such antigenic changes. The elevation of the spermagglutinin titer in the blood sera and cervical mucus of inseminated heifers and cows correlates with the number of AI, as also stated by other authors. Our findings can contribute in explaining the role of local and systemic immunity in the development of asymptomatic sterility in domestic animals.

Ние сметаме дека во технологијата за припрема на семето за ВО треба да се задржат во употреба и двата разрејувачи (ТРИС-жолточен и Biosiphos plus). Во случај на преведувањето би требало да се користи семе разредено во оној разредител кој дотогаш не бил користен. Постојат индикации дека ваквиот пристап дава подобри репродуктивни резултати. Моментално, очекуваме праксата да ја потврди оваа хипотеза.

ЗАКЛУЧОК

Во овој труд ние го докажавме постоењето на антигенските разлики помеѓу нативните сперматозоиди од бик и сперматозоиди суспендирани во различни разрејувачи. Освен тоа утврдена е и валидноста на семиквантитативниот KBM тест во откривањето на овие антигенски разлики. Зголемувањето на титарот на спермаглутинаините во крвниот серум и цервикалната слуз кај осеменетите јуници и крави беше во корелација со на вештетките осеменувања, како што наведуваат и други автори. Нашите наоди можат да допринесат во објаснувањето на улогата на системскиот и локалниот имунитет во настапувањето на асимптоматскиот имунитет кај домашните животни.

REFERENCES

- Lazarević M. i Vesna Jačević:** Spermaglutinini i plodnost junica i krava, Vet. Glasnik, Vol 52., No 7-8 str. 345-356, 1998.
- Vukotić M.:** Neki aktuelni problemi imunologije reprodukcije, Zbornik predavanja XII seminara za stručno usavršavanje veterinarara, Fakultet Veter. Medicine, Beograd, str. 147-158, 1983.
- Vukotić M.:** Današnje shvatanje imunološke uloge semene plazme s pogledom na v.o. krava i njegov odnos prema prirodnom parenju, Crnogorska akademija nauka i umetnosti, Glasnik odeljenja prirodnih nauka, Cetinje, 5, str. 87-115, 1986.
- Lazarević M.:** Ispitivanje imunomodulatornih svojstava semene plazme bika u *in vitro* uslovima, Doktorska disertacija, Fakultet Veter. Medicine, Beograd, 1991.
- Matoušek J.:** Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals, Anim. Reprod. Sci., 8, p. 1-40, 1985.
- Kibrick S., Belding D. L. and Merrill, B.:** Methods for detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test, Fertil. Steril., 3: 430, 1952.
- Noel R. R., Hjort T. H., Rumke P. et al.:** Techniques for detection of iso- and auto- antibodies to human spermatozoa, Clin. Exp. Immunol., 23: 175-199, 1974.
- Hunter A. G.:** Immunology and fertility in the bovine, J. Dairy Sci., 72, p. 3353-3362, 1989.
- Griffin J. F. T., Hartigan, P. J. and Nunn, W. R.:** Antibodies to egg-yolk semen diluent and bovine infertility: A preliminary report, Veterinary record, vol. 1, No. 2, p. 481-482, 1973.

- Vukotić M., Pavlović M., Stojić V., Vučko M., Petrovi, S., Kuzmanov D. i Predojević M.:** Neki imunološki aspekti veštačkog osemenjavanja krava koji otvaraju mogućnost njegovog unapređenja, Zbornik referata i saopštenja, Smotra dostignuća u stočarstvu i veterini, Novi Sad, str. 290, 1982.
- Hansen K. B.:** Immunofluorescent studies on mammalian spermatozoa: Antigenic relationship between human, bull and rabbit spermatozoa, J. Reprod. Fertil., 29, 19-28, 1972.
- Omran K. F. and Hulka J. F.:** Infertility associated with induced local antibody secretion against sperm in the bovine uterine cervix, Int. J. Reprod. Fertil., 16, p. 195-199, 1971.
- Coulter G. H., Foot, R. H., Sehiavo J. J. and Brava R. K.:** Antibodies to egg-yolk in blood serum of rabbits and cattle and cervical mucus inseminated artificialy, Theriogenology, Vol. 6, No. 5, p. 585-587, 1976.
- Foulkes J. A., Stewart D. L. and Gooday R. G.:** Lactose based diluents in cattle AI, The Veterinary Record, Oct. 15, p. 171, 1977.
- Park Y. W. and Hunter A. G.:** Effect of repeated insemination with egg-yolk semen extender on fertility in cattle, J. Dairy Sci., 60, p. 1645-1649, 1977.
- O'Connor, M. L. and Saacke, R. G.:** Effect of anti-egg-yolk diluent sera upon bovine spermatozoa in egg-yolk diluent, J. Animal Sci., Vol. 47, No. 3, p. 660-665, 1978.
- Farahani J. K., Tompkins W. and Wagner W. C. :** Reproductive status of cows and incidence of antisperm antibodies, Theriogenology, Vol. 15, No. 3, p. 605-612. 1981.
-