

Állatorvostudományi Egyetem
Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

**Kutyasperma centrifugálási módszerek
összehasonlító vizsgálata**

Comparative review on dog sperm centrifugation methods

Készítette: Borsodi Boglárka

VI. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Bacsa Mónika, tanszéki állatorvos, PhD hallgató

Dr. Cseh Sándor, egyetemi tanár

Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika

2023

Absztrakt

A kutyák mesterséges termékenyítése, és az ehhez kapcsolódó tartós spermatárolás egyre elterjedtebbé vált az elmúlt évtizedekben. A tartós tárolást a sperma hűtésével, illetve fagyasztásával/mélyhűtésével lehet elérni. Azonban felmerültek kétségek azzal kapcsolatban, hogy a hűtve tárolás (5-8°C), illetve a mélyhűtött tárolás során nem romlik-e számottevően a spermiumok minősége prosztata váladék jelenlétében. Ennek kiküszöbölésére elterjedt módszerré vált a kan kutyáktól levett minták centrifugálása a prosztataváladék eltávolítása érdekében. A prosztataváladék káros hatással lehet az ondósejtekre, ugyanakkor vannak előnyös tulajdonságai is. Kimutatták, hogy termékenyítés során szükséges lehet a jelenléte, mivel olyan immunológiai folyamatokat indít be a női szervezetben, ami nagyban hozzájárul a sikeres vemhesség eléréséhez, illetve az egészséges embrió, magzat fejlődéséhez. A megfelelő centrifugálási módszer, sebesség, időtartam kiválasztása kulcsfontosságú a sperma feldolgozása során, ugyanis a centrifugálásnak is lehetnek negatív hatásai a spermiumokra nézve. Dolgozatomban a prosztataváladék szerepével és a centrifugálással, mint spermatisztítási módszerrel kapcsolatban megjelent cikkek tanulmányozásával és rendszerezésével tekintetem át az említett kérdésköröket.

Tartalomjegyzék

Absztrakt	1
Tartalomjegyzék	2
Rövidítések listája	3
1. Bevezetés (Célkitűzés)	4
2. Szakirodalmi áttekintés	5
2.1. A kan kutyák reprodukciós szerveinek áttekintése	5
2.2. A prosztataváladék összetétele	5
2.3. Spermagyűjtés	7
2.4. Az ejakulátum vizsgálata.....	8
2.5. A női nemi traktus reakciója a párzásra és a párzás révén bejutott ondóra.....	11
2.6. A spermium- szelekció szerepe az asszisztált reprodukció során	11
2.7. Centrifugálás	12
2.7.1. Centrifugálási sebességek	13
2.7.2. Centrifugálás hatása a spermiumokra	15
2.7.3. A centrifugálás típusai	15
2.8. Spermahűtés és centrifugálás	22
2.9. Sperma mélyhűtés / fagyasztás és centrifugálás	24
2.10. A prosztataváladék szerepe a termékenyítés során	25
3. Módszer	28
4. Eredmények	29
5. Következtetés.....	30
6. Összegzés.....	31
7. Summary.....	33
Irodalomjegyzék.....	35
Köszönetnyilvánítás	41

Rövidítések jegyzéke

CASA	számítógép asszisztált sperma analízis
DGC	sűrűséggradiens centrifugálás
DNS	dezoxiribonukelinsav
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
MMP	mátrix metalloprotein
PMN-sejtek	polimorfonukleáris neutrofil-sejtek
RCF	relatív centrifugálási erő
ROS	reaktív oxigén gyökök
RPM	percenkénti fordulatszám
SCD	Sperm Chromatin Dispersion Test
sDFI	spermium DNS fragmentációs index
SLC	egyrétegű kolloid centrifugálás
TALP	Tyrode-féle albumin-laktát-piruvát

1. Bevezetés (Célkitűzés)

A kutyák mesterséges termékenyítése az elmúlt évtizedekben egyre elterjedtebbé vált, hiszen az örökítőanyag transzportja leegyszerűsödött, elérhetővé vált mindenki számára, ami megkönnyíti ezen technikák elterjedését. A mesterséges termékenyítés előnye, hogy a nemi betegségek terjedésének csökkenését is elősegíti a sperma minták, illetve a donor állatok vizsgálata miatt. A mesterséges termékenyítés különböző fázisaiban igyekeznek a természetes folyamatot figyelembe venni. Már a spermagyűjtés során fontos, hogy megfelelő körülményeket biztosítsunk az állatok számára, hogy az ejakuláció végbe tudjon menni. Ha nem azonnal történik a sperma felhasználása, akkor tárolásra van szükség, ami általában hűtéssel, illetve fagyasztással történik. Ezen eljárásokhoz a gyűjtés után mielőbb elvégzett centrifugálás elengedhetetlen, amellyel eltávolítjuk a prosztataváladékot, illetve a sérült sejteket, törmelékeket, kórokozókat. A prosztataváladék eltávolítása azért szükséges, mert a hűtve tárolás során annak összetevői káros hatással vannak az ondósejtekre, ami a sejtek mozgékonyságának és életképességük romlásában nyilvánul meg. Ennek következményeképpen romlik a termékenység is. Azonban Nöthling és Volkmann (2005) azt tapasztalták, hogy, amikor az eltávolított prosztataváladékot termékenyítéskor hozzáadták a felolvasztott spermához javult annak a termékenyítőképesége [1].

Szakedolgozatom célja, hogy a rendelkezésre álló szakirodalom részletes tanulmányozásával összehasonlítsam a különböző centrifugálási módszereket, azok előnyeit és hátrányait. Továbbá célom, hogy értékeljem a prosztataváladék szerepét a sperma tárolása során, illetve a termékenyítéskor történő felhasználás során.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A kan kutyák reprodukciós szerveinek áttekintése

A hímnemű kutyák reprodukciós szervei közé tartozik a hereborék, az ebben elhelyezkedő herék és mellékherék, az ondóvezeték, az ondózsínór, a pénisz és a húgycső, illetve az egyetlen járulékos hímnemi mirigy, a prosztata. A herében termelődnek az ondósejtek, amelyek innen a mellékherébe jutnak, annak elülső, feji részében fejeződik be az érésük, majd az ejakuláció bekövetkeztéig a mellékheré farki részében tárolódnak. Az ivarsejtek az ondóvezetőn keresztül a húgycsőbe kerülnek és itt keverednek a járulékos mirigy(ek) váladékával, az ondóplazmával. Az így létrejött váladékot nevezzük ondónak, amely a kanok közösülő szervében, a péniszben haladó húgycsövön át jut a külvilágra[2].

A kan kutyák egyetlen járulékos hímnemi miriggyel rendelkeznek, a prosztatával, melynek a mérete fordított arányban áll a herével. A prosztata, más néven dűlmirigy, gömb alakú, tömör szerkezetű mirigy, a húgyhólyag nyakát, illetve a húgycső medencei szakaszának felső részét veszi körbe. Egy sekély, hosszanti dorsalis barázda választja két lebenyre a mirigyet. A prosztatának számos kivezető csöve van, amelyek a húgycsőbe nyílnak, az ondóvezeték nyílásának közelében. A prosztata váladéka savószerű, a pH értéke 6.5-7.0. Mennyisége általában 30-40ml, az ondó 70-80%-át teszi ki. A kan kutyák 3 frakcióban ejakulálnak, melynek 1. illetve főként a 3. frakciója prosztata eredetű.

2.2. A prosztataváladék összetétele

Zsírok

A különböző zsírsavak nem egyenlő mennyiségben találhatóak meg az ondóplazmában.[3] Egy vizsgálat szerint az összes zsírsav 2,5%, ebből a legnagyobb mennyiség telített zsírsav (85%), a telítetlen zsírsavak közül pedig az egyszeres telítetlen zsírsavak aránya jóval magasabb (~14%), mint a többszörösen telítetlenek(~1,7%). A fő telített zsírsav a sztearinsav, a palmitinsav, a mirisztinsav, a fő telítetlen pedig az olajsav.

Cukrok

Kutyák prosztataváladékának fruktóz tartalma alacsony, összehasonlítva a többi állatfaj prosztataváladékával[2]. Ennek ellenére a kutya ondójában lévő spermiumok ezt a cukrot, illetve a glükózt is tudják hasznosítani[4].

Fehérjék

A váladék fehérjében és elektrolitokban gazdag. Tartalmaz proteolitikus enzimeket: savanyú foszfatázt, amilázt és fibrinolizint is alacsony mennyiségben, azonban az arginin-észteráz mennyisége nagyon magas[5].

A mátrix metalloproteinek (MMP-k) is a proteolitikus enzimek csoportjába tartoznak, szerepük a *spermium metabolizmusának fenntartása*, az extracelluláris mátrix és az alapmembrán fehérjéinek lebontása, továbbá a *spermium funkciójának megfelelő működés biztosítása*. Humán ondóban már korábban is vizsgálták ezeknek a jelenlétét, azonban kutyákban csekély vizsgálat irányult erre. [6]. A második és a harmadik frakció fehérjéinek összetételében némi különbség található. Egy erre irányuló kutatásban 251 fehérjét tudtak kimutatni, amikor a két frakciót együtt vizsgálták, míg a spermiumban gazdag frakcióban megtalálható volt 17 olyan fehérje is, amely a harmadik frakcióban nem [7]. Azt is eredményül kapták, hogy az arginin-észteráz, a laktorferrin és transferrin volt a legnagyobb intenzitású fehérje mindkettő fázisban.

Sertésben, lóban és szarvasmarhában már korábban is vizsgálták az ondóplazma laktoferrin és transferrin koncentrációját, azonban a kan kutyákra vonatkozóan nem volt korábbi kutatás. Japánban 2002-ben 14 kutyától vettek ondóplazma mintát és vizsgálták az előbb említett vaskötő proteinek koncentrációját, illetve ezek hatását az ondósejtek számára és motilitására. A mintákat centrifugálás után a felhasználásig -25°C-on tartották. A laktoferrin koncentrációt kompetitív ELISA módszerrel, a transferrin koncentrációját pedig szendvics ELISA-val vizsgálták. A kapott eredmények azt mutatták, hogy nincs szignifikáns korreláció az ondóplazma transferrin koncentrációja és az ondósejtek teljes száma között. Továbbá nincs szignifikáns összefüggés az ondóplazma transferrin mennyisége és a spermiumok motilitása között. A vizsgálatok eredményei szerint a kutyák ondóplazmája kevesebb laktoferrint tartalmaz, mint a sertés és az ember ondóplazmája. Buckett (1997) magasabb laktoferrin koncentrációt talált azokban a mintákban, ahol oligospermia állt fenn. Az embereknél prostatitis esetén is magasabb volt a laktoferrin koncentráció. Azonban ebben a kutatásban nem sikerült alátámasztani, hogy kutyákban is van összefüggés a két paraméter között, tehát *kutyában a két vizsgált vaskötő fehérje nem tekinthető a nemi mirigyek működési mutatójának*, ellentétben a szarvasmarha vagy az ember ondóplazmájában lévő transferrinekkal [8].

Elektrolitok, ásványi anyagok

Egy német klinikán egy nagyobb kutya populációban (n=30) vizsgálták az ásványi anyagok és elektrolitok jelenlétét, illetve mennyiségét. A kapott eredményeket korábban végzett tanulmányokkal, irodalmi adatokkal vetették össze. A vizsgált ásványi anyagok a nátrium,

kálium, magnézium, kalcium, szervesen foszfát, cink és a réz volt.[9] Néhány ásványi anyagnál találtak mennyiségi különbséget, azonban ezt okozhatta az eltérő vizsgálati módszer alkalmazása, továbbá a különböző ondóplazma előkészítési módszer. Legnagyobb mennyiségben cinket (866 mmol/l), nátriumot (145 mmol/l) illetve rezet (37 mmol/l) találták, a többi nyomelem 0,2-10 mmol/l tartományba esett. A cink koncentráció megállapítása emiatt alkalmas a prosztata működés monitorozására.

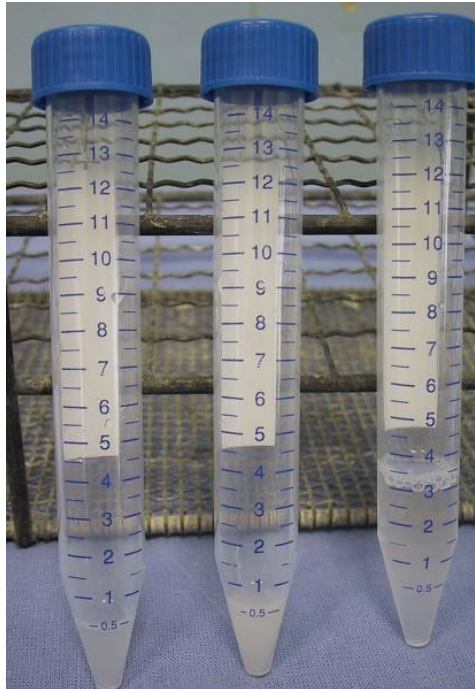
2.3. Spermagyűjtés

A spermagyűjtés a mesterséges termékenyítésen túl történhet a sperma minőségének ellenőrzése (pl. tenyészkán időszakos ellenőrzése, kezdő tenyészkán ondó vizsgálata, meddőségi vizsgálatok), és a sperma későbbi felhasználása céljából. Rövid ideig történő tárolás esetén friss, vagy hűtött spermát alkalmaznak, hosszú távú tárolás esetén a spermát fagyasztani/mélyhűteni kell. Bizonyos esetekben akkor is szükséges lehet spermát gyűjteni, ha az anatómiai viszonyok, vagy viselkedési rendellenességek nem teszik lehetővé a természetes pároztatást[2, 10]. Spermavétellel a prosztata állapotával kapcsolatban is információhoz tudunk jutni.

A gyűjtés során elsődlegesen fontos a nyugodt környezet biztosítása, ha ezt nem tudjuk megtenni, akkor elmaradhat a teljes erekció, és nem lesz megfelelő az ejakuláció sem. A spermagyűjtés kutyák esetében kézi manipulációval történik, segíti a folyamatot a tüzelő szuka jelenléte, azonban, ha erre nincs lehetőség akkor nemtüzelő szuka, vagy kasztrált kan jelenléte is elegendő lehet. Egyéb esetekben az is sikerhez vezethet, ha egy tüzelő szukából vett hüvelyváladékot Mull-lap vagy tampon segítségével a kan orrához tartjuk.

Az ejakuláció során a spermaürítés 3 frakcióban történik [11]. Az első frakció a prosztatából származik, kis mennyiségű, áttetsző, mert sejtet szinte alig tartalmaz, térfogata általában nem haladja meg a 2-ml-t. A második frakció a heréből és a mellékheréből származik, ez az opálos, tejszerű váladék a spermiumokban gazdag frakció. A harmadik frakció nagy mennyiségben ürül, a térfogata a kutya testméretétől függően változhat és szintén a prosztatából származik. Annak köszönhetően, hogy a frakciók a sajátosságaik miatt elkülönülnek, illetve, hogy a második frakció leadása után egy minimális szünet következik be, el tudjuk különíteni a harmadik frakciót. Ez a szeparált gyűjtés akkor fontos, amikor az ondót mélyhűtés vagy mesterséges termékenyítés céljából vesszük az állatból. A harmadik frakció vizsgálatával a prosztata állapotáról kaphatunk fontos információkat, akár az esetleges bántalmak

fennállásáról. Abban az esetben ha diagnosztikai célból vagy fertilitás vizsgálat céljából gyűjtjük az ondót, akkor a teljes ejakulátumot kell felfogni, mindhárom frakciót egyben [2].



1. ábra: Az ejakulátum 3 frakciója (Forrás: Dr. Cseh Sándor Állatorvosi andrológia) 1.frakció: prosztata eredetű, 2.frakció: spermiumban gazdag, 3. frakció: prosztata eredetű

2.4. Az ejakulátum vizsgálata

Az ejakulátum vizsgálata fontos része az andrológiai alapvizsgálatoknak. Meg kell jegyezni, hogy a vizsgálat során egy-egy paraméter alapján nem lehetséges a sperma termékenyítőképességét megállapítani[12]. Több paraméter együttes vizsgálata, a sejtes alkotó elemek értékelése hozzájárulhat a termékenyítőképesség pontosabb megítéléséhez[2]. Ezeket a vizsgálatokat érdemes legalább 3-4 alkalommal ismételni, különböző időpontokban –legalább 4-6 hét különbséggel- vett spermából megnézni, ezzel is segítve a megalapozott véleményalkotást.

Először a makroszkópos paraméterek vizsgálata történik meg, amelyek az ondó mennyisége és a színe[13]. A kutyák ondó mennyisége 1-40 ml közé esik[2], ezt befolyásolja a spermavétel módja, attól függően, hogy mindhárom frakciót gyűjtötték, vagy csak az első két frakciót. Ezért a térfogat önmagában nem mutatja az ondó minőségét. A teljes, a gyűjtött ejakulátumban található összes spermium számának a meghatározása fontos része a vizsgálatnak, mivel az egy

kiemelt jelentőségű minőségi paraméter[13]. Az ondó térfogatát befolyásolja továbbá a kutya testmérete is, nagyobb testű kanok nagyobb mennyiségű ondó termelésére képesek a nagyobb here méretük miatt[14]. Az ejakulátum színe normál esetben tejfehér színű, opálos [2]. Az áttetsző minták spermahiányra (alacsony spermium-koncentráció), vagy azoospermiára (nincs spermium a mintában) utalhatnak. Egyes esetekben az azoospermiás kutyák zsírcseppeket választanak ki az ondóba, ezáltal makroszkóposan normális képet mutathat a belőlük vett minta [13]. Az ondó sárgás színű elszíneződését vizelettel való szennyeződés okozhatja. Barna vagy vöröses elszíneződés vér jelenlétére utalhat, ennek egyik oka lehet sérülés, de a vér származhat a prosztatából is [13]. Az ejakulátum sárgás-zöld, zöldes elszíneződése genny miatt lehetséges, ami fertőzésre utal [2].

A gyűjtött sperma pH meghatározását lehetőség szerint a gyűjtés után legrövidebb időn belül el kell végezni. Különbség lesz az elkülönítetten gyűjtött sperma, illetve a mindhárom frakciót tartalmazó ejakulátum kapott pH értékében. A nem-elkülönített módon gyűjtött sperma esetén a pH 6,4-6,8 közé esik[12]. Amennyiben a prostataváladék elkülönítve lett gyűjtve annak pH-ja 6,0-7,4 közötti érték. Ez alapján a teljes ejakulátum pH-ját a prostataváladék mennyisége befolyásolja[2].

A makroszkópos paraméterek után következik a mikroszkópos vizsgálat, amihez tulajdonképpen a spermiumok vizsgálata tartozik: a mozgásuk, a morfológiájuk és a spermiumszám[13].

A motilitás vizsgálatot előnyösebb 37°C-on végezni, mint szobahőmérsékleten, továbbá kerülni kell a hőmérséklet-ingadozásokat, mert ez befolyásolhatja az eredményt. Ehhez olyan mikroszkóp használata javasolt, amely melegíthető tárgyasztallal rendelkezik. A vizsgálathoz az ejakulátum egy cseppjét egy tiszta tárgylemezre helyezik, majd ezt fedőlemezzel (22 x 22 mm) fedik le. Fáziskontraszt mikroszkóppal 100-200-szeres nagyításon vizsgálják. Nagy spermiumsűrűség esetén egyedi mozgás vizsgálatot nem tudunk végezni, mert csak az ún. tömegmozgást tudjuk értékelni. Ilyen esetben a spermát hígítani szükséges, megfelelő, előzetesen ellenőrzött hígítóval, amely az ondósejtek mozgását nem, vagy csak kis mértékben befolyásolja[2]. Fiziológiás esetben a spermiumok minimum 70%-a progresszív, előrehaladó mozgást végez. A fiziológiás mozgást végző spermiumok aránya pozitív korrelációban van a megfelelő morfológiájú spermiumok arányával[13].

A megfelelő morfológiával rendelkező spermiumok magas aránya elengedhetetlen a sikeres termékenyítés szempontjából[12]. A morfológiai értékelést is fáziskontraszt mikroszkóppal végzik, de ennek hiányában különböző festési eljárások és fénymikroszkóp használata is megfelelő lehet [13]. Kenetkészítésre többféle módszer is alkalmazható: az egyik ilyen

lehetőség, amikor a tárgylemez egyik végére egy csepp eozin-nigrozín festéket és egy csepp ejakulátumot helyeznek, majd ezeket egy másik tárgylemezzel óvatosan összekeverik. Ezután a vérkenet készítés során megszokott módon tárgylemezzel végig tolva a cseppet, egy vékony kenetet készítenek[12]. A másik módszer során a kenetet -a vérkenet készítéshez hasonló módon- előkészítik, majd különböző festékekkel megfestik. A Diff-Quik festés rendkívül gyors, a spermium akroszómája világos kékre, a farkrész kékre vagy vörösre festődik. Egy másik gyakran használt festés a Spermac-festés, amely az akroszóma állapotáról tájékoztat, illetve alkalmas az akroszómával rendelkező vagy nem rendelkező ondósejtek elkülönítésére. További előnye, hogy alkalmazható fagyasztott, hígított spermával is[2]. A kenetek vizsgálata 1000-szeres nagyításon történik és legalább 200-300 spermiumot szükséges értékelni, egyes formák gyakoriságát százalékos formában adjuk meg[2, 12].

Az alapján, hogy az ondósejt mely részén van elváltozás megkülönböztetünk primer és szekunder rendellenességeket. Primer rendellenesség esetén a spermatogenezis során alakult ki a defektus. Szekunder rendellenesség esetén a spermium érése, vagy a minta előkészítése során lépett fel a hiba[13]. Másodlagos rendellenesség például a visszahajlott fark vagy a levált fej. Fiziológiás esetben a primer rendellenességek aránya nem haladja meg a 10 %-ot, a szekunder rendellenességek pedig a 20 %-ot. Az elsődleges és másodlagos rendellenességek aránya összegezve nem haladhatja meg a 20-30 %-ot[12].

A mozgás és a morfológia vizsgálatán kívül a spermiumok számát, illetve koncentrációját is meg kell határozni. Először a koncentrációt kell megállapítani, majd ezután számolható ki a gyűjtött ejakulátumban található spermiumok összes száma. A minta egy milliliterében lévő spermiumok számát (koncentráció) az ejakulátum milliliterben mért térfogatával kell összeszorozni, és megkapjuk az összes spermiumszámot. Az ondósejtek koncentrációját számlálókamrában (Neubauer, Bürker stb.), koloriméterrel vagy spektrofotométerrel határozhatjuk meg[2]. Lehetőség van azonban számítógépes analízátorral való meghatározásra is (pl. CASA)[13]. Kuttyák esetében a koncentráció $60-540 \times 10^6/\text{ml}$ általában, az összes spermium száma 200 millió és 2 milliárd között alakul. Ez, hasonlóan a térfogathoz, a kutya méretével is összefüggésben van. Nagyobb testű kanoknál magasabb az ondósejttartalma, míg kisebb testűeknél alacsonyabb[2]. További meghatározó tényező a spermagyűjtés gyakorisága, illetve az állat kora. Gyakori spermagyűjtés során alacsonyabb lesz az ondósejtek száma[13]. Fiatal és idős állatok kevesebb ondósejtet termelnek[12].

2.5. A női nemi traktus reakciója a párzásra és a párzás révén bejutott ondóra

Természetes párosodás során az ejakulációkor spermiumok milliárdjai jutnak a női reproduktív traktusba, majd azonnal elindulnak a petevezető ampulláris szakasza irányába, a termékenyülés helyszínére. Kutya esetén a nagy mennyiségű prosztataváladék miatt a spermiumok a hüvely craniális részébe, illetve a méhbe kerülnek. A spermiumok méhbe jutása után értágulat észlelhető, illetve egy átmeneti gyulladás lép fel a méhben, ami polimorfonukleáris neutrofilek(PMN) beáramlásával jár[15]. A PMN-ek jelenléte csökkenti a spermium és a méh endometriuma között létrejövő kötődést, ezáltal negatívan befolyásolja a termékenyülés valószínűségét, azonban a PMN hatását a prosztataváladék ellensúlyozza. Az átmeneti gyulladás hozzájárul a bakteriális és egyéb szennyeződések, a felesleges ondófolyadék és az elhalt, károsodott spermiumok eltávolításához[16, 17]. Ezt a tisztító funkciót támogatják a méh perisztaltikus összehúzódásai, amellet, hogy segítik az élő ondósejtek feljutását a petesejt(ek)hez[18]. A petevezetőben már csak ezres nagyságrendben vannak jelen a spermiumok, míg a legvégén egyetlen spermium fogja megtermékenyíteni a petesejtet. A spermiumok ez alatt a vándorlás alatt számos szelektációs folyamatnak vannak kitéve, amelyek célja, hogy az elhalt, károsodott ondósejteket kiszűrjék, így csak az életképesek juthassanak tovább. Ennek köszönhetően a termékenyítés helyszínére csak a funkcionálisan normális, legéletképesebb spermiumok fognak eljutni. Az első pont, ahol a spermiumok szűrése megtörténik az a méhnyak, azon fajok esetében, amelyeknél a hüvelybe kerül a sperma (pl. kérődzők, ember) párosodáskor. Kuttyák esetén az első szűrőpont a méh-petevezető átmenetnél van, mivel náluk az ondó közvetlenül a méhbe kerül az ejakuláció során, hasonlóan a lovakhoz, sertésekhez[19]. A károsodott, mozdulatlan spermiumok a nagyon viszkózus nyálkahártya csapdájába esnek, majd folyamatosan a külvilágra ürülnek[20].

2.6. A spermium- szelekció szerepe az asszisztált reprodukció során

A természetes szelekció célja, hogy megfelelő morfológiájú, életképes spermiumok juthassanak el a megtermékenyítés helyére. Ehhez az elhalt, károsodott sejteket ki kell szűrni. Mesterséges, in vitro körülmények között az ondóadagokat előkészítő személy végzi tulajdonképpen a méhnyak szűrő szerepét, mivel kiválogatja a termékenyítésre alkalmatlan hímivarsejteket az ondóból. Mesterséges termékenyítés alkalmával a spermiumok hosszabb ideig érintkeznek az ondóplazmával - hígított sperma esetén-, mint természetes párosodás során.

A mesterséges termékenyítéskor az előbbieken említett természetes szelekciós folyamatok nem tudnak végbe menni, ezért ezeket valamilyen módszerrel helyettesíteni szükséges. A biomimetika olyan eljárások alkalmazását foglalja magába, amelyek egy, a természetben előforduló eseményt hivatottak utánozni. Többféle olyan mechanizmus létezik, amely a női nemiszerv által „alkalmazott” szelekciót utánozni tudja. Ezek vagy a prosztatavádék/ondóplazma eltávolítását segítik elő, vagy bizonyos tulajdonságok alapján szelektálják az ondósejteket.

A prosztatavádék hatásával kapcsolatban ellentmondásos eredményeket mutattak ki: in vitro vizsgálva a spermiumok *motilitása és a morfológiailag normális spermiumok száma is csökkent*, amikor prosztatavádéket alkalmaztak hígításra. Ezzel szemben in vivo vizsgálva a kérdést azt tapasztalták, hogy a prosztatavádék *növelte a termékenység valószínűségét*[2]. Ezt tovább vizsgálva 14 egyedből vettek mintákat, és fagyasztás-felolvasztás után értékelték a spermiumok morfológiáját, motilitását, mozgási sebességét. A morfológiát tekintve nem volt hatással a normális spermiumok százalékos arányára, azonban a motilitás és a lineáris mozgás esetében igen. Az itt kapott adatok azt is bizonyították, hogy az *ondósejtek élettartamát nem hosszabbította meg a prosztatavádékkal való hígítás*. Nöthling és Volkmann[21] azt mutatták ki, hogy *jobb termékenységet eredményez*, ha autológ prosztatavádéket adnak a felolvasztott spermához a termékenyítés során. Egy másik tanulmányban[1] azt bizonyították, hogy a prosztatavádék termékenységre gyakorolt hatása a prostatofolyadék belső hatásának köszönhető és nem annak az eredménye, hogy növeli a sperma térfogatát. Az *ondóplazma tartalmaz kapacitációt gátló anyagokat*, amelyek a túl korai kapacitációt megakadályozzák. Ezért az ondóplazmával történő túl hosszú érintkezés a spermiumok működését negatívan befolyásolhatja. Az ondóplazma azonban tartalmaz olyan komponenseket is, amelyeket a spermiumok szempontjából előnyösnek tartanak, mert elősegítik vagy gátolják a spermiumok működését. Ideértve a motilitást, zona pellucidához való kötődést és penetrációt. Feltételezhető, hogy ezeknek a –főleg előnyös- fehérjéknek az eltávolítása az előállítási folyamatok során lerövidítheti a spermiumok élettartamát[20].

2.7. Centrifugálás

A centrifugálást célszerű elvégezni annak érdekében, hogy a megfelelő spermiumokat elválasszuk az ondóplazmától, prosztatavádéktől, illetve eltávolítsuk a sejtörmeléket, fehérvérsejteket, epithelsejteket, baktériumokat, vírusokat, egyéb károsító anyagokat a spermiumoktól[19, 22]. Ezzel is növelve a mesterséges termékenyítés során alkalmazott sperma

minőségét, és a sikeres fogantatást. Centrifugálás után a spermaminta két részre válik szét. A centrifugacső alján képződik a pellet, amibe a sejtek kerülnek, ennek a tetején pedig a felülúszót találjuk, amibe az ondóplazma, vagy a hígító (ha használtunk) kerül, illetve a centrifugálás sebességétől függően itt is előfordulhat sejt és/vagy sejttörmelék[23].

A centrifugálás különböző sűrűségű folyadékok, szuszpenziók szétválasztására alkalmas módszer. A folyamat során az oldatot egy tengely körül nagy sebességgel forgatják. A szétválasztás a centrifugális erő hatására következik be[24].

A centrifugálás során két mértékegységet kell megemlíteni, ezek a percenkénti fordulatszám (RPM) és a relatív centrifugálási erő (RCF vagy g-erő)[25].

A percenkénti fordulatszám azt mutatja meg, hogy a centrifuga rotorja mennyi fordulatot tesz meg egy perc alatt. A kis sebességű centrifugák 300 fordulat/perc kapacitásúak, míg vannak ultracentrifugák is, ahol az RPM akár 150.000 fordulat/perc is lehet.

A relatív centrifugálási erő (RCF) vagy g-erő a mintára kifejtett erő. Ezt az erőt a rotor forgása hozza létre, és ezt az erőt kifejti a centrifugacsőre[25]. Az RCF a rotor forgásának eredménye, tehát a fordulatszámtól függ.

A centrifugálás folyamata alatt az RCF befolyásolja a mintákat ezért ez fontos, hogy ismert legyen számunkra.

Előfordulhat, hogy bizonyos centrifugák RPM értékre vannak beállítva, ilyenkor egy képlet segítségével átválthatjuk G-erővé: $RCF = 1,1118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$, ahol az r a forgórész sugara [26]. Azonban ennek nehézségét az adja, hogy meg kell határozni a forgórész sugarát. A gyártók három sugárértéket adnak meg általában: minimumot, maximumot és az átlagot. Ezek a centrifugacső alsó, felső és középső részének távolsága a forgórész közepétől. A legtöbb modern centrifuga azonban mindkét mértékegységet képes mérni, ezáltal rendelkezik olyan funkcióval, amely segítségével egyszerűen lehet átváltást végezni a két mértékegység között[26].

2.7.1. Centrifugálási sebességek

Mint azt említettem a centrifugálás előnyös tulajdonságai mellett nem szabad elfelejtenünk a káros hatásairól sem. A megfelelő centrifugálási sebesség kiválasztása meghatározó lehet a spermiumok minőségének szempontjából.

Ugyanis, ha túl alacsony sebességet választunk, akkor nem hat akkora centrifugálási (centripetális) erő a spermiumokra, hogy azok a centrifuga cső alján ülepedni tudjanak. Ekkor több spermium kerül a felülúszóba, megnő a felülúszó sejttartalma. Ez számunkra előnytelen, hiszen a centrifugálás végén ezt elöntjük, így értékes spermiumokat veszíthetünk (csökken a

felhasználható hasznos spermiumok száma). Ez különösen akkor számít, amikor már kiinduláskor is alacsony az ondó spermiumszáma. Azonban az alacsony sebesség előnye, hogy így kisebb mértékben sérülnek az ondósejtek, több ép spermium marad a folyamat végén. Így tehát felmerül a kérdés, hogy többet nyerünk, vagy veszítünk az alacsonyabb sebesség alkalmazásával.

A magasabb sebesség használatánál ellenkező problémákkal állunk szemben. A nagyobb sebesség/erőhatás miatt megemelkedik azoknak a spermiumoknak a száma, amelyek membránja megsérül, viszont a megnövelt sebesség miatt több spermiumot/sejtet fog tartalmazni a centrifuga cső aljában kialakuló zárt pellet. Ez viszont előnyös, mert így a felülúszóval elöntött spermiumok számát minimálisra tudjuk redukálni.

Egy tanulmányban az összehasonlítás érdekében először a friss sperma jellemzőit vizsgálták közvetlenül a gyűjtés után. Ez magába foglalta a mozgékonyt, a térfogat, a koncentráció, élő és elhalt spermiumok aránya, a membrán integritás és az akroszóma állapotának vizsgálatát. A mozgékonyt fáziskontraszt mikroszkóp segítségével értékelték. A koncentrációt Bürker-kamrában határozták meg, vízzel hígítva. Az élő és elhalt spermiumok arányát eozin-nigrozin festéssel vizsgálták. A membránintegritást fluoreszcens SYBR14-propidium-jodid (PI) festési eljárással értékelték. Ennek a technikának a lényege, hogy a propidium-jodid (PI) az elhalt vagy sérült spermiumok DNS-ét vörösre festi meg. Ez alapján három csoportba sorolhatók az ondósejtek: az ép membránintegritásúak, amelyek zöld színre festődnek; a sérült membránnal rendelkező, elhalt spermiumok, amik vörös színt adnak; haldokló spermiumok pedig kettős festődésű képet mutatnak: zöld-narancssárga.

Az akroszóma állapotát FITC-vel konjugált fluoreszcens Pisum Sativum Agglutinin (PSA) alkalmazásával határozták meg. Az ép akroszómával rendelkező spermiumok akroszomális régiója erőteljes zöld festődést adott[26].

Eredményeik megegyeztek a korábban említett feltevésével, miszerint a legalacsonyabb sebesség (180 x g) használatánál volt a legnagyobb arányú (8,9%) az elvesztett spermiumok száma. A centrifugált mintákat 3 napig hűtve tárolták, majd ennek végén vizsgálták meg a spermium minőségi paramétereit. A mozgékonyt és a progresszív motilitás csökkenést mutatott, azonban a különböző sebességek között nem volt érdemi eltérés. A membránintegritás vizsgálatánál az elvárásoknak megfelelően a legnagyobb sebességnél (2880 x g) volt a legmagasabb aránya a sérült membránnal rendelkező ondósejteknek[27].

2.7.2. Centrifugálás hatása a spermiumokra:

A megfelelő centrifugálási sebesség kiválasztása mellett is bekövetkezhetnek károsodások az ondósejtekben. Csökkenhet a *mozgékonyáguk*, romolhat a progresszív motilitásuk. Ezen túlmenően sérülhet a *spermiumok membránja* is, így romlik a membrán integritása. Azonban nem csak maga a fizikai erőbehatás okozhat membránkárosodást, hanem a centrifugálás következményeként *megnövekedett ROS (reaktív oxigéngyökök)* mennyisége is hozzájárulhat a membrán sérüléséhez, azzal hogy serkenti a lipid-peroxidáció végbemenetelét, illetve DNS- és fehérje károsító hatása is van[28]. A termékenység másik fontos jelzője a spermiumok *akroszóma integritása*. A centrifugálás során ez is sérülhet, azonban megfelelő összetételű hígítóval egészítve ki a mintáinkat, a károsodást csökkenthetjük[29]. Egy vizsgálat során azt értékelték, hogy a különböző centrifugálási sebességek esetén fokozottabb volt-e az akroszóma reakció, de ez végül cáfolásra került[27].

2.7.3. A centrifugálás típusai:

A centrifugálásnak több típusát különböztetjük meg. A legegyszerűbb a **natív, vagy direkt centrifugálás**, amely során a gyűjtést követően centrifugálják a mintát, hígító vagy párnázó folyadék hozzáadása nélkül. Ez egy egyszerű módszer a spermiumok elválasztására az ondóplazmától.

Hígító hozzáadásával történő centrifugálást **spermium mosásnak** nevezzük. Ekkor közvetlenül a sperma gyűjtés után a fajnak megfelelő sperma hígítót alkalmazunk, majd ezt a keveréket óvatosan centrifugáljuk, ezzel is mérsékelve az ondósejtek károsodását[19]. Ezekben az esetekben felmerül az a probléma, hogy a centrifuga cső alján maradt pelletben nem csupán élő spermiumok találhatók, hanem károsodott, elhalt ondósejtek is, illetve mikroorganizmusok és egyéb szennyeződések. Ezt tovább fejlesztve kezdték el használni a kolloid centrifugálást.

A **kolloidcentrifugálásnak** két típusát különíthetjük el egymástól; a sűrűséggrádiens centrifugálást (DGC) és az egyrétegű kolloid centrifugálást (SLC). A kolloid centrifugálás során a hígított spermát egy vagy több rétegű kolloidon centrifugálják, miközben elválasztják az ondósejteket az ondóplazmától, továbbá elkülönítik az életképes, mozgékony spermiumokat a többitől. Kezdetben a kolloid centrifugálás a DGC-re korlátozódott, amely során több különböző sűrűségű kolloidréteget alkalmaztak. Ezt az utóbbi években elkezdte felváltani az egy kolloidréteget alkalmazó egyrétegű centrifugálás (SLC)[20].

Egyrétegű kolloid centrifugálás

Dorado és munkatársai (2013) az elsők között voltak, akik az Androcoll-C-n keresztül végzett egyrétegű centrifugálás hatását értékelték. Feltevésük, miszerint a mélyhűtés utáni SLC javítja a spermiumok minőségét kutyák esetén, igazolást nyert. Ugyanis az általuk végzett vizsgálatok eredménye, hogy az SLC-vel előkészített spermiumok motilitása, életképessége, és akroszóma integritása növekedett a kontroll (fagyasztott-felolvasztott) mintához képest[30].

Azt is vizsgálták, hogy a fagyasztás-felolvasztás milyen hatással van az ondósejt DNS fragmentációs indexére (sDFI), illetve, hogy az Androcoll-C-n keresztül végzett SLC javítja-e a spermiumok DNS-ének élettartamát. A spermium minőségének meghatározásakor a motilitás és a membránintegritás fontos paraméter, azonban ezek nem alkalmasak a DNS integritásával kapcsolatos változások kimutatására. A DNS integritás változása szintén egy fontos paraméter lenne a minőség meghatározásában. Embereknél kimutatták, hogy normális spermiummal rendelkező szubfertilis férfiak magas DNS fragmentációs indexet (sDFI) mutattak, ami magyarázatot ad a meddőségükre. Ennek vizsgálatára egy egyszerű módszertanú vizsgálatot alkalmaznak, az ún. Sperm Chromatin Dispersion Test-et (SCDt). Ez egy egyszerű mikrogél tárgylemez alapú vizsgálat. Ma már különböző állatfajok számára kifejlesztett kereskedelmi forgalomba is kapható kitek állnak rendelkezésre. A kísérlet első vizsgálata arra irányult, hogy magának a fagyasztás-felolvasztásnak milyen hatása van a DNS fragmentációs indexére. Az eredmények azt mutatták, hogy a mélyhűtés egyik esetben sem befolyásolta az sDFI értékeket. Ellenben a mozgékonyabb a friss spermában nagyobb volt. A második része a kísérletnek pedig az SLC hatását vizsgálta a fagyasztás-olvasztás után. Az Androcoll-C-vel végzett SLC szelektált spermában alacsonyabb volt a sDFI, mint a nem centrifugált mintákban. Tehát *javította a fagyasztott-olvasztott sperma DNS-élettartamát*[31].

A fagyasztás-felolvasztás utáni spermiumszelekció célja a sperma minőségének javítása azáltal, hogy a károsodott, elhalt ondósejtek nem kerülnek felhasználásra. Ezzel növelve a sikeres fogantatás arányát. Azonban attól függően, hogy a sperma feldolgozás melyik szakaszában történik, különbségek lehetnek az elválasztott spermiumok koncentrációjában. Annak felmérésére, hogy az egyrétegű centrifugálás (SLC) milyen hatással van a spermiumokra egy összehasonlító vizsgálatot végeztek. A gyűjtött ejakulátumot négy részre osztották: az első esetben nem végeztek SLC-t, a második esetben a hűtés előtt, a harmadik esetben pedig a hűtés után végezték el az SLC-t. A negyedik mintát a hűtés előtt és után is centrifugálták. Az ondósejtek motilitását, morfológiáját, membránintegritását és az akroszóma épségét vetették össze. Az egyrétegű centrifugálással végzett spermiumelválasztáshoz használt kolloid egy

glicidoxipropil-trimetoxi-szilánnal bevont szilícium-dioxid kolloid készítmény volt, az ún. Androcoll-C, amelyet kifejezetten kutya ondósejtek számára fejlesztettek ki. A vizsgálat eredményeként azt kapták, hogy *a hűtés után végzett SLC javította a motilitás paramétereit, a nem szelektált, illetve a hűtés előtt végzett SLC-hez képest. A különbség azzal hozható összefüggésbe, hogy a hűtés előtt végzett szelektálás elválasztotta a spermiumokat az ondóplazmától, ezzel pedig olyan hasznos fehérjéket távolított el, amelyek hozzájárultak a hűtés által okozott hidegsokk kivédéséhez. A kettős centrifugálás hasonló eredményt hozott, mint, amit a hűtés előtti centrifugálásnál tapasztaltak. A spermiumok morfológiája és a membránintegritás tekintetében nem volt szignifikáns különbség az alkalmazott módszerek között. Megállapítható, hogy mind a friss sperma, mind a hűtött esetben az Androcoll-C-vel végzett centrifugálás javítja a sperma minőségét*[32].

A centrifugálás során alkalmazott kolloidok szerepe azért fontos, mert nélkülözésük esetén szubletális károsodás következhet be az ondósejtekben, ami a képződő reaktív oxigén gyököknek (ROS) köszönhető. Morrell és társai (2013) kimutatták, hogy *az SLC-szelektált spermában alacsonyabb volt a ROS szintje, mint a nem centrifugált spermában*[33]. Az ondósejtek különösen érzékenyek a ROS károsodással szemben, mert a sejtmembránjuk gazdag többszörösen telítetlen zsírsavban, viszont antioxidáns készletük korlátozott. Ha a ROS termelődés és a ROS semlegesítés között felborul az egyensúly, akkor az oxidatív stressz keletkezéséhez vezet. Ennek következménye pedig lipid peroxidáció, membránintegritás károsodás, DNS károsodás, és a spermium apoptózisa[34]. Ezért kifejezetten szükségük van antioxidánsokra, hogy kiküszöböljék az oxidatív stressz és a lipid peroxidáció káros hatásait[35]. A lipid peroxidáció csökkenését, illetve a spermiumok minőségének változását hűtés előtt Canicollal végzett SLC elvégzése után értékelték. A vizsgálat során bizonyították, hogy *javítja a spermiumok bizonyos paramétereit: növekedett a spermiumok mozgásának sebessége, javult a plazmamembrán integritás, továbbá csökkent az abnormális morfológiájú ondósejtek aránya*[34].

SLC hatása a baktériumok, vírusok mennyiségére

Az ejakulátum, hasonlóan a szervezet egyéb váladékaihoz, nem steril. Olyan fiziológiás mikroflórát tartalmaz, amely az urogenitális traktusból származik. A mikroflórát alkotó baktériumok egyfajta védőhatást fejtenek ki, azáltal, hogy a patogén baktériumok növekedését gátolják. A patogén baktériumokkal való fertőződés fő forrása a húgycső, de további forrás lehet a fityma vagy a prosztatata is. Másodlagos fertőzés előfordulhat abban az esetben, ha

kontaminálódik az ondóminta, ha pl. nem steril eszközökkel végzik a spermagyűjtést, illetve a spermakezelést.

A legnagyobb baktérium koncentráció az első frakcióban észlelhető. A jellegzetes flórát általában az *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Mycoplasma canis*, *Pseudomonas* spp., illetve *Streptococcus* fajok alkotják, amik főleg a húgycsőből származnak. Ha a baktériumok koncentrációja kevesebb, mint 10^5 CFU/ml, akkor fiziológiásnak tekinthető. Azonban, ha ezt meghaladja a mennyiségük, akkor az kockázatos lehet a sperma minőségének fenntartása szempontjából.

A patogén baktériumok ondósejtekre gyakorolt káros hatása különböző folyamatok következtében jelentkezik. Ilyenek pl. a tápanyagokért való versenyzés, extracelluláris faktorok (lipopoliszacharidok, α - és β -hemolizinek, citotoxikus faktorok) szekréciója, amelyek az ondósejtek motilitásának, plazmamembrán integritásának megváltozásához, a DNS károsodásához vezethetnek. Ezek összesége pedig a termékenyítés sikerességének csökkenéséhez vezethet.

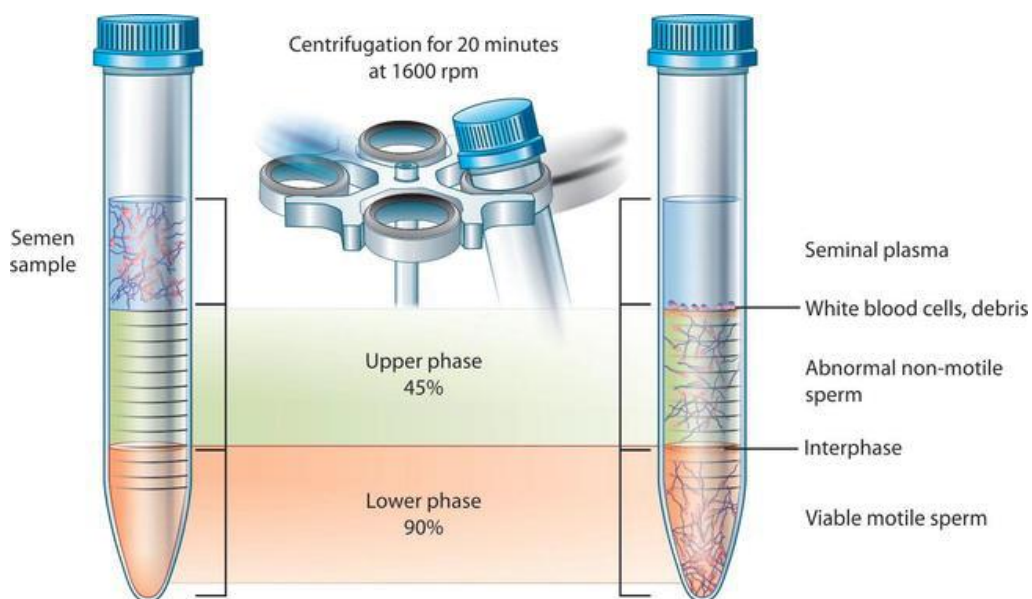
Az ondó előkészítése során a mintákat különböző spermahígítókkal hígítani szükséges. Ezekkel a hígítókkal szemben az egyik elvárás, hogy tartalmazzanak bakteriosztatikus anyagokat, amik gátolják a baktériumok szaporodását. Azonban az antibiotikum rezisztencia terjedésével egyre fontosabbá vált ezen anyagok használatának minimalizálása. A kolloid centrifugálás elsődleges célja az életképes spermiumok elkülönítése, azonban ezzel párhuzamosan a minta mikrobiológiai terheltsége is csökkenthető anélkül, hogy a rezisztencia terjedését segítené. Ezért ez egy jó alternatíva lehet az antibakteriális szerek használatának csökkentésére, esetleg kiváltására. Erre irányuló vizsgálatokat Morrell (2014) végzett, és eredményei azt mutatják, hogy *alacsonyabb volt a baktériumterhelés az SLC centrifugált mintákban, mint azokban, amelyeket nem centrifugáltak*. Ezek az eredmények összhangban vannak Morrell és munkatársai (2011) által korábban végzett vizsgálatok eredményeivel, amelyeket vaddisznó és mén spermáján végeztek [36, 37]. Azt is sikerült kimutatniuk, hogy *a baktériumok szaporodása is csökkent a kolloid centrifugálás után, anélkül, hogy antibiotikumot tartalmazott volna a spermahígító*. A baktériumok növekedését a környezeti tényezők is befolyásolják, mint például a pH, az oxigénkoncentráció, toxinok jelenléte, de különösen a hőmérséklet stb. A baktériumokban végbemenő metabolikus folyamatok hőmérsékletfüggőek. Bizonyos baktériumok akkor is életben maradhatnak, ha a spermát fagyasztották, majd felolvasztották [36]. Egy a vizsgálatban 48 óra elteltével, 4°C-on történő tárolás után, csak enyhén növekedett a baktériumok szaporodása, viszont a spermaminőség romlott. Ennek egyik oka lehet, hogy a baktériumok növelték a ROS termelődését, ezáltal az oxidatív stressz

kiváltását. Jelen vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy lehetséges a baktérium szennyezettség csökkentése antibiotikum használat nélkül. Azonban a hosszabb tárolás, és a különböző tárolási hőmérsékletek hatásait további vizsgálatoknak kell alávetni, hogy ennek rutinszerű alkalmazása elterjedhessen[38].

Habár a hím tenyészállatokat rendszeres szűrővizsgálatoknak vetik alá minden állatfajnál, mégis előfordul, hogy negatív szerológiai vizsgálat mellett is lehetséges vírusok jelenléte a spermában, ezáltal meg van az esély vírus/ok továbbítására. Állatok esetében magasabb lehet a vírusok koncentrációja, mint a humán sperma esetében, abból az okból kifolyólag, hogy a hím állatokat nem kezelik antivirális szerekkel a spermagyűjtés előtt, ellentétben az emberekkel. Azonban a vizsgálatok bebizonyították, hogy az *SLC alkalmazása csökkenti a sperma vírusterhelését is*, anélkül, hogy károsítaná az ondósejteket[23].

Sűrűséggradiens centrifugálás

A kolloid centrifugálás másik típusa a sűrűséggradiens centrifugálás, amelynek lényege, hogy a hímivarsejteket a sűrűségük alapján választják el centrifugálással. Alapja, hogy az életképtelen és az életképes spermiumok sűrűsége eltérő. A morfológiailag normális, érett spermiumok sűrűsége legalább 1,10g/ml. míg a morfológiailag rendellenes, éretlen spermiumok sűrűsége 1,06-1,09g/ml között van. A sűrűséggradiensek lehetnek folytonosak, vagy nem folytonosak. Az előbbi során a sűrűség fokozatosan növekszik a gradiens alja felé[39].



2. ábra Az ábrán a sűrűséggradiens centrifugálás előtti, illetve utáni állapotot láthatjuk.

A jobb oldali kémcsőben jól elkülönülnek a különböző sűrűségű fázisok. (Forrás:

Methods of Sperm Selection for In-Vitro Fertilization[39])

A PureSperm® sűrűséggradiens centrifugálást a *morfológiailag ép, életképes spermiumok kiválasztására tervezték*, ezáltal el is különítik az ondóplazmától azokat. Korábbi feltételezésekkel szemben, amelyek egy homogén populációnak tekintették az ejakulátumot, mára már megállapították, hogy az ejakulátumon belül több spermium-szubpopulációt lehet elkülöníteni. Az elkülönítés alapja a mozgásuk vizsgálata. Az első szubpopulációba sorolt spermiumok alacsony sebességű, gyengén progresszívek voltak és rövid távot tettek meg. A második szubpopulációba kerülő spermiumok mozgása kevésbé volt erőteljes, míg a harmadik szubpopuláció erősen aktív mozgású, de gyenge progresszivitású. A negyedik szubpopulációba erősen progresszív mozgást végző, intenzív mozgású spermiumokat soroltak[40]. A mélyhűtéssel összekapcsolt vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a fagyasztás és felolvasztás után a szubpopulációk arányában változások következnek be. A 3. és a 4. szubpopuláció aránya csökkent, míg ezzel egyidejűleg az 1. és a 2. szubpopuláció aránya növekedett. Azt is megállapították, hogy a nem szelektált (nem végeztek sűrűség gradiens centrifugálást) mintákban az első szubpopuláció volt a domináns, azonban a PureSperm®-en keresztül centrifugált mintákban a negyedik szubpopuláció vált uralkodóvá, azaz az eljárás *kiválogatja a jó motilitású sejteket*.

A fagyasztás a mozgási paraméterekre is hatással volt: a harmadik és negyedik szubpopuláció spermiumainak pályája progresszívebb volt, mint az előtte vizsgált friss spermában.

Egy másik vizsgálatban azt nézték, hogy érdemes lenne-e a PureSperm® centrifugálás után egy mosási/centrifugálási lépést beiktatni. Ennek összehasonlítására a felolvasztás után, a PureSperm® centrifugálás alkalmazása után, illetve a mosás után vizsgálták a spermiumok paramétereit. Eredményül azt kapták, hogy a PureSperm® protokoll *alkalmazása javította az ondósejtek minőségét a motilitás, az életképesség és az akroszóma integritás tekintetében*. Továbbá a sebességük is nagyobb volt, mint azoknak a spermiumoknak, amelyeket nem szelektáltak. A centrifugálás utáni mosással kapcsolatban arra jutottak, hogy csökkentette a mozgékonyt, és káros hatással volt életképességre is. A morfológiailag és minőségileg ép spermiumok arányát csökkentette a mosás alkalmazása. Tehát a mosási lépést nem szükséges, sőt kontraindikált beépíteni a centrifugálás lépései közé. Ezzel a sperma előkészítés során időt, és befektetett energiát spórolhatunk meg[41].

Az emberi spermiumok esetében korábban már beszámoltak a PureSperm® sűrűséggradiens módszer módosításáról, amikor is egy rétegű kolloid centrifugálással kombinálják. Azonban kutyák esetében nem voltak erre irányuló vizsgálatok. Ezért Dorado és munkatársai (2013) megvizsgálták és értékelték, hogy a PureSperm® 80-on keresztüli SLC javítja-e a spermiumok fontos paramétereit. Az eredmények egyértelműen mutatták, hogy ennek a módszernek az

alkalmazása a *fagyasztott-olvasztott kutyasperma* esetén *javítja az általános spermiumminőséget*, a motilitás, az életképesség, morfológia és az akroszóma integritás tekintetében. További vizsgálatok azt is bizonyították, hogy az SLC alkalmazása elősegítette a tojássárgájának eltávolítását a fagyasztott-felolvasztott mintából. Ez jótékony hatást gyakorolt a sperma minőségére[42].

Cushion centrifugálás

A centrifugálás során a spermiumok sérülhetnek, és fennállhat annak a veszélye, hogy több kárt okozunk, mint amennyi hasznot érünk el. Egy kutatás során azt vizsgálták, hogy hagyományos centrifugálás során nagy erőt (1620 x g) alkalmazva nagyobb mértékben károsodtak a spermiumok, azonban amikor csökkentett erőt (720 x g) alkalmaztak, akkor nagyon sok spermium veszett el a felülúszóban, viszont a spermiumok sérülésének valószínűsége mérséklődött[43]. A nagy erőbehatás okozta károsodások mérséklésére ma már egyre elterjedtebb, hogy a centrifugálás során párnázófolyadékot alkalmaznak. Ezek a párnázófolyadékok hozzájárulnak ahhoz, hogy az ép spermiumok száma a lehető legnagyobb legyen, amellett, hogy az ondósejtek sérülését minimalizálja[44]. A legnagyobb spermium visszanyerési arány a centrifugálás időtartamának, vagy a centrifugálási erőnek (sebesség) a növelésével érhető el, ez azonban a spermiumok minőségét károsítja[45].

Amikor először kezdték alkalmazni ezeket a párnázófolyadékokat, akkor az első ilyen céllal felhasznált oldat a glükóz-EDTA volt, majd ezt felváltotta a jodixanol alapú oldat használata[46]. A jodixanol egy nem toxikus, nem ionos, vízben jól oldódó kolloid vegyület[47]. Jodixanolt alkalmazva kutyasperma mélyhűtése során kimutatták, hogy *segített csökkenteni a ROS-terhelést a mintákban*. Azonban figyelembe kell venni, hogy ezek az előnyös tulajdonságok csak megfelelő koncentrációjú jodixanol esetében érvényesülnek. Összehasonlítva a 1,5%-os és a 3%-os jodixanol alkalmazását, azt tapasztalták, hogy a 3%-os csökkentette a spermiumok mozgékonyágát és a károsodott ondósejtek aránya megnövekedett. A 1,5%-os jodixanol esetében nem tapasztalták ezt, ami összhangban van a korábbi megfigyelésekkel. Ezzel megállapításra került, hogy az optimális jodixanol koncentráció a 1,5%[48]. Méneknél *javította a spermiumok visszanyerési arányát*, illetve bikáknál arra az eredményre jutottak, hogy növeli az ondósejtek mozgékonyágát, miközben javítja a sejtmembrán ellenállóképességét a sérülésekkel szemben[47]. A módszer sikeresen alkalmazható volt vaddisznó sperma fagyasztása során is, hiszen alkalmas volt a spermiumok károsodásának kivédésére[49]. Ellentmondásos eredmények születtek azon vizsgálatokban, amikor párnázott és nem párnázott centrifugálást végeztek. Egyesek nem találtak különbséget

a spermium minőségi paraméterei között a két eljárást összehasonlítva. Míg mások jobb progresszív motilitásról, plazmamembrán integritásról számoltak be.

Kutyák esetében kevés rendelkezésre álló vizsgálat van arról, hogy milyen hatással van a spermiumokra a cushion módszer, illetve, hogy érdemes-e beépíteni a fagyasztási protokollba. Winslow és társai (2019) végeztek összehasonlító vizsgálatokat a hagyományos és a párnázott centrifugálás között. Összhangban a lovaknál, illetve a bikáknál tapasztalt eredményekkel, kutyáknál is javította a spermium visszanyerési arányt. Azonban kutyáknál nem figyelhető meg olyan kiemelkedő javulás, mint egyéb állatfajok esetében. Idősebb, vagy gyengébb sperma minőségű kutyáknál hasznos lehet a párnázófolyadékok használata, de a biztos következtetés levonásához további vizsgálatokra van szükség [43].

A párnázott centrifugálás egyik előnye, hogy magasabb centrifugálási erőt (1000 x g), és hosszabb centrifugálási időt (20-25perc) lehet alkalmazni, mint a hagyományos centrifugálási módszereknél[50]. Fontos megemlíteni, hogy a módszer alkalmazása jártasságot és figyelmet igényel, akár csak a többi sperma tisztítási technika, hiszen hibás kivitelezés esetén a spermiumok károsodhatnak, illetve a helytelenül végzett felülúszó leszívásakor értékes spermiumokat veszíthetünk[46]. A felülúszó leszívásának kivitelezését meg lehet könnyíteni, ha átlátszó spermahígítót, vagy színezett cushion-folyadékot alkalmazunk[51]. Ezekkel láthatóvá tehetjük a centrifugacsőben a „folyadékoszlopokat”, hogy mekkora térfogatot kell eltávolítani, így csökkentve az értékes spermiumok elvesztésének valószínűségét, és növelve a spermium-visszanyerési arányt[45].

2.8. Spermahűtés és centrifugálás

Ahhoz, hogy az ondósejtek hosszabb ideig megőrizzeik életképességüket és termékenyítő képességüket megfelelő tárolási körülményt kell biztosítanunk számukra. Szobahőmérsékleten csak rövid ideig képesek életben maradni, ami problémát okoz, ha a spermát nem azonnal és nem helyben szeretnénk felhasználni. Az utóbbi évtizedekben a mesterséges termékenyítés elterjedésével megnőtt az igény az ondó szállítására. Egyszerűbb a szaporítóanyagot szállítani, mint ha az állatokat szállítanánk és költséghatékonyabb is, továbbá a fertőző betegségek terjedését is megelőzhetjük. Ha lelassítjuk a spermiumok anyagcsere folyamatait akkor ennek következtében csökken a káros anyagok képződésének üteme és hosszabb ideig kitartanak az ondósejtek energiatartalékai is, tehát nő a biztonságos tárolás időtartama. Erre alkalmas módszer a hűtés, illetve a mélyhűtés[2]. A hűtött sperma alkalmazásával egyszerűbben kivitelezhető az örökítőanyag transzportja, hiszen nem kellene olyan sajátos berendezések,

mint például a fagyasztott sperma esetében, ezáltal a költségek is alacsonyabbak. A hűtött spermával termékenyített szukák esetében magasabb alomszámok és vemhesülési arányok érhetőek el, szemben a fagyasztott sperma használatával[52]. Kuttyáknál a 4-5°C körüli hőmérséklet, amely optimális a spermiumok hűtve tárolása szempontjából. Ezen a hőmérsékleten akár 4-5 napig is megőrizhetik az életképességüket[53]. Elvégeztek egy olyan vizsgálatot is, amely során 2°C-on történő tárolást vetették össze a 4°C-on történő tárolással. Az alacsonyabb hőmérsékletnél kevesebb mozgékony spermiumot találtak a mintában, illetve magasabb volt a morfológiailag sérült spermiumok aránya[54].

Ahogy azt korábban említettem, a prosztatavádék káros hatással van az ondósejtekre tárolás során. Csökken a túlélésük, mozgásuk, a termékenyítőképességük, mindezek pedig a vemhesülési eredmények csökkenéséhez vezetnek. A spermiumok *alacsony túléléséről, illetve akroszóma integritás megváltozásáról* számoltak be, amikor ondóplazma hozzáadásával végezték a hűtést. Már az első vizsgálati napon alacsonyabb volt a spermiumok mozgékonyasága, és ez tovább romlott a napok elteltével. Azokban a mintákban, ahol prosztatavádékkal végezték a hígítást pH növekedést lehetett mérni. Ez lehet a spermiumok anyagcsere folyamatainak a következménye is, de nem zárható ki az sem, hogy a jelenlévő baktériumok anyagcseréje során termelődött mellékanyagok miatt következett be[55]. Ponglowhapan és munkatársai (2004) a vizsgált sperma mintákat 700 x g-vel centrifugálták 8 percig, majd ezután kerültek hűtésre. A sperma hígításához glükózt és fruktózt használtak, így a kezelt sperma minták elemzésénél kedvező adatokat kaptak. A spermiumok mozgékonyasága és progresszív motilitása javult[4]. Egy másik tanulmányban, ahol a prosztatavádék különböző koncentrációit vizsgálták, az ejakulátumokat 720 x g erővel, 3 percig centrifugálták, majd a keletkezett felülúszót eltávolították. Azt figyelték meg, hogy amikor az ondóplazma 25%-ban van jelen a hűtés során, akkor a spermiumok megőrizték az akroszóma integritásukat és mozgékonyaságukat [56]. Michael és társai (2009) szintén 700 x g erőt alkalmaztak 6 percig a felesleges ondóplazma eltávolítása érdekében[57]. Mások a glutation antioxidáns hatását vizsgálták hűtött spermiumok esetében, ehhez a begyűjtött mintákat 700 x g-vel 7 percig centrifugálták, majd 4°C-on tárolták, azonban ennek az antioxidáns jótékony hatását nem tudták igazolni [58]. Hori és munkatársai azonban csak 650 x g erő alkalmazásával, 5 percig végezték a spermaminták előkészítését[54]. Egy másik kísérlet során hosszabb centrifugálási időt alkalmaztak (15 perc) és nagyobb centrifugálási erőt (800 x g) is [59].

Több munkacsoport vizsgálta az ondóplazma jótékony és hátrányos hatásait a sperma hígítása és tartós tárolása során. Összevetve az elvégzett tanulmányokat elmondható, hogy előnyös a sperma mintákat centrifugálni hűtés előtt, ugyanis a centrifugálás folyamata kevesebb

hátránnyal jár, mint ha a prosztataváladékot nem távolítanánk el. Ahogy az adatokból látható, általában 700 x g-vel centrifugálnak a hűtés előtti minta előkészítés során és 6-7 percnél hosszabb időre nincs szükség.

2.9. Sperma mélyhűtés / fagyasztás és centrifugálás

A spermiumok tartós tárolása mélyhűtéssel valósítható meg. Ezzel a módszerrel tulajdonképpen korlátlan ideig tárolhatjuk az ondósejteket, majd felolvasztásuk után sikeresen alkalmazhatjuk őket mesterséges termékenyítésre. A mélyhűtve tárolás különösen fontos és hasznos nagyértékű tenyészállatok örökítő anyagának tartós megőrzése céljából. A mélyhűtés -196°C -on, a folyékony nitrogén hőmérsékletén történik[2]. Itt is, mint a hűtött sperma esetében is szükség van spermahígítók alkalmazására. A mélyhűtésnél azonban a hígítókat krioprotektív anyaggal kell kiegészíteni, ami a sperma fagyasztásnál a glicerint. A krioprotektáns (glicerint) a jégkristályok által okozott fagyási sérülésektől védi a sejteket.

Ahhoz, hogy az ondóplazma káros hatását kiküszöböljük, a mélyhűtve tárolás előtt is szükséges az ondó centrifugálása. A szemínális plazmának az ondósejtekről való leválasztására irányuló vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a centrifugálás csökkentette a mozgó hímvarsejtek arányát, ugyanakkor a felolvasztás után javult az ondósejtek életképessége, illetve progresszív motilitása[60]. Ugyan ebben a vizsgálatban azt is kimutatták, hogy ez a jótékony hatás a felolvasztás után csak abban az esetben jelentkezett, ha Equex pasztával egészítették ki az ondómintákat. Egy másik tanulmányban azt figyelték meg, hogy akkor érhető el a legjobb eredmény, ha a hűtés előtt végezték a centrifugálást és az ondót CaniPRO Freeze hígítóval hígították[61].

Hermansson és munkatársai (2006) annak vizsgálatára, hogy 2 napig hűtve tárolt spermát lehet-e fagyasztani, anélkül, hogy a felolvasztás után ne legyen jelentős a károsodás, a spermát 700 x g-vel 6 percig centrifugálták, majd hígítóval történő kiegészítés után fagyasztották. A vizsgálat eredményeként azt kapták, hogy romlott a spermiumok mozgékonyasága a fagyasztás során [62]. Nöthling (2005) magasabb centrifugálási erőt és időt alkalmazott a prosztataváladék elkülönítésére (1000 x g és 10 perc). Ezután a felülúszót eltávolították és azt is fagyasztották, hogy a termékenyítés során fel lehessen használni[1]. Schäfer-Somi és munkatársai (2006) a 700 x g-vel történő centrifugálást találták megfelelőnek a prosztataváladék eltávolításához, azonban ők 5 percig végezték, majd ezután hígították és fagyasztották a mintákat. A felolvasztás után *jobb minőséget találtak*, mint abban az esetben amikor nem végezték el a centrifugálást fagyasztás előtt[60]. Hidalgo (2014) szintén a 700 x g erővel történő

centrifugálást alkalmazta 10 percig, majd ezután CaniPRO Freeze médium felhasználásával hígította a mintákat és fagyasztotta. Eredményei összhangban voltak a mások által korábban elért eredményekkel. Az eredmények ismeretében megállapítható, hogy a fagyasztás előtti centrifugálás, illetve az azt követő, krioprotektív anyagot tartalmazó hígító alkalmazása jótékony hatással van a felolvasztás után a spermium életképességére, mozgására, azaz a sperma minőségére[61]. Abban a vizsgálatban, ahol a jodixanol hatását vizsgálták a fagyasztva tárolás alatt, a centrifugálási erő 700 x g volt, az idő pedig 5 perc. A vizsgálat eredményeképpen a 1,5%-os jodixanol fenntartotta a spermiumok mozgékonyosságát[48]. Egy másik kísérletben, a prosztataváladék hatásának vizsgálata során dupla centrifugálást végeztek. Először 700 x g erővel 6 percig, majd egy másik csőbe áthelyezve 1200 x g-vel 6 percig, majd ezután hígították a mintákat, ebben az esetben a felolvasztás után autológ prosztataváladékot adtak a mintákhoz, amelyek így jobb motilitást mutattak, azonban ez egy óra elteltével lecsökkent a Tris-hígítású minták értékére [5].

Hasonlóan a hűtésnél végzett centrifugáláshoz, a fagyasztás során is leggyakrabban a 700 x g erőt alkalmazzák, azonban az időtartam sok esetben itt hosszabb, akár 10 perc is lehet.

2.10. A prosztataváladék szerepe a termékenyítés során

Sokáig az ondóplazma szerepének csupán a spermiumok szállítását tulajdonították, azonban ez a feltételezés ma már nem helytálló. *In vitro* vizsgálatok kimutatták, hogy a prosztataváladék *csökkenti az ondósejtek motilitását*, élettartamát, továbbá az életképes, normál morfológiájú spermiumok arányát a fagyasztás-felolvasztás után. Egyesek szerint a prostatofolyadék nem is szükséges a sikeres termékenyítéshez. Ezt látszik alátámasztani az a vizsgálatot, amelynél a cauda epididymis-ből nyert spermiumokkal termékenyítették a szukát, így az ondósejtek nem kerülhettek érintkezésbe a prostatofolyadékkal. A termékenyítés sikeres volt és a szuka világra hozott egy kölyköt[1]. Ezzel szemben Nöthling és Volkmann (2006) azt figyelték meg, hogy a prostatofolyadék hozzáadása a felolvasztott spermához, vagy a spermiumban gazdag frakciót ezzel bejuttatva a méhbe *növeli és segíti a sikeres termékenyítést*[5, 63]. Ugyanezt a tényt erősítették meg egy másik vizsgálatban, amelyben a pázás során kialakuló méhösszehúzóerőket vizsgálták. Egyértelmű volt, hogy amikor prosztataváladékot alkalmaztak a termékenyítés során, akkor javultak a termékenységi adatok[15]. Ezt erősítette meg Nizanski (2006) is, aki összehasonlította a fagyasztott-felolvasztott spermiumokkal végzett termékenyítést önmagában, és akkor, ha azt prosztataváladékkal egészítette ki.

Magasabb vemhességi arányt sikerült elérni, amikor prosztataaváladékot adott a felolvasztott spermához. A prosztataaváladék minőségét, jótékony hatását az sem befolyásolta, hogy felhasználás előtt fagyasztva tárolták, majd felolvasztás után adták hozzá a spermiumban gazdag frakcióhoz[64]. Azt is összehasonlították, hogy ha a prosztataaváladékot helyettesítő albuminmentes TALP-ot alkalmazzák akkor is ugyanilyen hatást érnek-e el. A TALP fenntartotta a spermiumok mozgékonyágát, azonban az ondósejtek nagy részénél idő előtt serkentette az akroszóma reakció bekövetkeztét. Sirivaidyapong (2005) szerint ez feltehetően a prosztataaváladék azon hatásával van kapcsolatban, ami megakadályozza a progeszteron kötődését a spermium akroszóma régiójához, ezzel elősegítve az akroszóma reakció korábbi bekövetkeztét[1].

Az újabb vizsgálatok adatai jól jelzik, hogy a prosztataaváladék hozzájárul a jobb termékenyüléshez és a magasabb vemhességi arányhoz, és a női reproduktív traktus fontos szabályozójaként is ismert. Kölcsönhatásba lép a női nemi szerv szöveteivel, és ott olyan immunfolyamatokat indít be, amelyek nélkülözhetetlenek a megfelelő embriófejlődéshez, illetve az egészséges utódok világra jöttéhez. Hozzájárul a mikrobiom egyensúlyának fenntartásához, az ovuláció kiváltásához, hatással van az endometrium felkészítésére, az embrió befogadására és a női immunválasz beindítására[65].

Az ondóplazma a női reproduktív traktusba jutva citokinek és kemokinek szintézisét serkenti, ezzel *előidézve egy gyulladós folyamatot*[66]. Ennek a gyulladós folyamatnak a következtében a neutrofil leukociták száma megnövekszik a méh. A neutrofilek, mint az immunrendszer elsődleges védelmi vonala, megpróbálják visszaállítani a méh eredeti mikrobiom egyensúlyát azzal, hogy eltávolítják az ondóplazmával bekerült mikroorganizmusokat, ezzel csökkentve a párázás útján terjedő betegségek kialakulását. Másik fontos szerepük, hogy eltávolítják a károsodott spermiumokat is. Ezt a funkciót támogatják a fokozott méhösszehúzódások és a méhartéria tágulata is[18]. A makrofágok és dendritikus sejtek enzimek kiválasztásával támogatják az endometrium szövetének átalakulását, hogy az képes legyen az embrió befogadására. Az ondóplazma méhre gyakorolt hatása mellett hatással van a petefészerekre is, annak működésére, és részt vesz *az ovuláció indukálásában*. Rágcsálóknál sikerült kimutatni, hogy az ondóaváladékban található relaxinnak ovuláció stimuláló hatása van, azáltal, hogy egy kötőszöveti átalakulást okoz a tüszőfalában[65].

Egerek esetében összefüggést véltek felfedezni az ondóaváladék és az utódokban jelentkező különböző anyagcserezavarok között. Olyan egerek esetében, ahol a párázás során nem volt prosztataaváladék, ott az *utódokban magas vérnyomást, elhízást és különböző egyéb anyagcsere betegségeket észleltek*. Az ondóaváladék hatására az anyai szövetekben bekövetkező

immunológiai változások elengedhetetlenek az egészséges embrió fejlődéséhez. Olyan hím egereknél, ahol sebészileg eltávolították az ondóhólyagot már a korai fejlődési szakaszban abnormális magzatok fejlődtek, illetve megszületésük után bizonyítottan magasabb volt az elhízott egyedek aránya[67]. Az anyai immunrendszer a termékenyítéskor találkozik először az apai eredetű antigénekkal, ezek hatására az anyai immunválasz gyengül, ezzel hozzájárulva az *immuntolerancia kialakulásához*, ami alapvető feltétele a sikeres fogantatásnak[65]. Az anyai immuntolerancia kialakulásában fontos szerepe van az immunszuppresszív Treg-sejteknek. Ezek mennyisége a korai terhesség során megnövekszik, és elnyomják az anyai immunitást az apai antigénekkal szemben. Ezen Treg-sejtek indukálásához pedig az ondóváladékban található apai antigének és citokinek szükségesek. Emberek, sertések, és rágcsálók ondóváladéka többek között TGF- β -t, interferonokat és prosztaglandin E2-t tartalmaz. Ezek a molekulák azok, amelyek befolyásolják a citokinek és kemokinek szintézisét, ezáltal az átmeneti gyulladás kialakulását. Mára már ismertté vált, hogy a *méhben belül történő elváltozások, zavarok hatással lehetnek a megszületendő utódokra* is, gyakrabban fordulnak elő felnőttkori megbetegedések, anyagcsere-zavarok. Szoros összefüggés van az alacsony születési súly és az utódokban jelentkező magas vérnyomás, elhízás, cukorbetegség kialakulása között[66]. Az anyai táplálkozás is nagy hatással van az utódokra, hiszen az anyában bekövetkező metabolikus változások hatással lesznek a megszületett utódok anyagcseréjére is. *Azonban nem csak az anyai szervezet van hatással az utódokra, hanem az apai szervezet is*. Magas zsírtartalmú táplálékon nevelt hím patkányok esetében az utódokban inzulinrezisztenciát állapítottak meg[68]. Az inzulinrezisztencia embereknél a II-es típusú cukorbetegség egyik előrejelző paramétere.

Azt is szükséges megemlíteni, hogy az ondóplazma az immunrendszert befolyásoló hatása által növelheti a fogékonyságot bizonyos nemű úton terjedő betegségekre. Ez nem csak emberek esetén fontos, hanem haszon-, illetve társállatok esetében is[65].

Összefoglalva megállapítható, hogy a prosztataváladék hozzáadása ugyan csökkentheti a spermiumok motilitását/mozgékonyosságát, azonban több okra visszavezethető módon jelenléte jobb termékenységet, magasabb vemhességi arányokat eredményezett.

3. Módszer

A szakdolgozatom megírásához szükséges forrásokat a ScienceDirect, PubMed, illetve a Wiley Online Library adatbázisában kerestem. Az online adatbázisokon kívül a témában elismert szakkönyveket is felhasználtam. Igyekeztem a lehető legrészletesebb áttekintést végezni, annak érdekében, hogy egy átfogó képet kapjak a kutyák spermafeldolgozásának módszereiről, az ondóplazma, illetve a prosztataváladék hatásairól. Az adatbázisokban az alábbi kulcsszavak alkalmazásával kezdtem a keresést: „semen collection in dogs”, „chilled dog semen”, „homologous prostatic fluid”. A találatokat egyesítettem, ezután pedig elvégeztem a duplumszűrést annak érdekében, hogy azonos tartalmú cikkek csak egyszer szerepeljenek.

4. Eredmények

A kapott találatok 1993 és 2023 közöttiek voltak. A többség a 2000-es évek eleji, illetve a 2010-es évek publikációi. Ezen cikkek szinte mindegyike angol nyelven íródott. A „chilled dog semen” keresőszóra 644 hivatkozást, a „homologous prostatic fluid” kereső kifejezésre pedig 5897 találatot kaptam, amelyet ezután tovább szűkítettem kutyákra, szarvasmarhára és lóra vonatkozóan.

Végül 68 forrást használtam fel dolgozatom megírásához.

5. Következtetések

Dolgozatom írása során igyekeztem összegezni a témában megjelent cikkeket, és elemezni az azokban leírt tanulmányokat a sperma feldolgozás folyamatának egyik lépésére, a centrifugálásra fókuszálva. Az olvasott források alapján megállapítható, hogy ha a spermát hosszútávon tárolni szeretnénk, akkor a prosztataaváladéktól el kell különíteni. Ezt centrifugálással lehetséges kivitelezni. A kapott spermiumpelletet és a prosztataaváladékot tartalmazó felülúszót külön kell hűteni, illetve mélyhűteni. Ha a gyűjtött spermát centrifugálás nélkül, hűtve vagy fagyasztva tárolnánk, akkor a prosztataaváladék károsítaná az ondósejteket, ezzel pedig csökkenne a termékenyítőképesége a mintának. Azonban számos, kuttyákat is vizsgáló publikáció szerint a termékenyítés során fontos szerepe van a prosztataaváladéknak, hiszen a női szervezetben olyan immunológiai folyamatokat indít be, amelyek nagyban hozzájárulnak a sikeres vemhesség eléréséhez. Rágcsálókban végzett vizsgálatok azt is bizonyították, hogy az utódok későbbi anyagcsere rendellenességeinek kialakulásában szerepe lehet a prosztataaváladék hiányának.

Az anyagcsere betegségek és az ondóaváladék kapcsolata közötti vizsgálatok többnyire rágcsálókban és emberekben vannak. Ehhez hasonló vizsgálatokról kuttyákban még nem jelent meg publikáció, így ezt érdemes lenne tanulmányozni. A vizsgálatok kideríthetnék, hogy ha a termékenyítést prosztataaváladék hozzáadásával, vagy a nélkül végezzük, akkor milyen arányban fordul elő felnőttkori anyagcserebetegség, esetleg elhízás az utódok között.

6. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedekben a mesterséges termékenyítés egyre elterjedtebbé vált a társállatok esetében is. A haszonállatok tenyésztésében az 1950-es évektől gyorsult fel a mesterséges termékenyítés alkalmazása, elsősorban a szarvasmarha-tenyésztésben, majd később a juh- és sertés-tenyésztésben. Lóban ma még kevés kancát inszeminálnak, de évről – évre nő a számuk. A mesterséges termékenyítés révén egyszerűbbé válik a szaporítóanyag szállítása, és kiterjedtebb felhasználást tesz lehetővé. Ahhoz, hogy a sperma megőrizhesse a minőségét a tárolás alatt megfelelő technikákat alkalmazva fel kell készíteni a tartós tárolásra. Ez történhet hűtéssel, illetve fagyasztással / mélyhűtéssel. A sperma feldolgozási protokoll egyik meghatározó lépése a gyűjtött sperma centrifugálása.

A centrifugálás célja, hogy eltávolításra kerüljenek az elhalt spermiumok, a nem kívánatos kórokozók, illetve a prosztataváladék is, amely bizonyítottan káros hatással van a spermiumokra hűtve tárolás esetén. A centrifugálást többféle módszerrel lehet végezni, ezek különböző előnyökkel, illetve hátrányokkal járhatnak. A legegyszerűbb módja a natív centrifugálás, amikor hígítófolyadék nélkül végzik a centrifugálást. Spermium mosásnak nevezzük azt a módszert, amely során már hígítófolyadékot is adunk a mintákhoz. A továbbfejlesztett módszer a kolloid centrifugálás, amikor a centrifugálást egy- vagy többretegű kolloidon keresztül végzik. Ezzel hozzájárulva a spermiumkárosodás minél nagyobb mértékű csökkentéséhez. A kolloid centrifugálás előnyeikhez sorolandó, hogy csökkenti a minták baktérium, illetve vírusterhelését is. Továbbá csökkenti a reaktív oxigénradikálok felhalmozódását is. Egy másik módszer a cushion centrifugálás, amely során párnázófolyadékot adnak a mintákhoz. Ez a módszer inkább haszonállatok körében terjedt el, ugyanis az ő esetükben nagyobb erővel, és hosszabb ideig történik a centrifugálás, mivel náluk többféle járulékos nemi mirigy termel váladékot, nem csak a prosztata, mint a kutyák esetében.

Bizonyos tanulmányok ellentmondásosak abban a tekintetben, hogy a hűtés során valóban szükséges lépés a centrifugálás, vagy elhagyható. Azonban az ilyen irányú vizsgálatok nagy részénél arra jutottak, hogy a hűtve tárolás során a nem centrifugált mintákban a spermiumok károsodása nagyobb volt. Így a hűtés előtt elvégzett centrifugálásra szükség van a sperma feldolgozása során. Azonban a mesterséges termékenyítésnél a centrifugálással különválasztott prosztataváladék felhasználása kifejezetten előnyös lehet. Jobb termékenyülési adatokat értek el, amikor a spermát prosztataváladékkal mosták (juttatták) be a női nemi traktusba. Ez a prosztataváladék azon hatásával magyarázható, hogy bekerülve a női szervezetbe olyan immunológiai és gyulladási folyamatokat indít be, amelyek szükségesek lehetnek a

termékenyülés és az egészséges utódok létrejöttének szempontjából. Egerekben vizsgálták, hogy az ondóváladék hiánya a termékenyítés során az utódokban jelentkező anyagcsere betegségekkel, illetve az elhízással összefüggésbe hozható. Társállataink, így a kutya esetében is egyre gyakoribbak az anyagcsere betegségek, így érdemes lenne ezen összefüggéseket kutyában is vizsgálni.

7. Summary

In the past decades, artificial insemination has become more and more widespread in case of the small animal veterinary practice. In the farm animal breeding, the use of artificial insemination accelerated from the years of 1950, first of all, in the cattle breeding, then in the sheep and pig breeding. Nowadays only a small number of mare is inseminated, but their numbers continuously increase year by year. Artificial insemination makes easier the transport of the genetic material and the widespread use of the semen. In order to maintain the quality of the stored sperm, correct preservation procedure must be used. Long term storage can be done by cooling (5°C) or cryopreservation (freezing at -196°C). One defining step of the sperm processing protocol is the centrifugation of the collected semen.

The purpose of centrifugation is to remove dead spermatozoon, unwanted pathogens, and also the prostatic fluid. Latter has been proven to have harmful effect on spermatozoa during storage at 5°C or in frozen state. Centrifugation can be performed using several methods, which may have different advantages and disadvantages. The simplest method is native centrifugation, in this case centrifugation is performed without any diluents. Sperm washing is a method in which we add diluent / extender to the samples. Colloid centrifugation is an improved method where the centrifugation is carried out through a single or multilayered colloids. This contributes to reducing sperm damage as much as possible. One of the advantages of colloid centrifugation is to reduce the bacterial and viral load of the samples. It also reduces ROS accumulation. Another method is cushion centrifugation, in which a cushion medium is added to the samples. This method is more common among farm animals, because in their case the centrifugation must be done with greater force and for a longer time.

Some conflicting studies were published in connection with whether centrifugation is a really necessary step during cooling and freezing or can be omitted. However, the majority of studies agree in that the sperm damage is considerable in non-centrifuged samples during storage at 5°C or frozen state.

Therefore, centrifugation performed before cooling / cryopreservation is necessary during the processing of the sperm. However, the use of removed prostate secretion is particularly beneficial for fertilization. Better fertility data were obtained when prostatic fluid was used as a flushing medium in artificial insemination. This can be explained by the effect of the prostatic secretion, which, once it enters the female body, initiates immunological and inflammatory processes, which are important steps in the creation of healthy offspring. It was investigated in mice that its absence during fertilization can be associated with metabolic diseases and obesity

in the offspring. Metabolic diseases are becoming more and more common in our small animals, including dogs, so it would be worthwhile to investigate these relationships in dogs as well.

Irodalomjegyzék

1. Nöthling JO, Shuttleworth R, de Haas K, Thompson PN (2005) Homologous prostatic fluid added to frozen–thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology* 64:975–991. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.01.002>
2. Cseh S (2020) Állatorvosi andrológia. Állatorvostudományi Egyetem, Budapest
3. Díaz R, Inostroza K, Risopatrón J, Sanchez R, Sepúlveda N (2014) Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia* 46:194–197. <https://doi.org/10.1111/and.12070>
4. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C (2004) Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62:1498–1517. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.02.014>
5. Rota A, Milani C, Romagnoli S (2007) Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology* 67:520–525. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.001>
6. Saengsoi W, Shia W-Y, Shyu C-L, Wu J-T, Warinrak C, Lee W-M, Cheng F-P (2011) Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. *Animal Reproduction Science* 127:114–119. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.004>
7. Aquino-Cortez A, Pinheiro BQ, Lima DBC, Silva HVR, Mota-Filho AC, Martins JAM, Rodriguez-Villamil P, Moura AA, Silva LDM (2017) Proteomic characterization of canine seminal plasma. *Theriogenology* 95:178–186. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.016>
8. Kikuchi M, Mizoroki S, Kubo T, Ohiwa Y, Kubota M, Yamada N, Orino K, Ohnami Y, Watanabe K (2003) Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. *J Vet Med Sci* 65:679–684. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.679>
9. Umbach A-K, Failing K, Goericke-Pesch S, Wehrend A (2019) Concentrations of minerals in the canine prostatic fluid. *Reproduction in Domestic Animals* 54:1064–1068. <https://doi.org/10.1111/rda.13467>
10. (2010) Canine semen collection and evaluation (Proceedings). In: DVM 360. <https://www.dvm360.com/view/canine-semen-collection-and-evaluation-proceedings>. Accessed 1 Jul 2023
11. Kutzler MA (2005) Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64:747–754. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.023>
12. Freshman JL (2002) Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 17:104–107. <https://doi.org/10.1053/svms.2002.34326>
13. Root Kustritz MV (2007) The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology* 68:329–337. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.017>

14. Kolster KA (2018) Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 48:533–545. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.003>
15. England G, Moxon R, Freeman S (2012) Stimulation of Mating-Induced Uterine Contractions in the Bitch and Their Modification and Enhancement of Fertility by Prostatic Fluid. *Reproduction in Domestic Animals* 47:1–5. <https://doi.org/10.1111/rda.12019>
16. England GCW, Rijsselaere T, Campbell A, Moxon R, Freeman SL (2021) Normal and abnormal response to sperm deposition in female dogs: A review and new hypotheses for endometritis. *Theriogenology* 159:176–183. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.013>
17. England GCW, Moxon R, Freeman SL (2012) Delayed uterine fluid clearance and reduced uterine perfusion in bitches with endometrial hyperplasia and clinical management with postmating antibiotic. *Theriogenology* 78:1611–1617. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.009>
18. England GCW, Russo M, Freeman SL (2013) The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. *The Veterinary Journal* 195:179–184. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.027>
19. Morrell J, Rodriguez-Martinez H (2008) Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: A review. *Open Andrology Journal* 1:
20. Morrell JM, Rodriguez-Martinez H (2010) Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International* 2011:e894767. <https://doi.org/10.4061/2011/894767>
21. Nöthling JO, Volkmann DH (1993) Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J Reprod Fertil Suppl* 47:329–333
22. Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R (2017) Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology* 17:126–132. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002>
23. Morrell J (2016) Colloids: Applications in Sperm Preparation for Assisted Reproduction. In: *Advances in Colloid Science*. IntechOpen
24. Stephenson FH (2016) Chapter 12 - Centrifugation. In: Stephenson FH (ed) *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition)*. Academic Press, Boston, pp 431–438
25. Differences Between RCF & RPM in Centrifugation. <https://www.westlab.com/blog/difference-between-rcf-and-rpm-in-centrifugation>. Accessed 5 Jul 2023
26. RPM and G-Force: Which Is More Important and Why? | Blog | LabCentrifuges.net. <https://labcentrifuges.net/blogs/blog/rpm-and-g-force-which-is-more-important-and-why>. Accessed 5 Jul 2023

27. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A (2002) Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57:1669–1681. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00663-5)
28. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis Ph, Ververidis HN, Boscos CM (2008) Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology* 70:827–835. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.043>
29. Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B (2000) Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53:789–802. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00274-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00274-5)
30. Dorado J, Gálvez MJ, Morrell JM, Alcaráz L, Hidalgo M (2013) Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 80:955–962. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.027>
31. Urbano M, Dorado J, Ortiz I, Morrell JM, Demyda-Peyrás S, Gálvez MJ, Alcaraz L, Ramírez L, Hidalgo M (2013) Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science* 143:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.005>
32. Gálvez MJ, Ortiz I, Hidalgo M, Morrell JM, Dorado J (2015) Should single layer centrifugation of dog semen be done before or after the semen is cooled? *Veterinary Record* 176:359–359. <https://doi.org/10.1136/vr.102806>
33. Morrell JM, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A (2013) Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science* 140:62–69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.006>
34. Domain G, Ali Hassan H, Wydooghe E, Bogado Pascottini O, Johannisson A, Morrell JM, Nizański W, Van Soom A (2022) Influence of Single Layer Centrifugation with Canicoll on Semen Freezability in Dogs. *Animals* 12:714. <https://doi.org/10.3390/ani12060714>
35. Setyawan EMN, Kim MJ, Oh HJ, Kim GA, Jo YK, Lee SH, Choi YB, Lee BC (2016) Spermine reduces reactive oxygen species levels and decreases cryocapacitation in canine sperm cryopreservation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479:927–932. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.091>
36. Morrell JM, Klein C, Lundeheim N, Erol E, Troedsson MHT (2014) Removal of bacteria from stallion semen by colloid centrifugation. *Animal Reproduction Science* 145:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.005>
37. Morrell JM, Wallgren M (2011) Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. *Animal Reproduction Science* 123:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.11.005>
38. Luño V, González N, Martínez F, Revert A, Morrell JM, Gil L (2020) Colloid centrifugation reduces bacterial load in chilled dog semen. *Animal Reproduction Science* 219:106539. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106539>

39. Nanna A (2021) Methods of Sperm Selection for In-Vitro Fertilization. In: Male Reproductive Anatomy. IntechOpen
40. Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M (2011) Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Animal Reproduction Science* 125:211–218. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.013>
41. Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Demyda S, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M (2011) Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 76:381–385. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.026>
42. Dorado J, Alcaraz L, Gálvez MJ, Acha D, Ortiz I, Urbano M, Hidalgo M (2013) Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Animal Reproduction Science* 140:232–240. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.012>
43. Winslow C, Lyman C, Hayden S, Cohen J, Taylor J, Holyoak GR (2019) Cushioned centrifugation improves recovery rate and viability of canine sperm. *Clinical Theriogenology* 11:127–130
44. Bliss SB, Voge JL, Hayden SS, Teague SR, Brinsko SP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD (2012) The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *Theriogenology* 77:1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.031>
45. Waite JA, Love CC, Brinsko SP, Teague SR, Salazar JL, Mancill SS, Varner DD (2008) Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. *Theriogenology* 70:704–714. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.047>
46. Len JA, Beehan DP, Lyle SK, Eilts BE (2013) Cushioned versus noncushioned centrifugation: Sperm recovery rate and integrity. *Theriogenology* 80:648–653. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.009>
47. Pavin CUM, Leivas FG, Santos FW, Missio D, Mesquita FS, Brum D dos S (2020) Cushioned centrifugation during sperm selection increases the fertilization and cleavage rates of cattle embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science* 219:106508. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106508>
48. Abdillah DA, Setyawan EMN, Oh HJ, Ra K, Lee SH, Kim MJ, Lee BC (2019) Iodixanol supplementation during sperm cryopreservation improves protamine level and reduces reactive oxygen species of canine sperm. *Journal of Veterinary Science* 20:79–86. <https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.1.79>
49. Matás C, Decuadro G, Martínez-Miró S, Gadea J (2007) Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology* 67:1087–1091. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.11.010>
50. Roach J, Schnobrich M, Ellerbrock R, Feijo L, Bradecamp E, Alvarenga MA, Kline K, Canisso I (2016) Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on

longevity and morphology of cooled-stored equine semen. *Veterinary Record* 178:241–241. <https://doi.org/10.1136/vr.103607>

51. Botu Red Cushion [red] - \$76.00 : Breeder's Choice, Your Source For Quality Breeding Equipment & Supplies for the Equine Industry. https://www.breederschoiceonline.com/index.php?main_page=product_info&products_id=459. Accessed 7 Oct 2023

52. Rodenas C, Parrilla I, Roca J, Martinez EA, Lucas X (2014) Quality of chilled and cold-stored (5 °C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates. *Theriogenology* 82:621–626. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.022>

53. Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M (2005) Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64:720–733. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.035>

54. HORI T, YOSHIKUNI R, KOBAYASHI M, KAWAKAMIE (2014) Effects of Storage Temperature and Semen Extender on Stored Canine Semen. *J Vet Med Sci* 76:259–263. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0303>

55. Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C (1995) Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44:885–900. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00278-G](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00278-G)

56. Pan C, Wu Y, Yang Q, Ye J (2023) Effects of seminal plasma concentration on sperm motility and plasma and acrosome membrane integrity in chilled canine spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.24425/119031>

57. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscós CM (2009) Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 112:119–135. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.007>

58. Andersen AH, Thinnesen M, Failing K, Goericke-Pesch S (2018) Effect of reduced glutathione (GSH) supplementation to Tris-egg yolk extender on chilled semen variables of dogs. *Animal Reproduction Science* 198:145–153. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.013>

59. Araujo MS, De Oliveira Henriques Paulo OL, Paulini F, De Souza Ramos Angrimani D, Tsunemi MH, De Paula Freitas Dell'Aqua C, Papa FO, De Souza FF (2022) Seminal Plasma Does Not Influence Canine Semen Stored at 5°C for Long-Term Conservation. *Biopreservation and Biobanking* 20:149–162. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0054>

60. Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C (2006) Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.022>

61. Hidalgo M, Portero JM, Demyda-Peyrás S, Ortiz I, Dorado J (2014) Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. *Veterinary Record* 175:20–20. <https://doi.org/10.1136/vr.102010>

62. Hermansson U, Linde Forsberg C (2006) Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65:584–593. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.004>
63. Farstad W (1996) Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science* 42:251–260. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01483-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01483-2)
64. Nizański W (2006) Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66:470–483. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.001>
65. Schjenken JE, Robertson SA (2020) The Female Response to Seminal Fluid. *Physiological Reviews* 100:1077–1117. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2018>
66. Bromfield JJ (2014) Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* 31:627–636. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0243-y>
67. Bromfield JJ, Schjenken JE, Chin PY, Care AS, Jasper MJ, Robertson SA (2014) Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:2200–2205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305609111>
68. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, Persaud SJ, Jones PM, Petrie L, Hanson MA, Poston L (2005) Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 288:R134–R139. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00355.2004>

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Bacsa Mónikának és Dr. Cseh Sándornak a szakdolgozatom megírásában nyújtott segítségükért és türelmükért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Rátky Józsefnek, a Szülészeti Tanszék és Haszonállatgyógyászati Klinika vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy a szakdolgozatomat ezen a tanszéken készítsem el.