

UDK: 619 : 591.391 : 575  
Originalni naučni rad

## PRIMENA INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCE U ODREĐIVANJU ANTIGENSKIH KARAKTERISTIKA SPERMATOZOIDA BIKA

*M. Lazarević, Svetlana Rodić, Jelena Ostojić, G. Jakovljević i M. Jovičin \**

*Izvod:* U ovom radu su izneti rezultati ispitivanja varijacija u titru antitela protiv spermatozoida bika i razređivača za spermu bikova u serumu kunića imunizovanih TRIS žumanjčanim razređivačem, razređivačem Biociphos plus (IMV, France) i sadržajem pajeta za VO krava pripremljenim pomoću njih. Ispitivanja su vršena metodom indirektno imuno-fluorescence a ukupno je testirano 12 bikova crno-bele šarene rase. Postignuti rezultati ukazuju da oba razređivača dovode do nastanka antitela kod kunića a da je titar antitela na antigene spermatozoida značajno viši kada se za izvođenje testa koriste spermatozoidi iz pajeta za VO.

*Ključne reči:* bik, spermatozoidi, antitela, razređivač, neplodnost.

### Uvod

Dugogodišnja iskustva u primeni veštačkog osemenjavanja krava u velikom broju zemalja, uključujući i našu, ukazuju da su postignuti rezultati još uvek ispod očekivanih vrednosti. Bez obzira na činjenicu da se uslovi držanja, ishrane i nege konstantno unapređuju, reproduktivni rezultati mlečnih krava ne ispunjavaju zahtevne uzgajivača. Šta više, smetnje u reprodukciji su često razlog isključivanja grla iz proizvodnje i mali broj jedinki ostaje na farmi više od 4 do 5 laktacija. Ova činjenica bez sumnje ima ekonomski nepovoljan efekat na celokupnu proizvodnju i već dugo je pažnja stručnjaka usmerena na prevazilaženje problema u reprodukciji mlečnih krava. Posebno mesto u patologiji reprodukcije ima bezsimptomski sterilitet ili pravilnije rečeno subfertilitet koji se najčešće manifestuje kroz nemogućnost oplodnje ili rane pobačaje bez drugih simptoma i kod nas se obično naziva povadañje. Zanimljivo je i istovremeno veoma značajno da jedinke koje povadañju nisu sterilne

---

\* Dr Miodrag Lazarević, vanredni profesor, dr vet. med. Rodić Svetlana, dr vet. med. Ostojić Jelena, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, dr vet. med. Goran Jakovljević, PKB - Agroekonomik - INI, Padinska Skela, dr Milovan Jovičin, viši naučni saradnik, NIV Novi Sad.

i da se u uslovima prirodnog pripusta njihova plodnost vidno poboljšava (Vukotić, 1986).

Postoji veći broj dokaza da u nastanku bezsimptomskog steriliteta u uslovima VO važnu ulogu imaju imunološki faktori. Poznato je da pri uslovima prirodnog parenja imunološki sistem ženki ne stvara antitela na antigene spermatozoida ili bar ne u toj meri da nastanu reproduktivne smetnje (Shulman S. 1975). Još ranije je dokazano da se neplodnost ženki sisara može indukovati veštačkom imunizacijom spermatozoidima ili homogenatom testisa (Menge, 1967). Međutim, pri VO krava izmenjeni su prirodni uslovi karakteristični za reproduktivne procese. Pre svega zapremina semene plazme koja ima izražena imunosupresivna dejstva (i ne dozvoljava senzibilizaciju ženki antigenima sperme) je smanjena nekoliko desetina puta zbog male zapremine pajeta i dodavanja razređivača. Osim toga u sastavu razređivača se nalaze novi antigeni na koje takođe može nastati imunološki odgovor (O'Connor i Saacke, 1978). Rezultati ispitivanja u ovoj oblasti imunologije reprodukcije su u izvesnoj meri kontradiktorni zbog različite metodologije i malog broja životinja uključenih u ispitivanja.

U ovom radu mi smo želeli da ispitamo individualnu varijabilnost titra antitela protiv antigena spermatozoida različitih bikova i razređivača za spermu bika metodom indirektno imunofluorescence (IIF). Drugim rečima, želeli smo da utvrdimo stepen reaktivnosti antiseruma dobijenih imunizacijom kunića prema spermatozoidima pojedinih bikova. U tu svrhu je izvršena imunizacija (po dva) kunića sa dva različita razređivača (TRIS žumanjčani razređivač i razređivač Biciphos plus - IMV, France), sadržajem pajeta za VO pripremljenim u TRIS žumanjčanom razređivaču i sadržajem pajeta za VO pripremljenim u razređivaču Biociphos plus. Dobijene antiserume smo zatim testirali na prisustvo antitela (metodom IIF) prema antigenima spermatozoida 12 bikova prethodno suspendovanim u jednom ili drugom razređivaču kao i prema nativnim spermatozoidima istih bikova. Posebna pažnja je posvećena razređivačima za seme bikova zbog toga što je poznato da se pojedine komponente iz njihovog sastava tako čvrsto vezuju za membranu spermatozoida da se praktično ne mogu kasnije odvojiti (Cookson i sar. 1984). Osim toga poznato je da antitela protiv antigena razređivača dovode do smanjenog fertiliteta kod eksperimentalnih životinja i kod goveda (Hunter i Alsum, 1969, Swanson i Hunter 1969, Griffin i sar. 1974, Coulter i sar. 1976).

## **Materijal i metode**

### *Priprema antiseruma*

Za dobijanje antiseruma koji su korišćeni u ovim ispitivanjima izvršena je imunizacija osam kunića činčila rase, u uzrastu od 6 meseci i težine od 1,5-2 kg. Imunizacija kunića je vršena subkutanom aplikacijom pripremljenog materijala u pravilnim vremenskim intervalima od po 7 dana tokom 4 nedelje. Za prve dve imunizacije materijal (sadržaj pajeta ili sam razređivač) je bio pripremljen sa kompletnim Freundovim adjuvansom a za treću i četvrtu imunizaciju je upotrebljavan nekompletni adjuvans. Serumi kunića dobijeni pre imunizacije su korišćeni

kao negativni kontrolni serumi. Po isteku perioda od 6 nedelja kunići su žrtvovani i izdvojeni su pojedinačni serumi. Od njih su napravljani zbirni uzorci spajanjem istih količina antiseruma dobijenih od po dva kunića imunizovana istim antigenom. Ovako dobijeni antiserumi su inaktivisani u vodenom kupatilu na temperaturi od 56°C tokom 20 minuta. Antiserumi su do upotrebe čuvani na temperaturi od -18°C.

Dokazivanje prisustva antitela protiv antigena spermatozoida bika i razređivača za spermu bika vršeno je metodom indirektno imunofluorescencije (Noel i sar., 1974). U ogled je bilo uključeno 12 bikova crno bele šarene rase ali je tokom rada ovaj broj zbog eliminacije nekih priplodnjaka bio smanjen na 10. Za utvrđivanje antigenskih karakteristika spermatozoida korišćeni su ejakulati istih bikova pripremljeni za VO upotrebom dva različita razređivača kao i spermatozoidi iz nativnih ejakulata istih životinja (split metoda).

#### *Test indirektno imunofluorescence (IIF)*

Za pripremu razmaza spermatozoida korišćen je sadržaj 3 pajete poreklom od istog bika. Otopljeni sadržaj pajeta je prebacivan u epruvete od 12 ml u koje je dodavano po 10 ml pufera zagrejanog na 37°C (PBS, pH 7,2). Sadržaj epruveta je zatim centrifugiran na 1.800 obrtaja tokom 10 minuta. Posle odlivanja supernatanta talog je resuspendovan u istom puferu i ceo postupak je ponavljan još jednom. Sa nativnim ejakulatima, dobijenim pomoću veštačke vagine, sproveden je isti postupak pri čemu je od svakog ejakulata korišćeno po 0,5 ml. Posle drugog ispiranja talog je resuspendovan u 0,5 ml PBS-a i pravljeni su razmazi na obezmašćenim mikroskopskim pločicama. Obezmašćivanje je vršeno u trajanju od 24 sata, potapanjem u hrom sumpornu kiselinu. Pločice su ispirane u destilovanoj vodi i sušene na 120°C a zatim hladene na sobnoj temperaturi.

Na osušene razmaze spermatozoida stavljan je zatim 50  $\mu$ l seruma kunića odgovarajućeg razblaženja (od 1:4 do 1:528) u PBS-u, a pločice su inkubirane u termostatu na 37°C tokom 20 minuta u vlažnoj sredini. Po završenoj inkubaciji, pločice su ispirane u PBS puferu 3 puta u trajanju od po 5 minuta a zatim osušene na sobnoj temperaturi tokom 15-20 minuta. Na obeleženo mesto, gde je prethodno bio stavljen serum kunića, postavljano je zatim 50  $\mu$ l antiseruma na ukupne Ig G kunića obeleženog fluoresceinom (SIGMA F 0382) razblaženog PBS-om u odnosu 1:50 i pločice su inkubirane na 37°C tokom 20 minuta u vlažnoj sredini. Zatim je vršeno ponovno ispiranje pločica na isti način (u PBS puferu 3 puta u trajanju od po 5 minuta) a do čitanja rezultata pločice su držane na vlažnom i tamnom mestu. U svakoj seriji ispitivanja kao negativni kontrolni serumi korišćeni su serumi kunića dobijeni pre postupka imunizacije. Mikroskopiranje je vršeno na fluorescentnom mikroskopu NIKON EFD  $\square$ 3, uz upotrebu filtera B-2A, pod uvećanjem od 1.600x a pojava fluoresence na glavi, vratu ili repu spermatozoida je predstavljala pozitivan nalaz. Vrednosti za titar antitela izražavane su po Sjurinu kao  $\log_2 n$  (1:4=2; 1:8=3; 1:16=4 i td.).

Statistička analiza podataka je izvršena izračunavanjem srednjih vrednosti, i standardnih devijacija a ocena značajnosti dobijenih razlika Studentovim t testom.

## Rezultati i diskusija

U tabeli 1 su izneti rezultati određivanja vrednosti titra antitela u serumu imunizovanih kunića kada su za test IIF korišćeni spermatozoidi bikova iz pajeta za VO pripremljenih u TRIS - žumanjčanom razređivaču.

**Tab. 1.** Titar antitela u serumu imunizovanih kunića protiv antigena spermatozoida bika suspendovanih u TRIS žumanjčanom razređivaču

PAJETA BIK / SERUM	TRIS + S			
	anti T	anti B	anti T + S	anti B + S
1	-	-	-	5
2	4	0	5	5
3	2	0	5	5
4	-	-	-	5
5	2	0	6	2
6	4	0	9	5
7	4	0	6	2
8	2	0	5	5
9	2	0	5	4
10	4	0	6	4
11	2	0	5	4
12	2	0	6	2
X ± SD	2.8 ± 1.03	0	5.80 ± 1.23	4.25 ± 1.28

anti T - serum kunića imunizovanih TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B - serum kunića imunizovanih razređivačem Biociphos plus

anti T + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajete sa TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajete sa razređivačem Biociphos plus

Iz podataka iznetih u tabeli 1. može da se zaključi da samo serumi kunića imunizovanih razređivačem Biociphos plus nisu pokazivali pozitivnu reakciju u testu IIF kada se za njegovo izvođenje koriste spermatozoidi suspendovani u TRIS - žumanjčanom razređivaču. Najveći titar dobijen je upotrebom seruma kunića imunizovanih sadržajem pajete za VO sa TRIS žumanjčanim razređivačem kao što se i moglo očekivati.

Rezultati ispitivanja titra antitela u serumu imunizovanih kunića kada su za test IIF korišćeni spermatozoidi bikova iz pajeta za VO pripremljenih u razređivaču Biociphos plus prikazani su u tabeli 2.

**Tab. 2.** Titar antitela u serumu imunizovanih kunića protiv antigena spermatozoida bika suspendovanih u razređivaču Biociphos plus

PAJETA BIK / SERUM	Biociphos + S			
	anti T	anti B	anti T + S	anti B + S
1	-	6	-	-
2	0	4	5	6
3	0	7	4	8
4	-	6	-	-
5	0	2	4	6
6	0	6	8	9
7	0	2	6	6
8	0	7	8	7
9	0	2	6	8
10	0	6	5	8
11	0	4	6	8
12	0	6	6	8
X ± SD	0	4.83 ± 1.94	5.80 ± 1.39	7.40 ± 1.07

anti T - serum kunića imunizovanih TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B - serum kunića imunizovanih razređivačem Biociphos plus

anti T + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajeta sa TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajeta sa razređivačem Biociphos plus

Kada su za izvođenje testa IIF korišćeni spermatozoidi bikova prethodno suspendovani u razređivaču Biociphos plus oni su najveći stepen reaktivnosti pokazivali sa serumom kunića imunizovanih sadržajem pajeta pripremljenih sa istim razređivačem. Niže vrednosti titra su dobijene sa serumima kunića imunizovanih sadržajem pajeta pripremljenim u TRIS žumanjčanom razređivaču a najniže sa serumom kunića imunizovanih samim razređivačem. Serum kunića imunizovanih samo TRIS žumanjčanim razređivačem nije reagovao sa spermatozoidima bika suspendovanim u razređivaču Biociphos plus.

Vrednosti titra antitela u serumu imunizovanih kunića kada su za test IIF korišćeni nativni spermatozoidi istih bikova prikazani su u tabeli 3.

**Tab. 3.** Titar antitela u serumu imunizovanih kunića protiv antigena nativnih spermatozoida bika

BIK / SERUM	Nativni spermatozoidi			
	anti T	anti B	anti T + S	anti B + S
1	-	-	-	-
2	0	0	7	6
3	0	0	5	6
4	0	0	7	6
5	0	0	5	6
6	0	0	7	6
7	0	0	6	6
8	0	0	5	6
9	0	0	7	6
10	0	0	5	6
11	0	0	6	6
12	-	-	-	-
X ± SD	0	0	6.00 ± 0.93	6.00 ± 00

anti T - serum kunića imunizovanih TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B - serum kunića imunizovanih razređivačem Biociphos plus

anti T + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajete sa TRIS žumanjčanim razređivačem

anti B + S - serum kunića imunizovanih sadržajem pajete sa razređivačem Biociphos plus

Kao što se može zaključiti iz podataka iznetih u tabeli 3. serumi kunića imunizovanih samo razređivačima (anti T i anti B) ne reaguju sa nativnim spermatozoidima bika. Serumi kunića imunizovanih sadržajem pajeta pokazuju isti stepen reaktivnosti prema nativnim spermatozoidima bez obzira na korišćeni razređivač.

Analiza statističke značajnosti utvrđenih razlika u titru antitela prema antigenima spermatozoida bika i razređivača ukazala je da ako se za izvođenje testa IIF koriste antiserumi kunića dobijeni imunizacijom sadržajem pajete za VO pripremljene u TRIS žumanjčanom razređivaču (anti T + S) nema statistički značajnih razlika u titru bez obzira koji se spermatozoidi koriste u testu ( $p > 0,05$ ). Srednje vrednosti titra iznose: za spermatozoide u TRIS žumanjčanom razređivaču  $5,8 \pm 1,23$ , za spermatozoide u Biociphos plus razređivaču  $5,8 \pm 1,39$  i za nativne spermatozoide  $6,0 \pm 0,93$ . Međutim, ako se u istom testu koristi antiserum dobijen imunizacijom kunića sadržajem pajete pripremljene u Biociphos plus razređivaču (anti B + S) postoje statistički značajne razlike u titru u zavisnosti od korišćenih spermatozoida. Ove srednje vrednosti iznose: za spermatozoide u TRIS žumanjčanom razređivaču  $4,00 \pm 1,28$ , za spermatozoide u Biociphos plus razređivaču  $7,4 \pm 1,07$  i za nativne spermatozoide  $6,0 \pm 0,00$ .

Zanimljivi rezultati se dobijaju ako se saberu vrednosti titra antitela na antigene spermatozoida bika, razređivača i njihove mešovane za pojedine bikove. Kao što se vidi u tabeli 4 samo dva bika pokazuju odstupanja u ovom smislu dok

se kod svih ostalih zbir kreće oko vrednosti 40. Bik br. 5 ima najniži ukupni titar (33), a bik 6 najviši (54) tako da se ne može govoriti o izraženim individualnim antigenskim razlikama.

**Tab. 4.** Ukupni titar antitela u serumu imunizovanih kunića prema spermatozoidima pojedinih bikova

BIK	UKUPNI TITAR
1	Nepotpuni podaci
2	42
3	43
4	Nepotpuni podaci
5	33
6	54
7	38
8	45
9	40
10	44
11	41
12	Nepotpuni podaci

Postignuti rezultati jasno dokazuju da se primenom metode IIF mogu utvrditi antigenske razlike između spermatozoida istih bikova pripremljenih za VO upotrebom različitih razređivača i ova metoda može da bude od velike koristi u daljem ispitivanju imunološkog subfertiliteta junica i krava. Ovim ispitivanjima potvrdili smo naše nalaze dobijene primenom metode aglutinacije u želatinu (Jačević i sar., 1997, 1999). Na osnovu ranijih analiza koje su pokazale da se titar spermaglutinina u serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava povećava sa brojem veštačkih osemenjavanja (Lazarević i sar., 1996) smatramo da dalja proučavanja prisustva i specifičnosti antitela protiv spermatozoida bika i razređivača koji se trenutno primenjuju imaju puno stručno i naučno opravdanje.

### Zaključak

Imunizacija kunića TRIS žumanjčanim razređivačem i razređivačem Biociphos plus kao i sadržajem pajeta za VO pripremljenim pomoću njih dovodi do nastanka antitela kod kunića. Titar antitela na antigene spermatozoida i razređivača za seme bika je značajno viši kada se za izvođenje testa indirektno imunofluorescence koriste spermatozoidi iz pajeta za VO i antiserumi dobijeni imunizacijom sadržajem istih pajeta.

## Literatura

1. Coulter, G. H., Foote, R. H., Sehaiavo, 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, N° 5, 585-587, 1976.
2. Cookson, A. D., Thomas, A. N. and Foulkes, J. A.: Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa, *Journal Fert. Reprod.*, 70, 599-604, 1984.
3. Griffin, J. F. T., Hartigan, P. J., McGilligan, C. A. and Nunn, W. R.: Antibodies to semen diluent and infertility in rabbits, *Theriogenology*, Vol. 1, N° 2, 55-61, 1974.
4. Hunter, A. G. and Alsum, D. J.: Immunological suppression of fertility in rabbits inseminated with egg-yolk citrate extender, *J. Dairy Sci.*, vol, 52, N° 6, 922, 1969.
5. Jačević Vesna, G. Jakovljević i M. Lazarević: Antitela protiv spermatozoida bika - individualna varijabilnost, 10. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor, 1997., Zbornik radova, str. 445-450.
6. Vesna Jačević, M. Lazarević, G. Jakovljević i L. Subotin: Uticaj razređivača za spermu bika na antigenske karakteristike spermatozoida, Zbornik naučnih radova XIII savetovanja agronoma, veterinarara i tehnologa, Vol. 5, N° 1, str. 431-441, Aranđelovac, 1999.
7. Lazarević M., Vesna Jačević, M. Žderić i G. Jakovljević: Spermaglutinini u krvnom serumu i cerviko-vaginalnoj sluzi junica i krava, 9. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor, 1996., Zbornik kratkih sadržaja radova, str. 59-61.
8. Menge A. C.: Induced infertility in cattle by iso-immunization with semen and testis, *J. Reprod. Fertil.* 13, 445-456, 1967.
9. 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.
10. 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, N° 3, 660-665, 1978.
11. Shulman, S.: *Reproduction and antibody response*, CRC-Press, 1975.
12. Sjurin, N., Belorusova, V. R., Fomina, V. M.: *Veterinarnaja virusologija*, Kolos, Moskva, 1984.
13. Swanson, L. V. and Hunter, A. G.: Egg-yolk antigens and their effects on fertility in rabbits, *Biol. Reproduction*, I, 324-329, 1969.
14. Vukotić, M.: Današnje shvatanje uloge semene plazme bika s pogledom na v.o. krava kao i njegov odnos prema prirodnom parenju, *Crnogorska akademija nauka i umetnosti, Glasnik odeljenja prirodnih nauka, Cetinje*, 5, 87-115, 1986.



UDC: 619 : 591.391 : 575  
Original scientific paper

## INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE IN EVALUATION OF BULLS SPERM ANTIGENIC CHARACTERISTICS

*M. Lazarević, Svetlana Rodić, Jelena Ostojić, G. Jakovljević and M. Jovičin\**

### Summary

Our investigations were conducted in order to evaluate variations in anti-sperm antibodies in rabbits sera. Rabbits were previously immunized with TRIS - egg yolk extender, Biociphos plus extender (IMV, France) and with content of insemination straws prepared with same extenders. We investigated sperm cells from ejaculates of 12 black and white spotted bulls by indirect immunofluorescence method. Both extenders and content of insemination straws were capable in raising antibody production. Titer of antibodies had the highest values when sperm cells from insemination straws were used for the test.

*Key words:* bull, sperm cells, antibody, extender, infertility.

---

\* Prof. dr Miodrag Lazarević, Svetlana Rodić, dr vet. med., Jelena Ostojić, dr vet. med., Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Yugoslavia; Goran Jakovljević, dr vet. med., Institute "PKB INI - Agro-economic", Padinska Skela - Beograd, Yugoslavia; dr Milovan Jovičin, NIV Novi Sad, Yugoslavia.