

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN-POLONIA

Vol. LII, 22

SECTIO DD

1997

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie

MAREK SZCZUBIAŁ

*Badania nad sposobami przywracania zdolności rozrodczych krowom
i jałówkom z zaburzeniami płodności o podłożu immunologicznym.
Część II. Skuteczność inseminacji domacicznej wielokrotnie nieskutecznie
inseminowanych doszyjkowo krów z immunologicznymi
przyczynami niepłodności*

Studies on the ways of reproduction ability restoration in cows with fertility
disturbances of the immunological nature. II. Efficacy of intrauterine
insemination in cows with infertility caused by immunological factors

Warunkiem opłacalności zarówno hodowli, jak i chowu bydła mlecznego jest prawidłowo przebiegający proces rozrodu. Przyjmuje się, że cykl rozrodczy przebiega optymalnie, jeśli krowa wyciela się raz w roku, a okres międzyciążowy zamyka się w 85-90 dniach (4, 8). Przy prowadzeniu w stadzie sztucznej inseminacji po pierwszym zabiegu powinno zacielać się 55-60% krów (4, 10). Brak skutecznego krycia lub inseminacji powoduje straty, wynikające z obniżenia laktacji i liczby uzyskanych cieląt, kosztów leczenia i wielokrotnego nieskutecznego zabiegu unasieniania. Zaburzenia płodności stanowią również jeden z głównych powodów zbyt wczesnego wybrakowywania krów (13, 22). Jedną z przyczyn zaburzeń płodności u krów są czynniki immunologiczne. Składniki nasienia, jako antygenowo obce dla samicy, mogą wzbudzać w jej organizmie produkcję przeciwciał, utrudniających bądź uniemożliwiających zapłodnienie (5, 6, 23, 25, 28, 37, 44). Żeby temu zapobiec istnieje wiele czynników zarówno ze strony samicy, jak i samca, które hamują wzbudzanie odpowiedzi immunologicznej. Ma t o u s e k i wsp. (35) wykazali immunosupresyjne działanie śluzu szyjkowego. S e g e r s o n i wsp. (47) znaleźli w wydzielinie macicznej krów proteiny, które hamowały transformacje blastyczną limfocytów. K a t s h i wsp. (29) uważają, że płodne krowy mają aktywne układy enzymatyczne, które mogą inaktywować antygeny nasienia buhaja. Z kolei F a h m i i wsp. (21) stwierdzili immunosupresyjne działanie płynu pęcherzyków jajnikowych krów.

Zostało również udowodnione, że w dodatkowych gruczołach płciowych samców produkowany jest silny inhibitor odpowiedzi immunologicznej, który podczas ejakulacji wydzielany jest do plazmy nasienia (3, 19, 20, 32, 38, 51). Upośledzenie syntezy tych immunosupresyjnych czynników zarówno ze strony samicy, jak i samca może być przyczyną produkcji przeciwciał przeciwko antygenom nasienia i wystąpienia zaburzeń płodności o podłożu immunologicznym (43). Inne przyczyny

powstawania przeciwciał przeciwplemnikowych to: krycie lub inseminacja samicy przed zakończeniem inwolucji macicy po porodzie (9, 48), krycie lub inseminacja przy toczących się procesach zapalnych (9, 26, 28, 33, 40, 45) lub krwawieniach w drogach rodnych samicy (53). Również wielokrotne nieskuteczne krycie lub inseminacja w kolejnych rujach może nasilić produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom plemników (16, 17, 27, 36, 40, 41, 48, 50, 57).

Ze względu na uwarunkowania, przy jakich dochodzi do wzrostu miana spermaglutynin w surowicy krwi i śluzie szyjkowym krów, należy przyjąć, że w większości przypadków są one wtórną przyczyną ich jałowienia. Przy braku kolejnych stymulacji antygenami nasienia wysoki poziom przeciwciał przeciwplemnikowych utrzymuje się w surowicy krwi i śluzie szyjkowym przez okres 2-12 miesięcy (18, 46, 49, 55). Uniemożliwia to zapłodnienie przez tak długi okres, nawet po usunięciu pierwotnej przyczyny niepłodności. Najczęściej takie krowy są eliminowane z hodowli.

Celem tej części badań było określenie skuteczności inseminacji domacicznej wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych doszyjkowo krów z wysokim poziomem przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy krwi i śluzie szyjkowym.

MATERIAŁ I METODY

BADANIA WSTĘPNE

Badania wstępne miały wykazać istnienie ewentualnej różnicy między poziomem przeciwciał przeciwplemnikowych w śluzie szyjkowym i wydzielinie macicznej krów nie zachodzących w ciążę z przyczyn immunologicznych. Badania wykonano na 8 krowach wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych doszyjkowo (5 i więcej razy) oraz 5 dziewiczych jałówkach (grupa kontrolna). Krowy wielokrotnie nieskutecznie inseminowane były rasy cb, w wieku 5-9 lat. Na podstawie wywiadu, badania klinicznego (obejmującego badanie *per rectum* i *per vaginam* narządu rodного) oraz badania surowicy krwi i śluzu szyjkowego na obecność spermaglutynin wykluczono u nich inne przyczyny niemożności zajścia w ciążę poza immunologicznymi.

Wszystkie krowy miały w surowicy krwi wysokie ($\geq 1:128$) miano spermaglutynin przeciwko plemnikom buhajów rasy cb, simental i hf. Dziewicze jałówki były rasy cb, w wieku 12-14 miesięcy, z regularnym cyklem rujowym. U zwierząt tych nie stwierdzono klinicznie uchwytanych zmian patologicznych w narządzie rodным. Badane zwierzęta – po wywołaniu rui zsynchronizowanej przez dwukrotne podanie Oestrophanu w odstępie 11 dni – poddano ubojowi doświadczalnemu. Po rozcięciu wydobytych narządów rozrodczych pobierano do oddzielnych probówek śluz szyjkowy oraz wydzielinę rogu macicy. Określano zdolność penetracji plemników w śluzie szyjkowym oraz w wydzielinie macicznej stosując test penetracji plemników opracowany przez A l e x a n d e r (2). Do badań użyto mrożonego nasienia buhajów rasy cb, simental i hf (po 3 buhaje danej rasy).

BADANIA EKSPERYMENTALNE

Badania przeprowadzono na grupie 6 dziewiczych jałówek rasy cb, klinicznie zdrowych, w wieku 12-14 miesięcy z regularnym cyklem rujowym. Jałówki poddano sześciokrotnej immunizacji mrożonym nasieniem buhaja rasy cb. Zwierzętom podczas rui zsynchronizowanej wprowadzono do szyjki macicznej nasienie buhaja pozbawione możliwości zapłodnienia poprzez rozpuszczenie jednej kulki mrożonego nasienia w 1 ml wody destylowanej podgrzanej w łaźni do temp. 39°C. Nasienie wprowadzano do szyjki za pomocą pipet inseminacyjnych zgodnie z techniką stosowaną przy zabiegu inseminacji (7). Ruje, w czasie której wykonano pierwszą immunizację, zsynchronizowano podając jałówkom dwukrotnie w odstępie 11 dni Oestrophan. Po 72 godz. od drugiego podania jałówek immunizowano. Kolejne immunizacje wykonywano według następującego schematu: po upływie

11 dni od poprzedniego zabiegu immunizacyjnego wszystkim jałówkom podawano Oestrophon, a 72 godz. później immunizowano.

Przed każdym zabiegiem pobierano krew z żyły szyjnej zewnętrznej i śluz szyjkowy. Z surowicą krwi wykonywano test mikroaglutynacji według Deo i Roy (14), natomiast ze śluzem szyjkowym przeprowadzano test penetracji plemników według Alexander (2). Gdy miano spermaglutynin w surowicy krwi osiągnęło u wszystkich sztuk wartość 1:512–1:1024 (po sześciu zabiegach immunizacyjnych), jałówki inseminowano doszyjkowo tym samym nasieniem, które wykorzystywane było do immunizacji. Po upływie 10 tygodni wykonywano badanie *per rectum* w celu ustalenia ciąży. Po wykluczeniu ciąży synchronizowano u tych jałówek ruję i inseminowano je domacicznie tym samym nasieniem, którego używano do nieskutecznej inseminacji doszyjkowej. Skuteczność inseminacji domacicznej sprawdzano badaniem *per rectum* po upływie 10 tygodni. Przed zabiegiem inseminacji domacicznej z surowicą krwi jałówek wykonywano test mikroaglutynacji, a ze śluzem szyjkowym – test penetracji plemników, celem ustalenia utrzymywania się wysokiego poziomu spermaglutynin.

BADANIA KLINICZNE

Badania przeprowadzono na 30 krowach wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych doszyjkowo, rasy cb, w wieku 3-9 lat, o regularnym cyklu rujowym i ustalonej długości rui. Badaniem klinicznym obejmującym badanie *per rectum* i *per vaginam* narządu rodowego oraz badaniem surowicy krwi i śluzu szyjkowego na obecność spermaglutynin wykluczono u nich inne przyczyny niemożności zajścia w ciążę poza immunologicznymi. Wszystkie krowy miały w surowicy spermaglutyniny przeciwko plemnikom buhajów rasy cb, simental i hf w mianach $\geq 1:64$. Krowom podano domacicznie po ok. 100 ml płynu Lugola. Miało to na celu wyeliminowanie ewentualnych przewlekłych stanów zapalnych błony śluzowej macicy niewielkiego stopnia (E₁-E₂), których nie udało się zdiagnozować badaniem klinicznym.

Krowy inseminowano najpierw doszyjkowo mrożonym nasieniem buhajów, przeciwko którym plemnikom miały w surowicy krwi wysokie miano ($\geq 1:128$) spermaglutynin. Po 10 tygodniach wykonywano badanie *per rectum* w celu wykrycia krów cielných. Krowy niecielné w czasie pierwszej rui po badaniu inseminowano domacicznie tym samym nasieniem, które było użyte do nieskutecznej inseminacji doszyjkowej. Efektywność inseminacji domacicznej oceniano za pomocą badania *per rectum* po upływie 10 tygodni.

Nasienie buhajów używane w badaniach poddane było laboratoryjnej ocenie jakości, obejmującej: mikroskopowe badanie na stoliku Blooma, ocenę koncentracji, ocenę odsetka plemników martwych oraz ocenę przeżywalności w temp. 46,5°C. Badania laboratoryjne wykazały, że używane nasienie odpowiadało obowiązującym normom (7).

WYNIKI

WYNIKI BADAŃ WSTĘPNYCH

Plemniki buhajów zdecydowanie wolniej przemieszczały się w śluzie szyjkowym krów wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych niż w ich wydzielinie macicznej (tab. 1). Średnia długość drogi przebytej w ciągu 1 godz. przez plemniki buhajów rasy cb w śluzie szyjkowym wyniosła 7,4 mm w porównaniu do 28,8 mm w wydzielinie macicznej. Plemniki buhajów rasy simental penetrowały śluz szyjkowy na głębokość 9,9 mm, natomiast wydzielinę maciczną na głębokość 32,7 mm. W odniesieniu do plemników buhajów rasy hf wartości te wyniosły odpowiednio

11,3 mm i 34 mm. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między zdolnością penetracji przez plemniki śluzu szyjkowego i wydzieliny macicznej dziewiczych jałówek (tab. 1).

Tab. 1. Wyniki testu penetracji plemników w śluzie szyjkowym i wydzielinie macicznej wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych krów i dziewiczych jałówek (w mm)
Spermatozoa penetration test results in cervical mucus and uterine secretion of repeatedly infected-ly inseminated breeding cows and virgin heifers (in mm)

Grupa	Penetracja plemników ($\bar{x}$, $\pm S$)					
	a		b		c	
	Ś	W	Ś	W	Ś	W
Krowy wielokrotnie nieskutecznie inseminowane	7,4 $\pm$ 22,6 ^g	28,8 $\pm$ 8,7 ^{dg}	9,9 $\pm$ 6,8 ^g	32,7 $\pm$ 9,3 ^{eg}	11,3 $\pm$ 7,4 ^g	34,0 $\pm$ 8,4 ^{fg}
Dziewicze jałówki (grupa kontrolna)	44,4 $\pm$ 3,6	46,7 $\pm$ 4,3	50,8 $\pm$ 3,1	51,6 $\pm$ 3,1	45,4 $\pm$ 2,4	46,9 $\pm$ 3,5

Objaśnienia: a – nasienie buhajów rasy cb, b – nasienie buhajów rasy simental, c – nasienie buhajów rasy hf, Ś – śluz szyjkowy, W – wydzielina maciczna, d – różnica statystycznie istotna ($\alpha=0,05$) przy porównaniu aŚ z aW, e – różnica statystycznie istotna ($\alpha=0,05$) przy porównaniu bŚ z bW, f – różnica statystycznie istotna ($\alpha=0,05$) przy porównaniu cŚ z cW, g – różnica statystycznie istotna ($\alpha=0,05$) przy porównaniu z grupą kontrolną.

Explanations: a – semen of cb breed bull, b – semen of simental breed bull, c – semen of hf breed bull, Ś – cervical mucus, W – uterine secretion, d – statistically significant difference ($\alpha=0.05$) when aŚ compared with aW, e – statistically significant difference ($\alpha=0.05$) when bŚ compared with bW, f – statistically significant difference ($\alpha=0.05$) when cŚ compared with cW, g – statistically significant difference ($\alpha=0.05$) when compared with control.

WYNIKI BADAŃ EKSPERYMENTALNYCH

Miano spermaglutynin w surowicy krwi jałówek doświadczalnych wzrosło po 6 zabiegach immunizacyjnych od wartości 1:8–1:32 do 1:512–1:1024 (tab. 2). W czasie inseminacji doszyjkowej miano spermaglutynin w surowicy utrzymywało się na poziomie 1:512–1:1024 (tab. 2). Podczas inseminacji domacicznej posiadało również wysokie wartości 1:256–1:512 (tab. 2). Głębokość penetracji przez plemniki śluzu szyjkowego jałówek przed immunizacją wynosiła od 37 do 59 mm (tab. 3). Po immunizacji dostępność śluzu dla penetracji przez plemniki uległa ograniczeniu. W ciągu 1 godz. wnikały one w śluz na głębokość zaledwie od 3 do

Tab. 2. Wyniki testu mikroaglutynacji plemników buhaja z surowicą jałówek doświadczalnych
Spermatozoa agglutination test results of a bull with serum of experimental heifers

Numer jałówek	Wysokość miana spermaglutynin w surowicy krwi			
	przed immunizacją	po immunizacji	w czasie inseminacji doszyjkowej	w czasie inseminacji domacicznej
1	1:8	1:512	1:512	1:256
2	1:16	1:1024	1:1024	1:512
3	1:32	1:1024	1:1024	1:512
4	1:8	1:512	1:512	1:512
5	1:16	1:512	1:512	1:256
6	1:8	1:512	1:512	1:256

Tab. 3. Wyniki testu penetracji plemników w śluzie szyjkowym jałówek doświadczalnych
Spermatozoa penetration test results in cervical mucus of experimental heifers

Numer jałówek	Głębokość penetracji przez plemniki śluzu szyjkowego (w mm)			
	przed immunizacją	po immunizacji	w czasie inseminacji doszyjkowej	w czasie inseminacji domacicznej
1	39	12	12	14
2	37	3	6	8
3	40	7	9	9
4	59	21	21	20
5	50	14	14	15
6	44	19	19	16

Tab. 4. Wyniki inseminacji doszyjkowej oraz inseminacji domacicznej jałówek doświadczalnych
Results of intracervical and intrauterine insemination of experimental heifers

Numer jałówek	Wynik badania na ciążę	
	po inseminacji doszyjkowej	po inseminacji domacicznej
1	-	+
2	-	-
3	-	-
4	-	+
5	-	+
6	-	-

21 mm (tab. 3). Wyniki testu penetracji w czasie inseminacji doszyjkowej oraz inseminacji domacicznej utrzymywały się na podobnym poziomie. Inseminacja doszyjkowa jałówek z doświadczalnie wywołanym wysokim poziomem spermaglutynin w surowicy i śluzie szyjkowym nie doprowadziła do zapłodnienia żadnej z nich (tab. 4). Po inseminacji domacicznej w ciążę zaszły 3 jałówki, tj. 50% (tab. 4).

Inseminacja doszyjkowa krów mrożonym nasieniem buhaja, przeciwko którego plemnikom miały w surowicy wysokie miano ($\geq 1:128$) spermaglutynin okazała się w 100% nieskuteczna (tab. 5). Po inseminacji domacicznej tym samym nasieniem – 60% krów zaszło w ciążę (tab. 5).

Tab. 5. Wyniki inseminacji doszyjkowej oraz domacicznej krów nieplodnych z przyczyn immunologicznych

Results of intracervical and intrauterine insemination of cows with immunoinfertility

Liczba krów	Inseminacja doszyjkowa	Inseminacja domaciczna
	liczba i procent krów zacielenych	
30 (100,0)	0 (0,0)	18 (60,0)

OMÓWIENIE

Inseminacja domaciczna jest powszechnie stosowaną metodą w medycynie ludzkiej (1, 11, 12, 28, 30, 34, 42), pozwalającą na zapłodnienie kobiet nie mogących zająć w ciążę z powodu wysokiego poziomu przeciwciał przeciwko plemnikom męża w śluzie szyjkowym. Odsetek nieplodnych kobiet, które zachodziły w ciążę po inseminacji domacicznej nasieniem ich mężów, według różnych autorów waha się od 6,7% do 57,1% (1, 12, 28, 30, 42). Zasada tej metody opiera się na pominięciu szyjki macicznej na drodze plemników do komórki jajowej. Ta część układu rozrodczego samicy jest bowiem miejscem największej koncentracji przeciwciał, powstających w odpowiedzi na stymulację antygenami nasienia samca (26, 31, 39, 49). Wynika to zarówno z najlepszego – w porównaniu do innych odcinków dróg rodnych samicy – przygotowania do miejscowej produkcji przeciwciał (28, 52), jak i budowy anatomicznej (krótka, wąska), pozwalającej na zgromadzenie dużej ilości przeciwciał na małym odcinku. Wiązanie się przeciwciał z antygenami plemników opóźnia bądź wręcz uniemożliwia dotarcie ich do komórki jajowej (41, 54, 57). Potencjał immunologiczny jest natomiast stosunkowo niski (31, 52). Również transsudacja przeciwciał z układu krążenia zachodzi głównie na błonę śluzową szyjki macicznej (56), natomiast jest ograniczona w macicy (15, 31). Te uwarunkowania powodują, że poziom przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom nasienia w wydzielinie macicznej jest znacznie niższy niż w śluzie szyjkowym (24, 28, 31, 52).

Wyniki badań własnych wydają się w pełni potwierdzać doniesienia cytowanych autorów. Zdolność przemieszczania się plemników w wydzielinie macicy

była wyraźnie większa niż w śluzie szyjkowym u krów z zaburzeniami na tle immunologicznym. Długość drogi pokonywanej przez plemniki w ciągu 1 godz. w wydzielinie macicznej była ponad 3-krotnie większa niż w śluzie szyjkowym tych samych krów. Natomiast przy badaniu wydzieliny tych odcinków narządu rodowego dziewiczych jałówek różnice w wynikach testu penetracji nie były statystycznie istotne. Uzyskaną 60% skuteczność inseminacji domacicznej u wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych doszyjkowo krów można uznać za zadowalającą. Niski potencjał immunologiczny macicy stwarza jednak warunki do rozwoju infekcji po wprowadzeniu do niej patogennych drobnoustrojów. Przestrzeganie w sposób rygorystyczny warunków higieny i właściwej techniki zabiegu przy domacicznym wprowadzaniu nasienia buhaja jest podstawowym warunkiem skuteczności tej metody.

WNIOSKI

1. Śluz szyjkowy i wydzielina maciczna wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych krów z wysokim mianem spermaglutynin w surowicy są w różnym stopniu dostępne dla penetracji przez plemniki buhaja. W ciągu 1 godz. plemniki pokonywały 3-krotnie dłuższą drogę w wydzielinie macicznej niż w śluzie szyjkowym.

2. Inseminacja domaciczna krów z zaburzeniami płodności na tle immunologicznym jest prostą i skuteczną metodą postępowania umożliwiającą zacielenie. Skuteczność jej zależy jednak w dużym stopniu od przestrzegania właściwej higieny i techniki zabiegu inseminacyjnego.

PIŚMIENNICTWO

1. A g a r v a l A.: Treatment of immunological infertility by sperm washing and intrauterine insemination. Arch. Androl. **29**, 207, 1992.
2. A l e x a n d e r N. J.: Evaluation of male infertility with an *in vitro* cervical mucus penetration test. Fert. Steril. **36**, 201, 1981.
3. A n d e r s o n D. J., T a r t e r T. J.: Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components *in vivo* and *in vitro*. J. Immun. **128**, 535, 1982.
4. B a c h S., S t e m m l e r K. H.: Die bewachung und Analyse der Fruchtbarkeit voninderherden unter Verwendung vom Reproduktionsparameter. Mh. Vet.-Med. **40**, 398, 1985.
5. B a r k e r D. S., A m a n n R. P.: Epididymal physiology. I. Specificity of antisera against bull spermatozoa and reproductive fluids. J. Reprod. Fert. **22**, 441, 1970.
6. B e e r A. E., N e a v e s W. B.: Antigenic status of semen from the viewpoints of the female and male. Fert. Steril. **29**, 3, 1978.
7. B i e l a Ń s k i W.: Rozród zwierząt. PWRiL, Warszawa 1979.
8. B o y d H., M u n r o C. D.: Progesterone assays and rectal palpation in preservice management of dairy herd. Vet. Rec. **104**, 341, 1979.
9. B r a t a n o v K., D i k o v V., R a b i e v G., D a n o v D.: Studies on the immunology of reproduction. VII. The role of spermantibodies in the insemination of cows with incomplete uterine involution and cows with latent endometritis. Vet. Sci. Sofia, **2**, 323, 1965.

10. Bush W., Furstenberg L., Kubisch H. J.: Erfahrungen bei der Analyse von Fortpflanzungsstrungen des Rindes mit Hilfe von Reproduktionsparametern. *Mh. Vet.-Med.* **42**, 41, 1987.
11. Byrd W., Ackerman G.E., Carr B.R., Edman C.D., Guzik D.C., McConnel J.D.: Treatment of refractory by transcervical intrauterine insemination of washed spermatozoa. *Fert. Steril.* **48**, 921, 1987.
12. Byrd W., Bradshaw K., Carr B.R., Edman C., Odom J., Ackerman G.: A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. *Fert. Steril.* **53**, 521, 1990.
13. Coleman D.A., Thayne W.V., Dailey R.A.: Factors affecting reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **68**, 1793, 1985.
14. Deo S., Roy D. J.: Investigation on repeat breeding cows and buffaloes immunological agglutination of spermatozoa in the cervical mucus. *Indian Vet. J.* **48**, 572, 1971.
15. Edwards R. G.: Immunological control of fertility in female mice. *Nature*, **203**, 50, 1964.
16. Erski-Biljić M., Varadin M.: Significance of immunologic sterility in farm breeding of dairy cattle. *Am. J. Reprod. Immunol. Microb.* **7**, 72, 1985.
17. Erski-Biljić M., Varadin M., Borjanović S.: Antibodies against spermatozoa as possible cause of bovine infertility. *Proc. V Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna, 1982*, p. 309.
18. Evriev T., Bułanov I.: Immunochimicheskie isledovania geteromunnykh spermoagglutinov. *Immunology of reproduction. Proc. II nd Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna, 1971*, p. 255.
19. Fahmi H. A., Hunter A. G., Markham R. J. F., Seguin B. E.: Immunosuppressive activity of bovine seminal plasma on lymphocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **68**, 2315, 1985.
20. Fahmi H. A., Hunter A. G., Markham R. J. F., Seguin B. E.: Identification of an immunosuppressive protein in bovine seminal plasma with activity against bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci.* **68**, 2322, 1985.
21. Fahma H. A., Hunter A. G., Markham F. J. F., Seguin B. E.: Immunosuppressive activity of bovine follicular fluid on bovine T lymphocytes *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **68**, 3312, 1985.
22. Frey R., Berchtold M.: Analyse vorzeitiger Ausmerzungen. *Zuchthygiene* **18**, 203, 1983.
23. Glass R. H., Vaidya R. A.: Sperm-agglutinating antibodies in infertile women. *Fert. Steril.* **21**, 657, 1970.
24. Griffin J. F. T., Nunn W. R., Hartigan P. J.: An immune response to egg-yolk semen diluent in dairy cows. *J. Reprod. Fert.* **25**, 193, 1971.
25. Hunter A. G., Hafts H. D.: Antigenicity and cross-reactions of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* **7**, 357, 1964.
26. Ingerslev H. J., Ingerslev M.: Clinical findings in infertile women with circulating antibodies against spermatozoa. *Fert. Steril.* **33**, 514, 1980.
27. Jain S. K., Gupta R. C.: Sperm agglutinating antibody titres associated with conception failure in buffaloes (*Bubulus babalis*). 11th Int. Cong. Anim. Reprod. I.A., Univ. Coll. Dublin, Ireland, June 26-30, 1988, vol. 4, p. 534.
28. Jones W. R., Aust F.: Immunologic interfertility - fact or fiction? *Fert. Steril.* **33**, 577, 1980.
29. Katsh S., Aguirre A., Katsh G. F.: Inactivation of sperm antigens by sera and tissues of the female reproductive tract. *Fert. Steril.* **19**, 741, 1968.
30. Kobayashi S., Bessho T., Shigeta M., Koyama K., Isojima S.: Correlation between quantitative antibody titres of sperm immobilizing antibodies and pregnancy rates by treatments. *Fert. Steril.* **54**, 1107, 1990.
31. Lander M. F., Hansen P. I., Drost M.: Antisperm antibodies in cows after subcutaneous and intrauterine immuniation. *Vet. Rec.* **126**, 461, 1990.
32. Lord E. M., Sensabaugh G. F., Stites D. P.: Immunosuppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibition of *in vitro* lymphocyte activation. *J. Immun.* **118**, 1704, 1977.

33. Lukjanienko V. M.: Ob immunologiceskom sostojanii bezplodnykh korov. Veterinarija, Moskwa, **10**, 72, 1978.
34. Margalloth E. J., Sauter E., Bronson R. A., Rosenfeld D. L., Scholl G. M., Cooper G. W.: Intrauterine insemination as treatment for antisperm antibodies in the female. Fert. Steril. **50**, 441, 1988.
35. Matousek J., Stanek R., Hrubá A.: Immunosuppressive substance(s) in bovine cervical mucus. Acta Vet. **38**, 43, 1988.
36. Max A.: Próba określenia roli przeciwciał antyplemnikowych w niepłodności krów. Medycyna Wet. **45**, 555, 1989.
37. Menge A. C.: Immune reactions and infertility. J. Reprod. Fert. Suppl. **10**, 171, 1970.
38. Mukherjee D. S., Argaval A. K., Manjunath R., Mukherjee A. B.: Suppression of epididymal sperm antigenicity in the rabbit by uteroglobin and transglutaminase *in vitro*. Science **225**, 342, 1984.
39. Omeran K. F., Hulka J. F.: Infertility associated with induced local antibody secretion against sperm in the bovine uterine cervix. Int. J. Fert. **16**, 195, 1971.
40. Ostaszko F. J., Dibirov M. K.: Titr spermioantiteli v syvorotkie krovi korov v zavisimosti ot fizjologičieskovo sostojania organizma. Proc. 4th Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna 1978, p. 359.
41. Panchal M. T., Dholakia P. M., Derashri H. J., Kodagali S. B.: Investigation on immunoinfertility in repeat-breeding buffaloes. Indian J. Anim. Sci. **60**, 1211, 1990.
42. Patton P. E., Burry K. A., Thurmond A., Novy M. J., Wolf D. P.: Intrauterine insemination outperforms intracervical insemination in a randomized, controlled study with frozen donor semen. Fert. Steril. **57**, 559, 1992.
43. Prakash C.: [W:] Glicher N.: Reproductive Immunology, Alan R. Liss. Inc. N.Y., 1981.
44. Rao S. S., Sadri K. K.: The antigenic composition of buffalo semen. J. Comp. Path. **70**, 1, 1960.
45. Reyes M. P.: Evaluation of antibodies response against semen in infertile cows. Proc. 4th Symp. Immunol. Reprod. Varna 1978, p. 383.
46. Schwimmer W. B., Ustay K. A., Behrman S. J.: An evaluation of immunologic factors of infertility. Fert. Steril. **18**, 167, 1967.
47. Segerson E. C., Libby D. W., Getz W. R., Rondel R. D.: Immunosuppressive effect of uterine secretory protein from Angus and Brahman cows upon lymphocytes *in vitro*. J. Anim. Sci. **59**, 1047, 1984.
48. Strzeżek J., Bućko T., Jastak Z.: Wstępne obserwacje miana spermaglutynin w surowicach krwi krów i jałówek rasy ncb. Medycyna Wet. **29**, 236, 1973.
49. Sudo N., Shulman S., Stone M. L.: Antibodies to spermatozoa. IX. Spermagglutination phenomenon in cervical mucus *in vitro*: A possible cause of infertility. Am. J. Obstet. Gynecol. **129**, 360, 1977.
50. Szczubiał M., Krzyżanowski J.: Miano spermaglutynin w surowicy krwi krów wielokrotnie nieskutecznie inseminowanych. Medycyna Wet. **52**, 384, 1996.
51. Tarter T. H., Alexander N. J.: Are spermatozoa protected immunologically by seminal plasma. Am. J. Reprod. Immunol. **6**, 28, 1984.
52. Vaerman J. P., Ferin J.: Local immunological response in the vagina, cervix and endometrium. Acta Endocr. Kopenh. suppl. **194**, 281, 1975.
53. Vucotić M., Parlović M., Stojć V., Petrović S., Kuzmanov D., Predojević M.: Some evidence on immunological resistance of heifers to artificial insemination. Proc. V. Int. Symp. Immunol. Reprod. Varna, 1982, p. 125.
54. Wang Ch., Baker H. W. G., Jennigs H. G., Burger H. G., Lutjen P.: Interaction between human cervical mucus and sperm surface antibodies. Fert. Steril. **44**, 484, 1985.

55. Wrona Z.: Badania nad niepłodnością immunologiczną u krów. Część II. Czas utrzymywania się przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy krwi i śluzie szyjkowym po doświadczalnej immunizacji nasieniem buhaja. *Annales UMCS, Sectio DD*, **50**, 45, 1995.
56. Yang S. L., Schumacher F. F. B.: Immune response after vaginal application of antigens in the rhesus monkey. *Fert. Steril.* **32**, 588, 1979.
57. Zafracas A. M., Samouilidis S. C., Cricorion A. B., Kohler-Samouilidis G.: Ein einfacher Test zum Nachweis von Spermantikörpern in Genitalscheim. *Tierarztl. Umsch.* **42**, 973, 1987.

SUMMARY

The research carried out was to state the efficacy of intrauterine insemination of repeatedly ineffectively inseminated intracervically cows with a high level of antispermatozoal antibodies in the serum and cervical mucus. The examinations comprised 38 cows infertile due to immunological causes and 11 virgin heifers. Using the sperm cells penetration test developed by Alexander it was proved that the cervical mucus and uterine secretion of the cows infertile due to immunological causes are to various degree accessible to the penetration of bull sperm cells against which they have got a high titre of spermagglutinins in the serum. Over one hour's time the sperm cells covered a 3 times longer distance in the uterine secretion as compared to the cervical mucus. Cows with fertility disturbances for immunological causes intrauterinally inseminated with the same sperm previously ineffectively used for their intracervical insemination, got pregnant in 60%.