

IMUNOLOŠKI ASPEKTI VEŠTAČKOG OSEMENJAVANJA KRAVA

M. Lazarević, redovni profesor

**Katedra za fiziologiju i biohemiju,
Fakultet veterinarske medicine, Beograd
2009. god**

Sve veća primena metoda veštačke oplodnje, fertilizacije u *in vitro* uslovima i embrio transfera, u humanoj i veterinarskoj medicini, nameće nova pitanja o odnosu imunskog sistema i gameta tako da dalji napredak u ovoj oblasti nije moguć bez potpunijeg poznavanja faktora koji na taj odnos utiču i karakteristika antigena spermatozoida.

Poznato je da imunski sistem ženki sisara mora da "zatvori oči" pred ogromnim brojem epitopa poreklom od oca kako bi se omogućila nesmetana fertilizacija i na svet doneo zdrav plod. Ovi antigeni se nalaze i na spermatozoidima i na embrionalnim omotačima a sama materica nije imunološki privilegovan organ. U njoj funkcionišu kako aferentna, tako i eferentna grana imunskog odgovora. Da nije tako i banalne infekcije ženskog genitalnog trakta bi imale dalekosežne, negativne posledice. Osim toga, dokazano je da se alografti drugih tkiva u materici veoma efikasno odbacuju. Kod mužjaka je, sa druge strane, moguća autoimunizacija antigenima spermatozoida zbog toga što se ove ćelije pojavljuju u ontogenezi tek u pubertetu kada je imunski sistem potpuno funkcionalan i sposoban da reaguje na njihove antigene. Proučavanje navedenih fenomena već dugo privlači pažnju naučnika zbog toga što potpunije sagledavanje mehanizama ove specifične imunske tolerancije može da pomogne rešavanju problema pri veštačkoj oplodnji i embriotransferu, transplantaciji tkiva, sagledavanju prirode HIV- infekcije i primeni kontraceptivnih vakcina radi kontrole brojnosti populacije ljudi.

Karakteristike antigena spermatozoida

Spermatozoidi se u ontogenezi pojavljuju kasno, kada je imunski sistem potpuno kompetentan i sposoban da prepozna ove ćelije kao strane. Ipak, kod mužjaka, do nastanka antitela na antigene spermatozoida po pravilu ne dolazi, i to iz dva glavna razloga. Prvi je postojanje barijere krv-testis a drugi, veliki broj supresorskih T limfocita u submukozi sprovodnih kanala muškog genitalnog trakta, pre svega epididimisa. Antigeni spermatozoida spadaju zbog toga u tzv. skrivene antigene. Osim Sertolijevih ćelija, u formiranju barijere krv-testis učestvuju i tesno povezane kontraktilne mioidne ćelije kao i bazalna membrana. Jedino

u slučajevima kada se ove zaštitne barijere naruše može doći do nastanka autoantitela sa posledičnim privremenim ili trajnim sterilitetom. U imunologiji reprodukcije je u cilju proučavanja navedenih fenomena odavno razvijen eksperimentalni model autoimunog orhitisa. Ukoliko dođe do infekcije semenika, njegovog povređivanja ili posle vazektomije, kada je povećana resorpcija delova spermatozoida iz epididimisa, proteini specifični za ove ćelije dolaze u kontakt sa limfocitima pa nastaju autoimuna oštećenja. Sertolijeve ćelije koje leže na bazalnoj membrani semenih kanalića u zonama međusobnog dodira, formiraju "tight junction" vezama, dva odeljka kroz koje prolaze spermatogonije. Ove barijere obezbeđuju da se spermatogonije nađu u specifičnom mikrokruženju koje se po sastavu znatno razlikuje i od seruma i od ekstracelularne tečnosti, a da je svaki njihov kontakt sa drugim ćelijama praktično nemoguć. U procesu sazrevanja, spermatogonije se pomeraju ka lumenu tubula i na ulasku se pretvaraju u primarne spermatocyte. Od njih mejozom nastaju sekundarni spermatociti a od ovih spermatide. Spermatide dobijaju akrozomsku kapu i rep pa tako nastaju spermatozoidi okruženi sekretom nastalom u samom semeniku. Zahvaljući ovakvoj prostornoj organizaciji u semeniku, antitela nastala protiv spermatogonija neće štetno delovati na spermatide jer se ove ćelije međusobno antigenski veoma razlikuju. Ukoliko dođe do nastanka antitela na antigene spermatozoida ona neće reagovati sa spermatogonijama što objašnjava privremeni karakter neplodnosti ove vrste.

U predelu rete testis, spermatozoidi su ipak dostupni T ćelijama, antitelima i komponentama sistema komplementa tako da se sigurnošću može tvrditi da postoje drugi, lokalni, operativni mehanizmi čiji je cilj da spreče autoimunizaciju mužjaka. Ovi mehanizmi uključuju: aktivnost supresorskih ćelija, nespecifičnu supresiju u samom semeniku, neadekvatnu prezentaciju antigena u testisu i na kraju, "izbegavanje" semenika pri recirkulaciji limfocita. Ne sme se izgubiti iz vida ni činjenica da oko 50% spermatozoida u epididimisu podleže enzimskoj destrukciji što sprečava da njihovi antigeni dospeju u cirkulaciju u neizmenjenom obliku. Distribucija limfocita u submukozi sprovodnih kanala reproduktivnog trakta mužjaka karakteriše se prisustvom velikog broja supresorskih T ćelija što bez sumnje ima uticaja na smanjen imunski odgovor protiv antigena spermatozoida.

Ćelijska membrana spermatozoida je veoma heterogena, složena struktura, čiji sastojci imaju ključnu ulogu u mnogim fundamentalnim procesima kao što su transport, kretanje i oplodjenje. Detaljnije proučavanje njenih osobina i građe kod bikova počinje trideset godina primenom monoklonskih antitela kada su definisana četiri antigena koji reaguju sa antitelima

SP2A5, SP1A2, SP1C4 i SP1C6. Oni su specifični za spermatozoide ali ih nema na spermatozoidima iz epididimisa već u semenoj plazmi.

Osim direktnog inhibitornog delovanja na ćelije a delimično i molekule imunološkog sistema sastojci semene plazme, koji po pravilu nemaju izraženu antigenost, maskiraju glavne antigene membrane spermatozoida što dodatno obezbeđuje zaštitu od eventualnih imunoloških oštećenja u genitalnom traktu ženke. Takav je slučaj sa SCA (Spermatozoa Coating Antigen) iz semene plazme ljudi i kunića. Ovaj β globulin koji sadrži gvožđe identičan je u antigenskom smislu sa laktoferinom iz mleka i adsorbuje se na površinu spermatozoida a ženke na njega ne reaguju stvaranjem antitela. SCA ima i sposobnost da inaktiviše komplement tako da može učestvovati i u blokadi efektornih molekula imunološkog sistema. Ovaj protein se uklanja sa površine spermatozoida u toku procesa kapacitacije. Mi smo pre desetak godina dokazali i da semena plazma bika inhibira aktivaciju sistema komplementa. Od posebnog je značaja i činjenica da u genitalnim organima ženki, spermatozoidi usled kretanja i prolaska kroz cervikalnu sluz gube svoj omotač i na taj način stalno menjaju antigensku strukturu, odnosno ispoljavaju različite antigene na svojoj površini. To svakako smanjuje verovatnoću za nastanak dovoljne količine potencijalno štetnih antispermatozoalnih antitela. Sličan fenomen se može posmatrati i tokom prolaska spermatozoida kroz sprovodne kanale genitalnog trakta mužjaka. Još su rani eksperimenti na glodarima dokazali da spermatozoidi iz testisa imaju veću imunogenost kad se subkutano injiciraju životinjama drugih vrsta. Oni su čak imunogeni u okviru iste vrste što sa spermatozoidima iz ejakulata nije slučaj. Ako i dođe do imunološke reakcije na spermatozoide iz ejakulata ona je po pravilu slaba. To praktično znači da sastojci adsorbovani na površini muških gameta, poreklom iz sekretornih ćelija sprovodnih kanala i semene plazme smanjuju imunogenost muških gameta. Poznato je da izoimunizacija ženki kunića i krava spermatozoidima iz epididimisa ima mnogo teže posledice po njihovu reprodukciju nego imunizacija istim ćelijama iz ejakulata i da dovodi uglavnom do rane smrtnosti embriona. Na površini spermatozoida nalaze se i antigeni krvnih grupa ali oni barem kod goveda (antigen J) po svemu sudeći nemaju uticaja na plodnost. Kod kunića enzim transglutaminaza iz semene plazme, reaguje sa $\alpha 2$ makroglobulinima koji se nalaze na površini membrane spermatozoida dovodeći do konformacionih promena i vezivanja poliamina sa posledičnom izmenom antigenske strukture.

Indirektna imunofluorescentna tehnika a zatim i primena monoklonoskih antitela omogućile su identifikaciju brojnih antigena spermatozoida sisara i upoznavanje njihovih

uloga u procesima fertilizacije i imunološke neplodnosti. Uobičajeno je da se antigeni spermatozoida grupišu na osnovu lokalizacije pa tako postoje površinski antigeni, antigeni akrozoma, antigeni jedra i flagelarni antigeni. U površinske antigene (izolovane kod različitih životinjskih vrsta i čoveka) spadaju: PH-20, PH-30 (fertilin), P86/5, M 42, M 29, FA 1, S 19, autoantigeni spermatozoida kunića i enzim LDH-C4. Većina ovih antigena su glikoproteini. U antigene akrozoma ubrajaju se akrozin, SP-10 i GB 24 a u nuklearne protamin NASP (engl. nuclear autoantigenic sperm protein). Kao flagelarni antigeni najčešće se spominju S69/S70 i AgX. Potrebno je da se ovde istakne, da na osnovu dosadašnjih rezultata dobijenih ispitivanjima navedenih antigena, jedino površinski antigeni imaju ulogu u nastanku imunološkog steriliteta i subfertiliteta. U serumu i cervikalnoj sluzi žena sa neplodnošću nepoznate etiologije se često mogu dokazati antitela protiv glikoproteina membrane spermatozoida (FA – 1) koji je neophodan za fertilizaciju. Kod bikova su u membrani spermatozoida metodom monoklonskih antitela dokazani proteini koji mogu da vezuju heparin (heparin-binding proteins – HBP) koji po svu sudeći imaju značajnu ulogu u procesu fertilizacije. Vezivanje heparina se dovodi u direktnu vezu sa akrozomskom reakcijom. Potrebna su dodatna proučavanja da se ustanove tačne uloge ovih protina u procesu oplodjenja a time i ustanovi njihov značaj za reprodukciju.

Nedavno su publikovani rezultati ispitivanja u kojima je ELISA tehnikom u serumu krava koje povadaju određivano prisustvo antitela protiv 16 različitih polipeptida izolovanih iz ispranih spermatozoida bikova. Autori su utvrdili da se kod većine ovih plotkinja mogu detektovati antitela na dva polipeptida čija je dalja karakterizacija u toku.

Zanimljivo je na ovom mestu objasniti moguće posledice promene antigenske strukture spermatozoida u toku njihove pripreme za veštačku oplodnju. U humanoj medicini se pri veštačkoj oplodnji sve više koristi "swim up" metod pri kome se iz ejakulata u pogodnom medijumu izdvajaju najvitalniji spermatozoidi ali se pri tome u velikoj meri, usled razređenja, praktično gubi semena plazma. Posle višekratnih postupaka osemenjavanja kod žena nastaju citotoksična antitela koja mogu ugroziti i uspeh postupka i zdravlje pacijentkinja pa se ponovni pokušaji odlažu za nekoliko meseci. Ovo je posledica gubitka protektivnog delovanja imunosupresora supstanci iz semene plazme, prvenstveno prostaglandina.

Antitela usmerena protiv antigena spermatozoida

Antitela usmerena protiv antigena spermatozoida mogu da dovedu do imobilizacije ili aglutinacije ovih ćelija a mogu ispoljavati i citotoksične efekte. Kod ženki se ona mogu dokazati u cervikalnoj sluzi, sekretima genitalnog trakta, folikulskoj tečnosti i u serumu.

Primarno, ona otežavaju transport kroz ženski genitalni trakt (imobilizacija) ili se nastankom aglutinata smanjuje broj spermatozoida koji dospevaju u jajovod. Verovatnoća za nastanak ovih antitela je mnogo veća pri veštačkom osemenjavanju nego pri prirodnom sparivanju.

Postupak veštačkog osemenjavanja uspešno se primenjuje u veterinarskoj medicini već više decenija sa osnovnim ciljem širenja genoma visokokvalitetnih grla u populaciji čime se mnogo brže popravljaju njen rasni sastav. Tehnologija pripreme semena bika za veštačko osemenjavanje podrazumeva razređivanje ejakulata (najmanje nekoliko desetina puta), hlađenje i duboko zamrzavanje u tečnom azotu (-196°C) što može dovesti do promena u antigenskoj strukturi. Osim toga, razređivači za seme bikova u svom sastavu često imaju i žumance kokošijeg jajeta kao osnovnu supstancu koja štiti spermatozoide od oštećenja u toku zamrzavanja (krioprotekcija). Žumance sadrži brojne antigene na koje plotkinje mogu reagovati a dokazano je da se pojedini fosfolipidi iz njegovog sastava ugrađuju u membranu spermatozoida tako čvrsto da se ni grubim laboratorijskim postupcima ne mogu odvojiti bez oštećenja ćelija. Istovremeno se semena plazma razređuje nekoliko desetina, pa i stotina puta što smanjuje količinu imunosupresivnih supstanci u okruženju spermatozoida. Iznete činjenice mogu bar delimično da objasne zašto su rezultati veštačkog osemenjavanja krava (slični postupci se koriste i kod drugih vrsta) još uvek slabiji od očekivanih. Pri tome treba da se naglasi da do sada nije ustanovljena jasna korelacija između prisustva antispermatozoalnih antitela i subfertiliteta plotkinja. Naime, plotkinje sa bezsimptomskim subfertilitetom nisu neplodne i pri prirodnom parenju lakše koncipiraju. Ako se ostavi po strani imunski odgovor na antigene spermatozoida i razređivača za seme bikova, mora se imati u vidu i mogućnost da pojedine komponente iz sastava razređivača mogu jednostavno da maskiraju proteine relevantne za fertilizaciju i oslabe ili čak eliminišu njihovu ulogu u tom procesu. Ispitivanjima koja su izvođena sa ciljem da se ustanovi pomenuta korelacija mogu se staviti neke suštinske primedbe. Najčešće je u njima utvrđivan titar antitela protiv nativnih spermatozoida (sa kojima jedinke nisu ni dolazile u kontakt) i to u serumu (koji ne mora odražavati lokalno stanje npr. u cervikalnoj sluzi) a broj ispitanih životinja je po pravilu bio mali. Rezultati oglada u kojima je vršena imunizacija junica direktnom aplikacijom suspenzije spermatozoida u cerviks potvrdili su da se antitela mogu dokazati u cervikalnoj sluzi ali ne i u serumu oglednih životinja. Takođe je dokazano da se kod svega 3% krava sa normalnim reproduktivnim pokazateljima u serumu nalaze antitela protiv antigena žumanjčanog razređivača dok je u grupi krava koje povadaju taj procenat 29. U istoj studiji, 67% jedinki koje povadaju imalo je antitela na antigene razređivača u cervikalnoj sluzi. U većim

populacijama životinja se stiče utisak da se pojedine jedinke "odupiru" veštačkoj oplodnji a moguće je da se samo radi o životinjama kod kojih je lokalna aktivnost imunog sistema izražena. Ako bi se selekcijom one eliminisale posle nekoliko decenija bi posledice takvog pristupa bile nesagledive.

Na ovom polju rada u medicini se došlo do apsurdne situacije da se i pored opravdane sumnje na imunološki subfertilitet, ne mogu obezbediti dovoljno ubedljivi dokazi za njegovo postojanje. Moguće objašnjenje za ove poteškoće treba tražiti u činjenici da još uvek nisu definisani antigeni spermatozoida i rezređivača za spermu koji su odgovorni za nastanak imunološkog subfertiliteta. Osim toga, titar antitela protiv antigena spermatozoida u krvnom serumu ne mora da odražava realno stanje i verovatno su mnogo značajnija lokalno stvorena antitela koja se nalaze u cervikalnoj sluzi. Istovremeno, uzorci cervikalne sluzi, dobijeni u fazi estrusa, su razređeni zbog povećanog sadržaja vode usled estrogenih hormona tako da stepen ove dilucije, koji se ne može predvideti, može značajno da utiče na dobijene rezultate. Mi smo nedavno dokazali da antitela protiv antigena spermatozoida, klase Ig A, iz cervikalne sluzi junica i krava imaju mnogo veći, negativan uticaj na pokretljivost spermatozoida nego antitela klase Ig G iz seruma.

Od značaja je i podatak da se u serumu zdravih, fertilnih ženki različitih vrsta mogu dokazati antitela protiv spermatozoida koja ne ometaju reprodukciju i pored činjenice da dospevaju u sekret uterusa. Ova antitela se uglavnom vezuju za nepokretne spermatozoide (ili možda dovode do toga da oni postanu nepokretni ?) dok ih na spermatozoidima velike pokretljivosti po pravilu nema, barem sudeći po rezultatima dobijenim metodama indirektno imunofluorescence. Postavljena je pretpostavka da ova antitela doprinose efikasnijem uklanjanju spermatozoida iz genitalnog trakta ženki i uspostavljanju specifične tolerancije prema antigenima muških gameta. Postoje dokazi da se ta antitela vezuju za spermatozoide preko Fc fragmenta i na taj način ih zapravo štite. Paradoksalno zvuči nalaz da se u serumu 90% dečaka i devojčica i pre puberteta otkrivaju antitela protiv spermatozoida ali su ona usmerena na intracelularne antigene. Kao i kod slučajno izabranih uzoraka seruma poreklom od žena davalaca krvi i plodnih žena, serum dečaka su imali veoma nizak titar antitela (do 1:16) što nije bio slučaj kod žena sa neplodnošću nepoznate etiologije. Kod njih su, naime, antispermatozoalna antitela prisutna u većoj koncentraciji. U svakom slučaju, antitela čije je prisustvo dokazano kod dečaka nisu bila usmerena protiv površinskih antigena spermatozoida već protiv antigena jedra.

Mi smo nedavno, sopstvenim istraživanjima, dali doprinos poznavanju ovog fenomena. U uzorcima seruma teladi dobijenim pre uzimanja kolostruma nismo dokazali prisustvo antitela protiv spermatozoida niti drugih faktora koji bi dovodili do njihove aglutinacije. Antitela Ig G klase protiv antigena spermatozoida dokazali smo tek u uzorcima dobijenim 48 sata života i njihov titar se povećavao sa uzrastom teladi. Skoro svi uzorci dobijeni od teladi stare 4 meseca imali su antitela ove specifičnosti. Takođe smo dokazali i prisustvo antitela Ig M klase protiv antigena spermatozoida ali u značajno nižem titru. Osim toga, u ovim istraživanjima je dokazano da postoje razlike u titru antitela u zavisnosti od toga da li se za izvođenje testa koriste nativni spermatozoidi ili spermatozoidi iz pajeta za VO. Najniže vrednosti titra su registrovane sa nativnim spermatozoidima a najveće sa spermatozoidima prethodno suspendovanim u TRIS - žumanjčanom razređivaču. Vrednosti titra antitela su ipak bile veoma niske bez obzira na primenjenu metodu ispitivanja.

Određivanje vrednosti titra spermaglutinina u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi predstavlja korak dalje u proučavanju mogućih uzroka bezsimptomskog steriliteta junica i krava. Analizom ovih vrednosti u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava sa različitim indeksom osemenjavanja, osemenjenih semenom bika pripremljenim u TRIS-žumanjčanom razređivaču, kada su za izvođenje testa aglutinacije u želatinu korišćeni spermatozoidi iz pajeta za VO i isprani spermatozoidi iz ejakulata bikova, mi smo dokazali antigenske razlike između spermatozoida suspendovanih u različitim razređivačima. Ova istraživanja su potvrdila da interakcija spermatozoida, semene plazme i razređivača dovodi do promena u antigenskoj strukturi membrane spermatozoida i verovatno ima uticaja i na funkcije semene plazme.

Mi smo takođe uočili da je porast vrednosti titra spermaglutinina u krvnom serumu ispitivanih plotkinja proporcionalan broju VO kao što iznose i neki drugi autori. U našim ispitivanjima ova korelacija nije bila uvek sasvim jasna verovatno zbog malog broja životinja u pojedinim grupama. TRIS-žumanjčani razređivač značajno menja antigensku strukturu semena bika pripremljenog za v.o. što je potvrđeno i semikvantitativnim postupkom (KBM-test). Ovaj nalaz je u skladu sa mišljenjem brojnih autora da standardni spermorazređivači sadrže brojne antigene (u visokoj koncentraciji) i da većina njih potiče iz žumanceta kokošijeg jajeta. Mi smo dokazali da se stepen aglutinacije spermatozoida antitelima iz krvnog seruma i cervikalne sluzi junica i krava u većini uzoraka značajno smanjuje kada se za izvođenje testa upotrebe spermatozoidi prethodno suspendovani u biljnom razređivaču Biociphos plus.

Naši rezultati u određivanju visine titra spermaglutinina u cervikalnoj sluzi junica i krava su u skladu sa rezultatima autora koji navode da postoji korelacija između prisutva antitela u cervikalnoj sluzi i broja VO. Antitela u cervikalnoj sluzi uglavnom pripadaju Ig A klasi što je poznato iz humane medicine kao i iz ispitivanja na glodarima. U tom smislu, naši novi nalazi predstavljaju doprinos u rasvetljavanju uloge lokalne imunološke reakcije u nastanku bezsimptomskog steriliteta domaćih životinja. U sledeće dve tabele prikazali smo rezultate studije kojom je bilo obuhvaćeno 80 plotkinja, podeljenih u četiri jednake grupe na osnovu broja veštačkih osemenjavanja. Sve plotkinje su bile osemenjavane spermatozoidima prethodno suspendovanim u TRIS - žumanjčanom razređivaču. Metodom indirektno imunofluorescence određivali smo titar anti-spermatozoalnih Ig A antitela u cervikalnoj sluzi i krvnom serumu uzorkovanim na dan poslednjeg VO. Za analize su korišćeni spermatozoidi suspendovani u razređivaču "Biociphos +" i TRIS -žumanjčanom razređivaču.

Tabela 1. Srednje vrednosti titra Ig A anti-spermatozoalnih antitela ($\log_2$) u cervikalnoj sluzi krava ($X \pm SD$, $n=20$)

Broj VO	Spermatozoidi suspendovani u razređivaču "Biociphos +"	Spermatozoidi suspendovani u TRIS –žum. razređivaču
1-2	3.00 ± 1.29	3.85 ± 0.87
3-5	5.20 ± 1.60	5.75 ± 2.63
6-8	5.45 ± 2.11	6.65 ± 2.77
preko 8	5.45 ± 2.39	6.45 ± 2.39

Tabela 2. Srednje vrednosti titra Ig A anti-spermatozoalnih antitela ($\log_2$) u serumu krava ($X \pm SD$, $n=20$)

Broj VO	Spermatozoidi suspendovani u razređivaču "Biociphos +"	Spermatozoidi suspendovani u TRIS –žum. razređivaču
1-2	1.90 ± 1.19	2.50 ± 1.10
3-5	2.85 ± 1.46	3.00 ± 1.45
6-8	3.50 ± 1.57	3.15 ± 1.66
preko 8	3.65 ± 1.42	3.90 ± 1.52

Iz prikazanih rezultata može da se zaključi da se vrednost titra anti-spermatozoalnih Ig A antitela povećava sa brojem VO kao i da su ispitivanjem cervikalne sluzi registrovane znatno veće vrednosti nego u serumu. Dodatno, srednja vrednost titra ovih antitela je bila veća kada su za izvođenje testa korišćeni spermatozoidi suspendovani u TRIS - žumanjčanom razređivaču. Ovi podaci nedvosmisleno dokazuju da se antigenska struktura spermatozoida

bika menja u zavisnosti od korišćenog razređivača i da je lokalni imunski odgovor na antigene spermatozoida koji su korišćeni za VO izraženiji od sistemskog. Postoje podaci da vezivanje Ig A iz semene plazme ljudi za membranu spermatozoida negativno utiče na penetraciju ovih ćelija kroz cervikalnu sluz žena. Vrlo je verovatno da isti efekat imaju i Ig A antitela koja se nalaze u samoj sluzi.

Međutim, bez obzira na porast titra antitela, potrebno je da se još jednom istakne da su ispitivane plotkinje uglavnom subfertilne, a ne sterilne. U prirodnom pripustu, njihovi reproduktivni rezultati se vidno popravljaju ($p < 0,001$). Pri razmatranju ovih rezultata ne sme se izgubiti iz vida činjenica da su kod životinja sa poremećenim estralnim ciklusom kao i kod životinja koje se ne osemenjavaju u pravom momentu povećane šanse za imunizaciju antigenima iz ejakulata i razređivača. Osim toga, mora se znati da je zapremina semene plazme, koja sadrži brojne imunosupresivne faktore, pri prirodnom parenju 50 - 100 puta veća nego pri VO, što još više povećava šanse za imunizaciju. Mi smo ranije dokazali da se imunosupresivni efekti semene plazme bika, ne gube potpuno za vreme tehnološke obrade semena ali je jednostavno njena količina manja. Kod goveda postoji vaginalni tip deponovanja semena tako da nije poznato koliko semene plazme zapravo dospeva u uterus, ali je ta količina svakako veća nego pri VO.

Zaključak

Očigledno je da su, uprkos brojnim tehnološkim unapređenjima, imunološki problemi u reprodukciji životinja i ljudi pri veštačkom osemenjavanju izraženi dugi niz godina. Iz tih razloga uveden je nedavno, u veterinarskoj medicini, nov pristup tehnologiji veštačkog osemenjavanja sa ciljem da se poboljšaju reproduktivni rezultati. On se bazira na uvođenju u upotrebu novih razređivača, koji ne sadrže proteine animalnog porekla, kao i u većoj primeni osemenjavanja svežim semenom. Poznato je da pri zamrzavanju i otapanju semena bika, značajan procenat spermatozoida ne preživi tako da je logično očekivati da će osemenjavanje svežim semenom dati bolje rezultate. Mi smo u jednom zapatu mlečnih krava, gde su organizacioni uslovi bili povoljni, krave koje povadaju osemenjavali svežim semenom bikova i rezultati su bili daleko iznad naših očekivanja. Oni se čak mogu porediti sa rezultatima dobijenim nakon prirodnog pripusta.

Mišljenja smo da u tehnologiji pripreme semena za VO treba koristiti različite razređivače (na pr. TRIS - žumanjčani i Biociphos plus). U slučajevima povadanja trebalo bi

koristiti seme razređeno u onom razređivaču koji do tada nije bio korišćen. Postoje realne indikacije da bi ovakav pristup doveo do boljih reproduktivnih rezultata.