Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Biotechnologické metody využívané v reprodukci fen

Bakalářská práce

Autor práce: Marta Hrubá

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Biotechnologické metody využívané v reprodukci fen" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4. 2014 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za jeho odborné rady, cenné připomínky a odborné vedení při vypracovávání bakalářské práce. Dále také děkuji své rodině za psychickou a morální podporu.

Biotechnologické metody využívané v reprodukci fen

Souhrn

Cílem bakalářské práce bylo ucelit poznatky o biotechnologiích, které jsou využívány v reprodukci fen. Pes je v dnešní společnosti čím dál tím více oblíbenějším a nejčastěji chovaným zájmovým zvířetem. Pokud se nám nedaří získat štěňata přirozenou cestou, nastupují na řadu biotechnologie, které přírodě mohou pomoci. V obecné části práce je popsána anatomie pohlavního aparátu feny, jelikož je oproti jiným domestikovaným druhům zvířat velmi specifická. Dále je popsána ovariální aktivita, estrální cyklus a hormonální regulace estrálního cyklu.

V každé z popsaných metod jsou informace z hlediska historie a pokroků v dané metodě, k čemu jsou metody vhodné nebo naopak nevhodné a proč má smysl tu či onu metodu dále prozkoumávat.

Metoda *in vitro* maturace popisuje odebírání nezralých oocytů z vaječníků. Oocyty uměle dozrávají v laboratorních podmínkách a poté jsou oplodněny. Embryo transfer umožňuje produkci geneticky specifických jedinců. Metody *in vitro* fertilizace; tato technika je využívána v různých reprodukčních biotechnologiích, např. klonování a zakládání embryonálních kmenových buněk. Klonování (SCTN = somatic cell nuclear transfer) je metoda při které vzniká nový geneticky stejný jedinec, což může být využito především ve vědeckých výzkumech pro studium humánních onemocnění. Endoskopická nitroděložní inseminace je metoda sloužící k umělému oplodnění, které má vysokou pravděpodobnost oplození. Umělá inseminace je další metodou sloužící k umělému oplodnění a to zejména (ro)zmraženým nebo čerstvým spermatem; dále se dělí na metodu chirurgickou a na metodu neinvazivní. Vaginální cytologie slouží ke sledování fází cyklu a dále napomáhá upřesnit průběh fází cyklu feny. Progesteronový test nám pomáhá předpovídat období ovulace a naplánovat nakrytí, či umělé oplodnění s předstihem. USG a RTG jsou metody, které slouží k neinvazivnímu sledování zdravotního stavu a USG pak najde uplatnění v diagnostice březosti.

Klíčová slova: fena, inseminace, embryo transfer, in vitro fertilizace, ultrasonografie

Biotechnological methods used in reproduction of bitch

Summary

The purpose of this bachelors thesis was to summarize the knowledge about biotechnologies, which are used in the reproduction of bitches. Dogs are more and more popular in today's society and the most common companion animal. If you aren't able to get puppies through normal ways, then come the biotechnologies, which can help nature. The bitches sexual apparatus is in the general part of the thesis, because it is very specific opposed to other domesticated animals. Then the ovarian activity is explained, estrous cycle and hormonal regulation of the estral cycle.

In every explained method there is information from the history of progress in the method, what the methods are suitable or unsuitable for and the reason to further explore this method.

Method *in vitro* maturation explains the removal of immature oocytes from the ovary. Oocytes artificially ripen in laboratory conditions and are then fertilized. The embryo transfer allows the production of genetically specific individuals. Methods of *in vitro* fertilization, these techniques are used in varied reproductive biotechnologies, for example cloning and founding base embryonic stem cells. Cloning (SCTN = somatic cell nuclear transfer) is a method in which a new identical genetic individual is created, which can be used especially for scientific research in human illness. Endoscopic intrauterine insemination is a method used for artificial fertilization, it has a high probability of success. Artificial insemination is another method used for artificial fertilization especially with defrosted or fresh sperm, furthermore it is divided into surgical and non-invasive. Vaginal cytology is used for the observation of phase cycle and furthermore helps to determine the cycle phase of a bitch. Progesterone test helps to prognosticate the ovulation period and to schedule mating or artificial fertilization in advance. USG and RTG are methods, which are used for non-invasive health monitoring and USG finds its application in the diagnosing of pregnancy.

Keywords: bitch, insemination, embryo transfer, in vitro fertilization, ultrasonography

Obsah

1 Úvod 1

2 Cíl práce 2

3 Anatomie pohlavního ústrojí feny 3

3.1 Vaječník (ovarium) 3

3.2 Vejcovod (tuba uterina) 4

3.3 Děloha (uterus) 5

3.4 Pochva (vagina) 6

3.5 Poševní předsíň (vestibulum vaginae) 6

3.6 Vulva a klitoris 7

4 Ovariální aktivita a růst folikulů 9

4.1 Primordiální zárodečné buňky a oogonie 9

4.2 Primordiální folikuly 9

4.3 Primární folikul 10

4.4 Sekundární folikul 10

4.5 Terciární (preovulační, Graafův) folikul 10

5 Estrální cyklus 14

5.1 Proestrus – počátek říje 14

5.2 Estrus – vlastní říje 14

5.3 Metestrus (diestrus) – luteální fáze 15

5.4 Anestrus – klidové fáze 15

5.5 Hormonální regulace estrálního cyklu 16

6 Historie využití biotechnologií u psa domácího 19

7 Biotechnologické metody v reprodukci fen 20

7.1 In vitro maturace (IVM) 20

7.2 Transfer jader somatických buněk (SCNT) 21

7.3 Endoskopická nitroděložní inseminace 22

7.4 Vaginální cytologie 24

7.5 Progesteronový test 25

7.6 Umělá inseminace 26

7.6.1 Vaginální umělá inseminace 27
7.6.2 Nitroděložní inseminace za pomoci chirurgického zákroku 28
7.7 Embryo transfer a metody in vitro fertilizace (IVF) 28
7.8 USG a RTG diagnostika březosti 29
8 Závěr 32
9 Seznam literatury 33

1 Úvod

Běžná fena je plodná přibližně 14 dní v roce a to pouze za předpokladu, že má estrální cyklus každých 5 až 7 měsíců (Grundy, 2002), což je pro chovatele velmi krátké období v případě, je - li zájem o štěňata.

V reprodukci fen může být problém rozpoznat přicházející ovulaci a tím tedy dobu vhodnou k páření. Někdy fena může odmítat plemenného samce anebo nemá zájem o kopulaci. Mezi další faktory, které stěžují chovatelům reprodukci, patří např. příliš velká vzdálenost, zranění nebo špatný zdravotní stav feny, vaginální zúžení nebo nevhodné chování. V těchto případech komplikované reprodukce lze využít různé biotechnologické metody.

Tyto metody najdou své uplatnění nejen u zájmových chovatelů, ale i v chovech psů, jejichž potomci mají být zařazeni do speciálního výciku, např. rozšíření skupiny elitních psů, což mohou být záchranní psi, psi na vyhledávání drog, výcvik psů pro nevidomé a neslyšící. Dále lze těchto metod využít při ochraně ohrožených druhů psovitých šelem.

2 Cíl práce

Cílem této práce je sepsat literární rešerši o nejnovějších poznatcích z oblasti využívaných biotechnologických metod v reprodukci fen.

3 Anatomie pohlavního ústrojí feny

Samičí pohlavní orgány se rozdělují na orgány sloužící k tvorbě zárodečných buněk a na orgány pro jejich uchovávání (Köning a Liebich, 2002). Pohlavní orgány samice mají zodpovědnost za tvorbu pohlavních buněk a hormonů, mimo to mají další vlastnost, a tou je poskytnutí podpory a výživy pro vyvíjející se zárodek a plod (Marvan, 2007). Pohlavní ústrojí feny se skládá z párových vaječníků, vejcovodů, dělohy, pochvy, poševní předsíně, vulvy a klitorisu. Pohlavní orgány jsou organizovány na reprodukční žlázy (vaječník), tubulární (trubicovité) pohlavní orgány (vejcovody, děloha, pochva, poševní předsíň a vulva) a klitoris. Vulva, poševní předsíň a klitoris jsou považovány za vnější pohlavní orgány (Schatten and Constantinescu, 2007).

3.1 Vaječník (*ovarium*)

Vaječník je nepostradatelnou reprodukční žlázou, která produkuje ovogonie (oocyty), dva steroidní samičí hormony - progesteron a estradiol, a také oxytocin, relaxin, inhibin a aktivin Vaječníky se nachází 1cm až 3cm kaudálně od každé ledviny a jsou kompletně obklopeny ovariální burzou. Jsou stlačeny břišními orgány k patru dutiny břišní (Schatten and Constantinescu, 2007). Vaječník je párovou pohlavní žlázou šedorůžové barvy a tuhoelastické konzistence uložen kaudálně v břišní dutině. Na stropě břišní dutiny je upevněn pomocí vaječníkového okruží (Marvan, 2007). U feny zůstávají uloženy vysoko dorzálně v bederní oblasti, kaudálně od ledvin (Köning a Liebich, 2002). Vaječníky jsou popisovány jako orgán mandlovitého tvaru (Reece, 1998). Velikost, celkový tvar, vzhled na povrchu a hmotnost vaječníku se liší dle druhu, u pohlavně dospělých samic se mění i v průběhu pohlavního cyklu (Marvan, 2007). U fen jsou vaječníky delší a plošší, než například u koček (2 cm u feny, 8mm až 9mm u kočky), mají mělký a hladký *hilus* s výjimkou období pohlavního cyklu, kdy je povrch nepravidelný (Schatten and Constantinescu, 2007). Každý vaječník obsahuje *hilus*, což je oblast připevnění mesovaria (okruží vaječníku) a vstupu vaječníkové cévy (Schatten and Constantinescu, 2007). Převážná většina povrchu vaječníku je volná a nazývá se ovulační plocha, protože na ní praskají dozrálé vaječníkové folikuly (Marvan, 2007). Na řezu vaječníkem vidíme vnitřní *medulla ovarii* – vaskulární zónu, bohatou na cévy a vnější *cortex ovarii* – parenchymatické pásmo. Vnější vrstvu ohraničuje *tunica albuginea*, která je na povrchu pokryta jednovrstevným zárodečným epitelem (Köning a Liebich, 2002). Jedná se o kolagenní vazivo, pokrývající celý vaječník (Reece, 1998). Periferní parenchymatické pásmo,

zvané cortex neboli kůra se nachází v těsném kontaktu s albugineou; kůra obsahuje folikuly a žluté tělísko. Žluté tělísko je endokrinní tělísko žluté barvy, které se vytvoří v místě prasklého folikulu a vznikne z granulózních (folikulárních) buněk vnitřního obalu vaječníku vždy po ovulaci (Schatten and Constantinescu, 2007). Na žlutém tělísku lze rozpoznat rané (proliferační) a pozdní (vaskularizační) stadium vzniku, stadium rozkvětu a stadium regrese (Köning a Liebich, 2002). V centru vaječníku se nachází vaskulární zóna, tzv. dřeň podporující krevní cévy, které vyživují vaječník, lymfatický systém, nervy a vlákna hladkého svalstva. Volná vazivová tkáň v kůře a dřeni se nazývá stroma (podpůrná tkáň tvořená vazivem) (Schatten and Constantinescu, 2007). Ve vazivovém stromatu kůry jsou rozmístěny hlavní součásti vaječníku – folikuly a jejich deriváty (Marvan, 2007). Ovariální folikuly se vyvíjejí po dosažení pohlavní dospělosti v parenchymatickém pásmu. Liší se velikostí a stupněm diferenciace oocytů uvnitř folikulu. Rozeznáváme následující vývojová stadia folikulů: zárodečné, primární, sekundární, terciární a Graafovy (Köning a Liebich, 2002). Vaječníky jsou zásobovány pomocí párové vaječníkové tepny a vaječníkové žíly. Ovariální tepna také zásobuje distální část vejcovodu a část vrcholu děložního rohu (Schatten and Constantinescu, 2007).

3.2 Vejcovod (*tuba uterina*)

Vejcovod je párová zvlněná hladkosvalová trubice vystlaná sliznicí, která přivádí vajíčka od vaječníku do příslušného rohu dělohy. Vejcovod slouží jako místo pro oplození (fertilizaci) vajíček spermiemi. Část vejcovodu, která přiléhá k ovariu, se rozšiřuje a vytváří *infundibulum* (nálevka vejcovodu) (Reece, 1998). Ovariální konec vejcovodu přijímá ovulované vajíčko. Vnitřní povrch nálevky je tvořen slizničními řasami, které vybíhají na okraji nálevky v třásně. Po nálevce vejcovodu následuje mírně rozšířený úsek – ampule vejcovodu, zde dochází k oplození (Köning a Liebich, 2002). Vejcovod se během březosti bez problému rozšíří a má nerovnoměrnou velikost. Vejcovod se skládá ze složené vlhké tkáně, hladké svalové vrstvy, která je silnější směrem k děloze a ze serózní vrstvy lemované volnými pojivovými tkáněmi. Serózní vrstva je částí *mesosalpinxu* (okruží/závěs vejcovodu), která obklopuje trubici. Zatímco délka vejcovodů dosahuje od 6cm do 10cm, jejich šířka je velmi úzká od 1mm do 1,5mm s několika podélnými záhyby (Schatten and Constantinescu, 2007). Vaječník a vejcovod jsou připevněny k přednímu okraji širokého děložního vazu pomocí závěsů mesovarium, resp. *mesosalpinx*. V těchto závěsných vazech probíhají cévy a nervy pro tyto orgány (Köning a Liebich, 2002).

3.3 **Děloha (*uterus*)**

Děloha je silnostěnný dutý orgán, sloužící k vývoji nového jedince z oplozeného vajíčka až do narození mláděte. Skládá se ze tří základních částí. Je to kaudálně umístěný děložní krček, který dopředu přechází v děložní tělo, na něž kraniálně navazují dva děložní rohy. Typ dvourohé dělohy (*uterus bicornis*) je pro feny typický. Ve své poloze je děloha upevněna zavěšením na dvou širokých děložních vazech (Marvan, 2007). Děložní rohy, pravý a levý jsou druhově rozdílné nejen svým tvarem, ale také umístěním a velikostí. Velmi dlouhé a ventrálně mírně zakřivené děložní rohy dosahují průměrné délky od 12cm do 16cm a průměru od 8mm do 9mm. Děložní tělo je umístěno kaudálně v děložních rozích, konkrétně mezi rohy a děložním krčkem. Děložní tělo dosahuje velikosti od 3cm do 4cm na délku, průměr děložního těla je 1cm (Schatten and Constantinescu, 2007). Děložní krček představuje silnostěnný, dobře hmatatelný uzávěr dělohy, jehož lumen se otevírá pouze při říji a během porodu. Kanál děložního krčku začíná vnitřním ústím v jednotné dutině děložního těla a končí vnějším ústím, poté přechází do pochvy (Köning a Liebich, 2002). Děložní krček je umístěn ve středu děložního kanálu a obsahuje prevaginální a vaginální část. Velikost děložního krčku se pohybuje v rozpětí 1,5cm až 2cm na délku, průměr děložního krčku je stejný jako u děložního těla. Děložní kanál interaguje s dělohou kraniálně, zatímco s pochvou kaudálně a je mnohem užší než děložní dutina. Tento kanál komunikuje s děložním tělem pomocí vnitřního otvoru dělohy a s pomocí vnějšího otvoru dělohy komunikuje s pochvou. Celá děloha s výjimkou vrcholu děložního rohu je zásobována děložní tepnou (Schatten and Constantinescu, 2007). Na stavbě děložní stěny se podílejí tři strukturálně odlišné vrstvy. Povrch tvoří tenká pobřišnice – perimetrium, která po obou stranách děložního těla a rohů přechází v široké děložní vazy. Střední vrstvu představuje hladká svalovina – myometrium, rozlišená na vnitřní a silnější vrstvu kruhovou a vnější a slabší podélnou vrstvu. Mezi oběma se nachází řídké vazivo s pleteněmi krevních a mízních cév a nervů. Kruhová svalovina přechází z rohů a těla na krček, kde mohutně zesiluje a podmiňuje jeho tuhou konzistenci (Marvan, 2007). Během březosti myometrium zbytní (hypertrofuje) a zvětšuje se jak počet, tak velikost jeho buněk. Hlavní funkcí myometria je napomáhat při vypuzování plodu při porodu (Reece, 1998). Uvnitř dělohy je 2 – 4 mm vysoká sliznice – endometrium. Má šedorůžovou až hnědočervenou barvu (Marvan, 2007). Serózní povrch dělohy je tvořen tenkou vrstvou pobřišnice – perimetriem, která přechází ze závěsného ústrojí, nazývaného mesometrium – děložní okruží. Mesometrium vytváří závěs zejména u nebřezí dělohy. Březí (gravidní) děloha se zvětšuje a hlavní opora je poskytována břišní stěnou. Existují dva široké

děložní vazy. Každý odstupuje po straně břišní dutiny pod bedry a od laterálního okraje pánve a vede k příslušnému vaječníku, vejcovodu a děložnímu rohu a kaudálně se rozšiřuje na tělo dělohy (Reece, 1998).

3.4 Pochva (*vagina*)

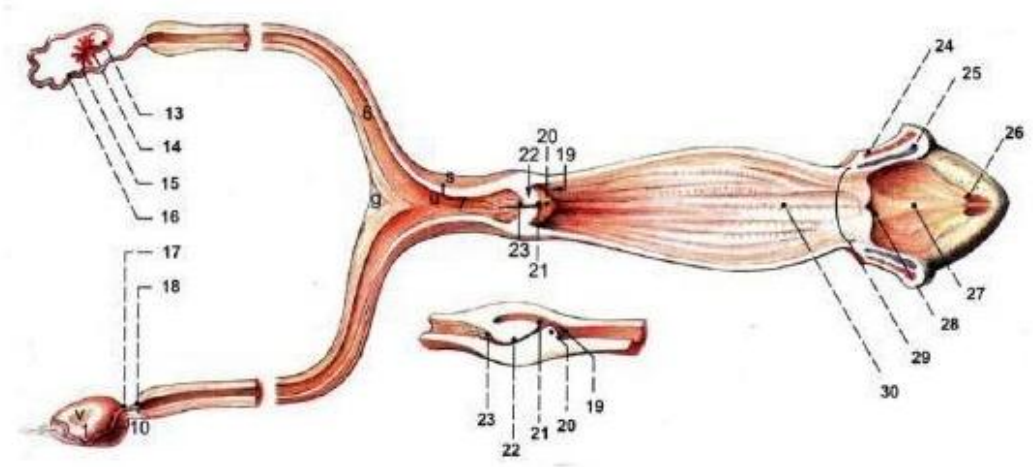
Jako vagina se označuje oddíl kopulačního orgánu, který sahá od zevního ústí děložního krčku až po vyústění močové trubice (Köning a Liebich, 2002). Je to reprodukční orgán, který slouží pro příjem samičího penisu během kopulace. Je vystlána sliznicí, krytou vrstevnatým dlaždicovitým epitelem bez žláz (Reece, 1998). Pochva je podélně uložena v pánevní dutině, ventrálně od konečníku a dorzálně od močového měchýře a močové trubice. Stěna pochvy je pružná a skládá se z adventicie, hladké svaloviny a sliznice. Adventicie je vrstva řídkého vaziva, která připojuje pochvu k okolním orgánům. Jen v nejkraniálnější části zasahuje na pochvu z děložního krčku pobřišnice. Svalovina tvoří střední vrstvu stěny pochvy. Narůžovělá sliznice je pomocí hojného podslizničního vaziva volně připojena ke svalovině a je podélně zřasená, pokrývá ji vrstevnatý dlaždicovitý epitel, podléhající v průběhu pohlavního cyklu významným periodickým změnám (Marvan, 2007). Pochva je zásobovaná vaginální tepnou a žilou. Co se týče velikosti pochvy u fen, jsou popisovány velké velikostní rozdíly – např. u středně velkých plemen dosahuje průměrné délky od 12cm do 15cm (Schatten and Constantinescu, 2007).

3.5 Poševní předsíň (*vestibulum vaginae*)

Poševní předsíň představuje kaudální pokračování pochvy. Na rozdíl od pochvy, která je orgánem čistě pohlavním, slouží i jako vývodná močová cesta. Hranice mezi pochvou a poševní předsíní je vytvořena u mladých samic, které se ještě nepářily, 1 – 3 mm vysokou tenkou a kruhově probíhající slizniční řasou, tzv. panenskou blánou (Marvan, 2007). Poševní předsíň je místo, kde dochází k přechodu mezi pochvou a vulvou. Sliznice poševní předsíně je zvlhčována žlázami, jejichž sekret snižuje tření pohlavních orgánů při kopulaci. Během říje vůně sekretu těchto žláz sexuálně stimuluje samčího partnera. U feny ústí ve dvou řadách na dně poševní předsíně malé vestibulární žlázy. V laterální stěně poševní předsíně je u feny uloženo po jednom topořivém tělese (Köning a Liebich, 2002). Poševní předsíň je zásobována střední rektální tepnou, tepnou topořivého tělesa a močové trubice a zároveň příslušnými žílami. Délka poševní předsíně dosahuje od 5cm do 6cm (Schatten and Constantinescu, 2007).

3.6 **Vulva a klitoris**

Vulva je z každé strany tvořena jedním stydkým pyskem, které se setkávají v horní a dolní spojce. Dorzální komisura je zaoblená, ventrální špičatá. Ve ventrální komisuře se nachází klitoris (Köning a Liebich, 2002). Vulva a klitoris jsou považovány na vnější pohlavní genitálie. Vulva je vybavena velkými a malými stydkými pysky, které jsou spojeny a stydkou štěrbinou, což je štěrbina mezi velkými stydkými pysky (Schatten and Constantinescu, 2007). Stydké pysky mají za podklad hlavně tukové a elastické vazivo, částečně i žíhanou svalovinu v podobě svěrače vulvy (Marvan, 2007). Klitoris je orgán základem podobný penisu; nachází se na dně poševní předsíně. Jediný rozdíl mezi samcem a samicí spočívá v tom, že klitoris se nachází mimo močovou trubici. Klitoris je tvořen dvěma rameny, kavernózním tělesem, žlázami se spongiózním tělesem a vazivovým pruhem. Klitoris je poměrně veliký, rameno dosahuje 2cm až 3cm a tělo klitorisu zhruba 4cm (Schatten and Constantinescu, 2007).



Obrázek 1 - Pohlavní ústrojí feny (dorsální pohled) a detail děložního krčku

1. vaječníkový vak 7. děložní tělo
Vejcovod (*tuba uterina*)
13. ampula vejcovodu (*ampulla*)
14. nálevka vejcovodu (*infundibulum*)
15. břišní ústí a třásně vejcovodu (*fimbriae*)
16. zúžení vejcovodu (*isthmus*)
17. děložní část vejcovodu
18. děložní vstup s papilou
Děložní krček (*cervix uteri*) – podélný řez
19. poševní klenba
20. poševní branka
21. výběžek děložního vstupu
22. krčkový kanálek
23. vnitřní děložní vstup
Pochva a poševní předsíň (*vagina et vestibulum vaginae*)
24. svěrač poševní předsíně
25. stydký pysk (*labium pudendi*)
26. řasa poštěváčku (*clitoris*)
27. poševní předsíň (*vestibulum vaginae*)
28. výběžek vstupu močové trubice
29. poševní vstup (*ostium vaginae*)
30. pochva (*vagina*)

(Budras, et al., 2007)

4 Ovariální aktivita a růst folikulů

Folikulogeneze je tvorba a růst folikulů během postnatálního období života. Folikulogeneze u feny se vyznačuje dlouhým obdobím interestru (6 měsíců) a vysokým podílem polyoocytických (polyoocytic) folikulů, které mohou představovat 5 % až 14 % folikulární populace (Telfer a Gosden, 1987). Polyoocytické folikuly jsou u fen poměrně časté (jeden folikul může obsahovat až 17 oocytů) (McDougall a kol., 1997). Tyto folikuly se vyvíjejí v hnízdech oogonií, nejspíše jako důsledek neúplného oddělení oocytů (Reynaud, 2012). Při narození obsahuje vaječník hnízda oogonií a první primordiální folikuly jsou zpozorovány přibližně 2 až 3 týdny po porodu (Andersen et al. 1973). Během druhého měsíce života provází tvorbu primordiálních folikulů mohutná degenerace zárodečných buněk. Počet primordiálních folikulů se odhaduje přibližně na 100 000 na jeden vaječník (Andersen et al. 1973). V tomto období oocyt průměrně měří 25 – 30 μm (Durrant et al. 1998). Vaječník obsahuje všechny typy folikulů, ty jsou společně s primárními folikuly v klidové fázi umístěny pod tunicou albugineou ve svrchní části kůry vaječníků (Schatten and Constantinescu, 2007).

4.1 Primordiální zárodečné buňky a oogonie

Primordiální zárodečné buňky se nejprve objeví v endodermálním žloutkovém váčku. Poté buňky migrují z dorsálního okruží tlustého střeva do hřebenu pohlavních žláz, které v tuto chvíli nejsou diferencovány. V průběhu prenatálního vývoje, během mitózy, dochází ke vzniku oogonií z primordiálních zárodečných buněk (Schatten and Constantinescu, 2007). Před narozením dochází k zástavě meiózy. Signálem pro přechod na meiotické dělení je uvolnění kyseliny retinové z přilehlých mezonefros (Bowles et al., 2006; Bowles & Koopman, 2007). Z oogonií vznikají primární oocyty. Meióza je pozastavena ještě v embryonálním období ve fázi diplotene profáze I až do doby těsně před ovulací (Soyal, Amleh & Dean, 2000).

4.2 Primordiální folikuly

Primordiální folikul je klasifikovaný jako primární oocyt obklopený jednovrstevným dlaždicovitým folikulárním epitelem (Schatten and Constantinescu, 2007), tj. <10 ti granulóznimi buňkami, které se přeměňují v pozdějších stádiích diferenciace ve vnitřní thekální buňky (Köning a Liebich, 2002). Dalším vývojovým stadiem je primární folikul.

4.3 Primární folikul

Dojde – li k přeměně plochého epitelu stěny folikulu v izoprizmatický, hovoří se o primárním folikulu (Köning a Liebich, 2002). Primární folikul obsahuje primární oocyt ohraničený jednovrstevným kubickým epitelem (Schatten and Constantinescu, 2007). Primární folikuly jsou nejmenší a jsou uloženy jednotlivě nebo ve skupinách v nejzevnější vrstvě vaječníkové kůry, přímo pod bělavým obalem. Jsou to kulovité útvary o velikosti 30 – 50 μm. Růst primárního folikulu je podmíněn zvětšováním vaječné buňky, které ve své cytoplazmě ukládá zásobní látky v podobě žloutkových inkluzí. Tyto folikuly se zakládají ještě v embryonálním období a v jednom vaječníku jich má samice po narození 50 – 200 tisíc. Převážná většina těchto primárních folikulů se však dále nevyvíjí a podléhá zániku – atrézii. K atrézii primárních folikulů dochází v průběhu celého života samice, nejvíce však před pubertou a v období končící pohlavní aktivity. Přesto však zůstává ve vaječníku pohlavně dospělé samice mnohem větší množství folikulů, než může během celého jejího života dozrát (Marvan, 2007). Shluky primordiálních a primárních folikulů jsou nazývány vaječným hnízdem (Schatten and Constantinescu, 2007).

4.4 Sekundární folikul

Polárním zmnožením buněk primární folikul roste, až se přemění v sekundární folikul, ve kterém dochází ke vzniku štěrbinovitých prostorů vyplněných tekutinou. Tyto prostory splývají a postupně tvoří později jednotnou dutinu folikulu (Köning a Liebich, 2002). V této fázi vývoje je primární oocyt obklopen rozvrstveným folikulárním epitelem (granulózní buňky) a vnitřním a vnějším obalem (intersticiální buňky), který se tvoří na bazální straně folikulu (Schatten and Constantinescu, 2007). Nejvnitřnější vrstva folikulárních buněk sekundárního folikulu má cylindrický tvar a nazývá se *corona radiata*. Činností těchto buněk se vytvoří kolem vaječné buňky další obal – *zona pellucida* (průsvitná blanka) složená převážně z glykoproteinů (Marvan, 2007). Póry *zona pellucida* procházejí výběžky granulózních buněk a tím dochází k interakci mezi granulózními buňkami a povrchem oocytu (Reece, 1998).

4.5 Terciární (preovulační, Graafův) folikul

Terciární folikul je viditelný už pouhým okem. Má mírně ovodiní tvar a jedním pólem zasahuje hluboko do vaječníkové kůry, druhým blíže k povrchu vaječníku (Marvan, 2007). Po

splynutí štěrbinovitých prostorů vyplněných tekutinou dochází k vytvoření jednotné dutiny folikulu. Terciární folikul prochází zráním do konečného stadia a vzniká tzv. – Graafův folikul, který je připraven k ovulaci (Köning a Liebich, 2002). Stěna terciárního folikulu je tvořena folikulárním epitelem, který obklopuje dutinu folikulu. Vajíčko je excentricky přiloženo ke stěně folikulu v místě zvaném *cumulus oophorus*. Je obalenou vrstvou složenou z jemných fibril (*zona pellucida*), na kterou přiléhá několik vrstev buněk folikulárního epitelu, *corona radiata*. Jen mizivá část embryonálně založených folikulů, a tím i vajíček, dosahuje stadia Graafova folikulu. Většina folikulů podléhá regresi, tzv. atrézii folikulů, a degeneruje (Köning a Liebich, 2002). V terciární fázi folikulu budou buňky vnitřního obalu (*theca interna*) produkovat androgeny, které granulózní buňky přemění na estrogeny. Pojem Graafův folikul může být použit pouze tehdy, jedná – li se o terciární folikul, který je úplně zralý a připravený k ovulaci. Velikost zralého folikulu u feny je přibližně od 6 mm do 1 cm. (Schatten and Constantinescu, 2007).

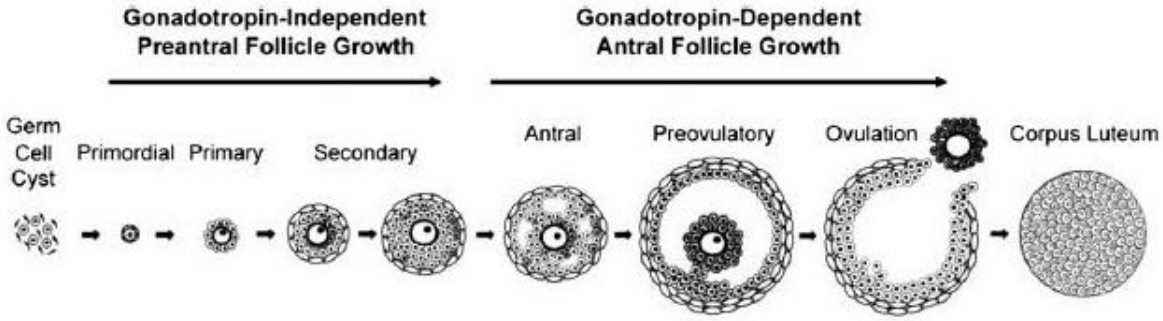
Vznik Graafova folikulu z rostoucího folikulu je závislý na působení hormonů a začíná při dosažení puberty, kdy se tonická hladina LH a FSH začíná zvyšovat a klesat s průběhem každého estrálního cyklu. Intersticiální buňky začínají obklopovat bazální membránu granulózních buněk, aby utvořily obal, který se pak diferencuje na vnější a vnitřní vrstvu (*theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*). Jakmile se okolo folikulu vytvoří thekální buňky, začnou se mezi nimi vyvíjet kapiláry. Thekální kapiláry se zvětšují a jsou soustředěny do *theka interna* těsně u bazální membrány, která odděluje buňky *theca interna* od granulózních buněk. Na buňkách *theca interna* se formují receptory pro LH a na buňkách granulózních se formují receptory pro FSH a estrogeny. Hlavní funkcí FSH je podněcování růstu folikulů (Reece, 1998).

Jakmile folikul prochází fází folikulogeneze, mění se současně i oocyt uvnitř folikulu. Toto dozrávání, které se vyskytuje v průběhu života samic, nazýváme oogeneze. Prenatální, prvotní zárodečné buňky prodělají mitosu, aby při narození zajistily dostatečný počet primárních oocytů pro budoucí vývoj folikulů. Oogonie vytváří svou poslední mitotickou aktivitu a vyváří primární oocyt, což představuje důležitou změnu; primární oocyt vstupuje do první meiotické profáze, kde zůstává až do puberty. Je – li primární oocyt stimulován gonadotropiny, zůstává v profázi I meiózy nebo v této fázi může setrvat po celou dobu reprodukčního života feny. Při přechodu z primárního folikulu na folikul sekundární vyvíjí oocyt průsvitný druh glykoproteinů nesoucí název ZP (*zona pellucida*). ZP je důležitým vývojovým krokem, je to ochranná svrchní vrstva pro právě vyvíjející se embryo a má několik funkcí. Mezi ně patří ochrana embrya před vlivy vnějšího prostředí za pomoci limitující

difuze, blokování polyspermie a omezením blastomer embrya a tím dojde k podpoře kontaktu z buňky do buňky. V sekundárním oocytu ZP začne vytvářet uzlovité komplexy se sousedícími folikulárními buňkami. Toto spojení je rozhodující pro buněčnou komunikaci mezi oocytem a granulózními buňkami. Spojení je považováno za zásadní pro růst oocytu uvnitř folikulu a zůstane v tomto stádiu mimo plasmatickou membránu do doby preovulačního nárustu LH. Oocyt dosáhne své maximální velikosti, jakmile folikul začne utvářet dutinu vyplněnou folikulární tekutinou (Schatten and Constantinescu, 2007). Primární oocyt dokončuje první meiotické dělení (redukční dělení) během preovulačního období zrání, u feny však k tomuto procesu dochází až po ovulaci (Köning a Liebich, 2002). Oocyt je před ovulací stále diploidní (2n), během metafáze extruduje pól, který obsahuje polovinu genetického materiálu, tímto vznikne haploidní (1n) oocyt, který zůstane v metafázi II až do doby, kdy dojde k oplodnění nebo k následné degeneraci (Schatten and Constantinescu, 2007).

Preovulační perioda u fen je v porovnání s jinými savci velmi neobvyklá. Po vzestupu a poklesu hladiny estradiolu dochází v 36 až 50 hodinách po ovulaci k maximalizaci hodnoty luteinizačního hormonu (LH). Obě události nastanou v přítomnosti již podstatně zvýšené hladiny progesteronu, a to v důsledku preovulační luteinizace folikulů (Andersen, 1973; Concannon, 1986). Současně dochází ke zvýšení FSH a LH v preovulační fázi, zvýšení FSH dosáhne vrcholu obvykle 0,5 – 1 den po vrcholu LH. Vlna LH vyvolá nárust folikulárního progesteronu, který je považován za signál iniciující zrání a ovulaci oocytů. K ovulaci nezralých oocytů dochází 48 – 60 hodin po LH vlně (Concannon, 2009). Ovulace se vyskytuje 2 dny po prvním náhlém zvýšení hladiny progesteronu o > 0,5 ng/ml a dosahuje zhruba 0,9 ng/ml. Tato událost se vyskytuje současně s LH v průběhu 95 % cyklů. LH vlna v ovulačním intervalu je charakterizovaná rychlým nárůstem ve folikulárních luteinizovaných murálních buňkách, růstem *thecy* a krevních cév a náhlým zvýšením sérového progesteronu a 17 – hydroxyprogesteronu a dalším poklesem estradiolu. Zvýšená hladina folikulárního progesteronu je s nejvyšší pravděpodobností zásadně nutná k ovulaci (Reynaud et al., 2006). Při ovulaci dochází k uvolnění oocytů ve stadiu zárodečných váčků, které ve vejcovodu prodělají meiózu 56 až 72 hodin po ovulaci (Reynaud et al., 2005; Tsutsui, 1989). LH a prolaktin mají vliv na vývoj a funkci žlutého tělíska (luteotropní hormony) v průběhu 2 týdnů po ovulaci a zůstane to tak i po celou dobu luteální fáze. LH je podstatnou a důležitou částí luteální fáze (Reynaud, 2009). Působení luteinizačního hormonu na buňky cumulu je zprostředkováváno epidermálním růstovým faktorem a gonadotropním FSH (Park et al., 2004).

Nástup puberty u fen se dostavuje 2 – 3 měsíce po dosažení tělesného rámce dospělých zvířat. V závislosti na plemeni se puberta objevuje mezi 6. a 12. měsícem věku. Fena má neobvykle dlouhou periodu ovariální inaktivity, proto je někdy považována za monoestrickou. Estrální cyklus se může vyskytnout v průběhu celého roku. Stadia estrálního cyklu se liší od ostatních druhů v délce trvání. Jak proestrus, tak estrus trvá od 7 do 10 dnů. Puberta je definována jako začátek reprodukčního období života, který je u samic obyčejně poznatelný podle začátku ovariální aktivity (Reece, 1998).



Obrázek 2 – Vývoj ovariálního folikulu a corpus luteum (Edson et al., 2009).

5 Estrální cyklus

Estrální (říjový) cyklus je opakující se období fyziologických a behaviorálních změn s každým reprodukčním cyklem. Říjový cyklus u feny dělíme na čtyři fáze (Evans and Cole, 1931), 5 – 20 dní trvající proestrus, 5 – 15 dní trvající estrus, 50 – 80 dní trvající metestrus (diestrus) a anestrus trvající 80 – 240 dní. Domestikované feny jsou monoestrické, typicky nesezónní, rodící více mláďat v jednom vrhu. Jejich ovulace přichází spontánně a jejich luteální fáze je nepatrně delší (přibližně o 5 dní) než 64±1 den (Concannon, 2011). U fen, na rozdíl od jiných domestikovaných druhů zvířat, je luteální fáze březích a nebřezích fen téměř identická (Concannon et al., 1978).

5.1 Proestrus – počátek říje

Proestrus je charakterizován otokem vulvy a krvavým výtokem. Některé feny se neustále čistí, a proto není poznat, že k výtoku došlo. Fena je pro samce velmi atraktivní, avšak ona o ně nejeví zájem (Noakes et al., 2001). Proestrus je charakteristický folikulárním růstem, zvyšující se koncentrací estrogenu a vývojem endometria (Schatten and Constantinescu, 2007). Proestrus trvá přibližně 9 dní. Hladina estradiolu po celou dobu vzrůstá a dosáhne maxima. Proestrus končí ve chvíli, kdy fena začne být vnímavá k samci, zhruba 0,5 – 3 dny poté, co hladina estradiolu dosáhne maxima a v průběhu preovulační LH vlny. Proestrus končí endokrinologicky i fyziologicky s přicházející LH vlnou (Concannon, 2011).

5.2 Estrus – vlastní říje

Průměrný interval mezi po sobě jdoucími říjemi je 7 měsíců, ale toto období je variabilní, protože je ovlivněno plemenem feny. Například u dlouhosrsté kolie je délka tohoto období 37 týdnů, u německého ovčáka pouze 26 týdnů (Christie and Bell, 1971). U většiny plemen nastává první říje v období mezi 6. – 14. měsícem života, což koreluje s velikostí plemen (Evans and Cole, 1931). Otok vulvy je viditelně menší a výtok je čirý, méně krvavý a v slabší intenzitě (Noakes et al., 2001). V tomto období je samice sexuálně vnímavější k samci, hladina estrogenu je na úrovni maxima a dochází k ovulaci (Schatten and Constantinescu, 2007). Délka estru je velmi variabilní, může být zkrácena na 5 dní nebo prodloužena až na 10 dní (v průměru je to 9 dní). V pozdním proestru následuje v dalších 24 až 48 hodinách ovulace (Reece, 1998). Estrus se obvykle dostaví jako odezva na pokles

hladiny estradiolu. Hladina estradiolu, která byla na vrcholu, postupně klesá na hodnotu střední a hodnota progesteronu vzrůstá v průběhu preovulační vlny a desátým dnem, případě krátce po konci estru. (Concannon et al, 1979).

Doba trvání proestru a estru je dohromady zhruba 18 dnů; tj. každá z těchto fází má 9 dní. Nicméně i toto může být velmi variabilní, některé feny vykazují zájem pouze o některé samce, což může mít vliv na správné načasování připuštění. Ovulace obvykle nastane první až druhý den po začátku estru, ačkoli pomocí laparoskopie bylo zpozorováno, že některé folikuly i nadále pokračovaly v ovulaci a to až po dobu 14 dní (Wildt et al, 1977). Proestrus a estrus jsou považovány za folikulární fáze cyklu (Schatten and Constantinescu, 2007).

5.3 Metestrus (diestrus) – luteální fáze

Metestrus trvá v rozmezí 50 – 80 dní a je považován za postestrální část luteální fáze (Concannon, 2011). Metestrus, luteální fáze cyklu, je časné postovulační období, během kterého se začíná vyvíjet žluté tělísko (Reece, 1998). Tato fáze začíná, pokud fena již neakceptuje psa (Noakes et al., 2001). V tomto období klesá hladina estradiolu, naopak hladina progesteronu se zvyšuje, za což má zodpovědnost vznikající žluté tělísko. (Schatten and Constantinescu, 2007).

5.4 Anestrus – klidové fáze

Folikulární fáze a spontánní ovulace je následována luteální fází, která v průměru trvá přibližně 75 dní (Schaefers and Okkens, 1996). Nesezónní anestrus, mající proměnlivou dobu trvání (2-10 měsíců), následuje každý estrální cyklus (Bouchard et al., 1991; Concannon, 1993). Přechod z luteální fáze do anestru je postupný. Doba nástupu anestru závisí na tom, jaká kritéria jsou použita pro stanovení konce luteální fáze. Konec luteální fáze lze v prvním případě nejlépe určit tehdy, pokud plasmatická koncentrace progesteronu dosáhne hodnoty pod 3 nmol/l. Trvání anestru se mezi fenami výrazně liší. Některá plemena psů, jako jsou basenji a tibetská doga, mají jeden roční estrální cyklus, který může být ovlivněn fotoperiodou. V průběhu anestru se v těle feny uskuteční mnoho změn, a to konkrétně v hypotalamu, hypofýze a na vaječnících. Průběh anestru je charakterizován vyšší amplitudou a větším počtem gonadotropiny uvolňujícího homonu (GnRH), který je uvolňován hypotalamem. Vzrůst koncentrace FSH v bazální plasmě je nutný k zahájení folikulogeneze. Při přechodu na novou folikulární fázi hraje velkou roli dopaminový agonista. Ten vyvolává zkrácení anestru, který je spojen s rychlým růstem basální plazmatické koncentrace FSH

podobně jako v pozdním anestru. Období zvýšené pulsatility luteinizačního hormonu bylo zaznamenáno krátce před začátkem proestru (Okkens and Kooistra, 2006). Hladina estradiolu je proměnlivá, avšak obecně nízká (5 – 10 pg/ml), basální hodnota LH je nízká (< 1 – 2 ng/ml), hodnota FSH je vysoká (50 – 400 ng/ml) a hladina progesteronu je nižší než 1ng/ml, s nejnižší hodnotou 400 pg/ml a to 30 až 40 dnů před proestrem (Concannon et al., 1993).

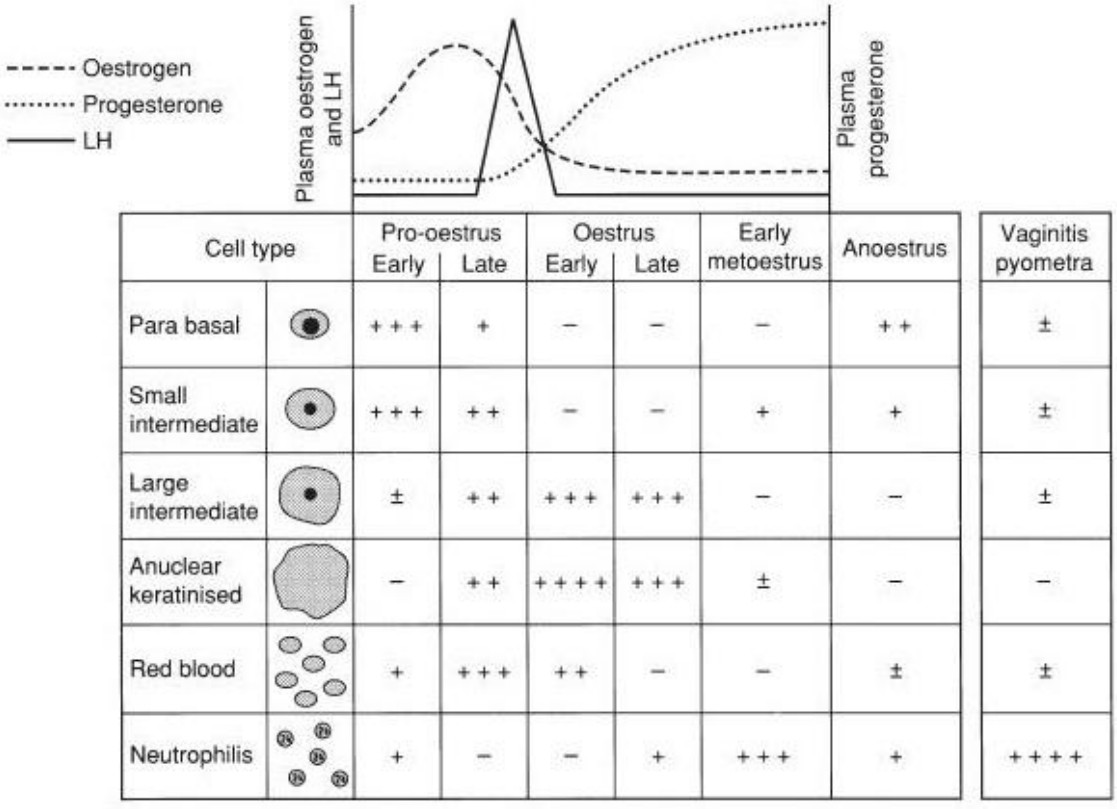
5.5 Hormonální regulace estrálního cyklu

FSH a LH jsou gonadotropní hormony, které jsou vylučovány stejným typem hypofyzárních buněk, tyto hormony mají velmi důležitou úlohu při vyvolání folikulogeneze a ovulace. Hlavním regulátorem FSH a LH je dekapeptidový gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH) (Tani et al., 1996). Gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH) z hypotalamu přiměje přední část hypofýzy (adenohypofýza) produkovat a uvolňovat hormon stimulující folikuly (FSH). FSH podporuje ovariálně folikulární vývoj a stimuluje granulózní buňky, aby přeměnily androgeny z buněk vnitřního obalu na estrogeny (Schatten and Constantinescu, 2007). V průběhu anestru dochází ke zvýšení citlivosti hypofýzy na GnRH (Van Haaften et al., 1994) a na zvýšení ovariální reakce na gonadotropiny (Jeffcoate, 1993; Van Haaften et al., 1994). K FSH impulsům u fen dochází současně s impulsy LH ve všech stádiích estrálního cyklu a anestru (Kooistra et al., 1999a).

Podání dopaminových agonistů, bromokriptinu a kabergolinu, je spojováno se zbrzděním uvolňování prolaktinu a se zkrácením intervalu interestru (Okkens et al., 1985; Van Haaften et al., 1989; Concannon, 1993; Onclin et al., 1995; Kooistra et al., 1999b; Verstegen et al., 1999; Gobello et al., 2002). Dopaminový agonisté vyvolávají nástup říje. Zkrácení luteální fáze je způsobeno sníženou sekrecí prolaktinu – hlavním luteotropním faktorem u feny. Vysoká hladina cirkulujícího prolaktinu v různých patologických situacích inhibuje LH pulsatilitu (Saunder et al., 1984; Yazigi et al., 1997) nebo dochází ke snížení sekrece LH (Park et al., 1993).

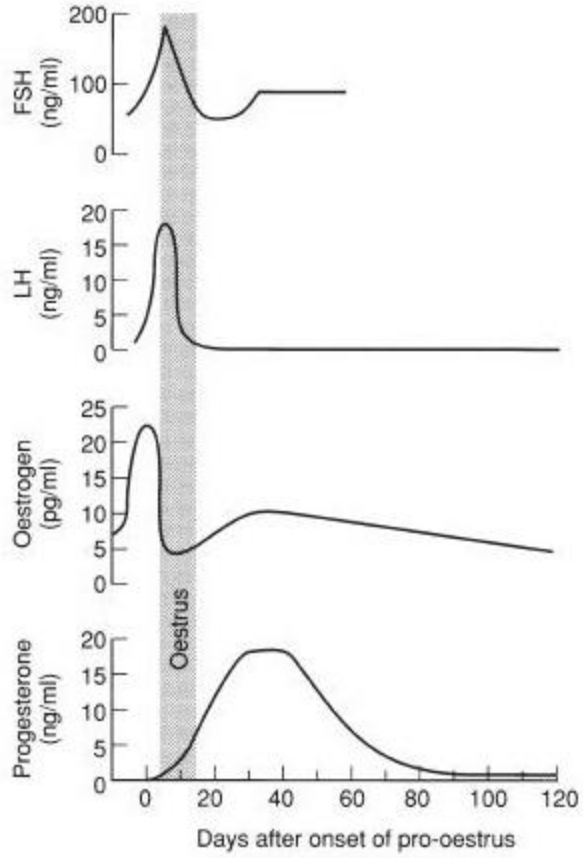
Koncentrace estradiolu se zvyšuje v průběhu 5. – 20. dne proestru, což způsobuje značnou vaginální epiteliální proliferaci a přeměnu epitelu na vrstevnatě dlaždicový. Nástup estru je souběžný se sestupnou fází estradiolu. Hladina progesteronu obvykle dosahuje maxima 15. – 25. den a poté pomalu klesá (Concannon et al., 2001a,b). Progesteron je mimořádně účinný steroid (Concannon et al., 1980; Mol et al., 1996; Stovring et al., 1997). Progesteron je výhradně luteálního původu a jeho přítomnost závisí jak na LH, tak na prolaktinu (Concannon et al., 2001a,b). Progesteron nepotlačuje basální LH nebo FSH, a ve

skutečnosti může exogenní progestin způsobit zvýšení basální sekrece gonadotropinu (Concannon et al., 1980) a to pravděpodobně z důvodu estrogen – negativní zpětné vazby (Concannon et al., 1993). Neexistuje žádný přesvědčivý důkaz o vlnách folikulárního vývoje během anestru. Koncentrace FSH je po celou dobu zvýšená, zvyšuje se pozvolna a v posledních 60 - ti dnech rychleji (Okkens and Kooistra, 2006). Koncentrace estradiolu jsou nízké, ale průměrně měsíc před proestrem se zdají být vyšší (Jeffcoate, 1993). Existuje nepřímý důkaz případných podprahových folikulárních vln (Concannon et al., 1989, 1993, 1997, 2006a,b). Ultrazvuk zaznamenal, že v pozdním anestru se nachází malé množství 1 – 2 mm folikulů, které vzrostly z průměrného množství menší než 1 na více než dva folikuly na vaječník přibližně 50 dní před nástupem proestru. V proestru se před přeměnou na velké folikuly tento počet zvýšil přibližně na osm folikulů na vaječník (England et al., 2009).



Cell type		Pro-oestrus Early	Pro-oestrus Late	Oestrus Early	Oestrus Late	Early metoestrus	Anoestrus	Vaginitis pyometra
Para basal		+ + +	+	–	–	–	+ +	±
Small intermediate		+ + +	+ +	–	–	+	+	±
Large intermediate		±	+ +	+ + +	+ + +	–	–	±
Anuclear keratinised		–	+ +	+ + + +	+ + +	±	–	–
Red blood		+	+ + +	+ +	–	–	±	±
Neutrophilis		+	–	–	+	+ + +	+	+ + + +

Obrázek 3 – Změny v typech buněk a jejich relativní počet ve vaginálních stěrech v průběhu všech fází estrálního cyklu, změny hladiny estrogenu, progesteronu a LH z plazmy periferní krve (Noakes et al., 2001).



Obrázek 4 – trendy v koncentraci hormonů v periferní krvi v průběhu estrálního cyklu (Noakes et al., 2001).

6 Historie využití biotechnologií u psa domácího

Pes domácí, původně sloužil jako společník a jeho křížení bylo spíše záležitostí biomedicínského výzkumu. Dovoz a vývoz semene a křížení zvířat prokázalo trvalý nárust a v důsledku toho začaly vznikat sperma banky a to nejen ve výzkumných institucích, ale i v soukromých společnostech (Farstad, 1996). Asistovaná reprodukce u psů začala již v roce 1780. První vědecky zaznamenaná umělá inseminace byla provedena v Itálii Abbem Lazzaro Spahanzamem a vedla k narození tří štěňat (Heape, 1897). K prvnímu skutečnému popisu savčího vajíčka došlo v roce 1827, konkrétně šlo o vajíčko z děložního rohu feny, a zasloužil se o to Karl Ernst von Baer (von Baer, 1827). Pokrok v této oblasti byl velmi pomalý. Následný vývoj inseminačních zařízení, včetně metod pro krátkodobé uchování čerstvého a později i zmraženého spermatu, vedl k prvnímu vrhu na světě, který byl stvořen z mraženého spermatu a to v roce 1969. Vylepšení zmrazovacích metod a inseminačního zařízení z roku 1970 a dále, bylo označeno za užitečnou chovatelskou metodu pro psy. S ohledem na mimořádnou fyziologii feny, pokrok jiných umělých metod zaostává. V posledních několika letech byly tyto techniky úspěšně aplikovány v oblasti základního výzkumu, k prostudování zrání vajíčka, *in vitro* fertilizace, kryokonzervace embryí a embryo transferu (Farstad, 2000). Od doby, kdy byly v roce 2005 naklonovány první psovité šelmy (Lee et al., 2005), vzrostl ve veterinární medicíně a v biomedicínském výzkumu zájem o aplikaci transferu jader somatických buněk (klonování). U psů, kteří s námi v naší společnosti žijí, vznikají podobné civilizační choroby jako u lidí, včetně diabetu a obezity. Aby se u psů zachovaly typické charakteristiky plemene, dochází často k inbreednímu křížení a tímto pak vznikají genetické vady, jakou je například dysplazie kyčelního kloubu a predispozice k některým druhům rakoviny. Z těchto důvodů jsou psi ideálními modely pro studium lidských chorob (Acland et al., 2001; Kirk, 2003; Sutter and Ostrander, 2004; Ellegren, 2005; Lindblad-Toh et al., 2005; Starkey et al., 2005). Psi jsou ve velké míře používáni jako modely pro biomedicínský výzkum zahrnující oblasti kardiovaskulární fyziologie, cukrovky a rakoviny. Za posledních 30 let se využití zvířat v biomedicínském výzkumu snížilo o 61% a využití klonovaných zvířat by tuto hodnotu mohlo posunout ještě níže. K dnešnímu dni bylo u psů popsáno více než 350 genetických chorob, z nichž jsou mnohé podobné genetickým chorobám lidí (Patterson, 2000; Sargan, 2004; Ellegren, 2005). Běžná fena je plodná přibližně 14 dní v roce, za předpokladu, že má estrální cyklus každých 5 až 7 měsíců. Naproti tomu běžný pes je plodný od období puberty (6 – 18 měsíců), až do stáří, nemoci nebo smrti (Grundy, 2002).

7 Biotechnologické metody v reprodukci fen

Následující kapitola shrnuje nejpoužívanější biotechnologické metody v reprodukci fen.

7.1 In vitro maturace (IVM)

První studie *in vitro* maturace oocytů feny byla zaznamenána před více než 30 – ti lety, konkrétně v roce 1976 (Mahi and Yanagimachi, 1976). In vitro reprodukční technologie jsou užitečné nejen pro domestikované feny, ale i pro ohrožené psovité šelmy (Hewitt and England, 2001; Otoi et al., 2002). Úspěšné zrání, oplození a vývoj embrya *in vitro* je předpokladem pro mnoho technik asistované reprodukce (Farstad, 2000). Oocyty fen mohou spontánně pokračovat v meióze *in vitro* přizpůsobením se technice *in vitro* maturaci u skotu a prasat, avšak v mnohem menší míře a účinnosti, než u oocytů jiných druhů domestikovaných zvířat. U fen *in vitro* maturace (IVM) prokázala omezenou úspěšnost s mírou zrání, která se pohybuje od 0% do 58% pro oocyty zrající do metafáze I, anafáze I a metafáze II. Dozrávání je obvykle kolem 20% (MII) v množství různých kultivačních systémů (Mahi and Yanagimachi, 1976; Robertson et al., 1992; Nickson et al., 1993; Yamada et al., 1992, 1993; Bolamba et al., 1997; Hewitt and England 1997, 1998a, 1999a; Hewitt et al., 1998; Theiss, 1997; Metcalfe, 1999). Většina oocytů, které byly použity pro experimenty IVM byly shromážděny z náhodných zdrojů, obvykle z fen, které podstupují ovariohysterektomii (Nickson et al., 1993; Hewitt and England 1997; Theiss, 1997; Metcalfe, 1999). Byl zaznamenán vysoký výskyt (20% až 68%) degenerovaných oocytů (Theiss, 1997; Metcalfe, 1999), které nejsou vhodné pro IVM, kvůli známkám morfologické degenerace. Mezi tyto známky degenerace patří neúplné množství cumulu (< 2 vrstvy cumulárních buněk), nevýraznou cytoplasmu a intracytoplazmatické vakuoly prasklé *zona pellucida* (Theiss, 1997). Značný počet oocytů získaných z vaječníků fen je stále ve fázi růstu, morfologie oocytu a jeho průměr, stejně tak jako uspořádání cumulu jsou důležitým parametrem pro úspěšné provedení IVM (Farstad, 2000). Získání oocytů je problematické, jelikož je technicky náročné přistupovat do vejcovodů, kvůli přítomnosti obklopující ovariální bursy. Nejúčinnější způsob, jak získat kvalitní *in vivo* zrající oocyty, je proplachováním. V současnosti sběr *in vivo* zrajících oocytů, závisí na době ovulace, kterou lze určit pomocí sérové koncentrace progesteronu (Hase et al., 2000; Lee et al., 2005; Jang et al., 2007; Kim et al., 2007). Ovulované oocyty běžně potřebují 48 – 72 hodin pro dozrávání ve vejcovodech (Jang et al., 2007) a to jak *in vitro*, tak *in vivo* (Tsutsui, 1989), stav oocytů nasbíraných zhruba 72 hodin

po ovulaci se pohybuje od nezralých, až po výrazně staré (Jang et al., 2007). Prostředí vejcovodu je pro oocyty důležité z hlediska podpory jaderného zrání. Buňky vejcovodu vylučují různé prvky, například růstové faktory a cytokiny. Sekrece růstových faktorů z buněk vejcovodu hraje důležitou roli v lokálním embryonálním vývoji (Bongso et al., 1991; Pfeifer and Chegini, 1994; Smotrich et al., 1996; Barma et al., 1997). Velikost a vývojová fáze folikulu ovlivňuje zrání oocytů *in vitro* (Lonergan et al., 1994). Oocyty z malých antrálních folikulů mají vývojové schopnosti, jelikož bylo prokázáno, že tyto oocyty podstoupily IVM a vyvinuly se do 8 – buněčného stádia v průběhu *in vitro* kultivace (Metcalfe, 1999).

7.2 Transfer jader somatických buněk (SCNT)

Ačkoli jsou metody transferu jader somatických buněk, neboli klonování, dobře rozvinuty u domestikovaných druhů zvířat a u zvířat laboratorních, využití těchto metod u psů postupovala jen pomalu. Od narození prvního klonovaného psa, byla metoda SCNT (Somatic Cell Nuclear Transfer) vyzdvihnuta jako významný vědecký průlom pro humánní i veterinární vědu. Metody SCNT budou aplikovány k 1) rozšíření skupiny elitních psů (záchranní psi, vyhledávání drog, výcvik psů pro nevidomé a neslyšící, atd.), 2) ochraně ohrožených druhů psovitých, 3) podpoře při rozvoji zvířecích modelů v rámci výzkumu humánních onemocnění. SCTN je proces, při kterém je z dárcovské buňky přesunuto jádro (DNA) do enukleované buňky příjemce, a vytváří se přesná genetická shoda s dárcem. Vznikne – li životaschopné embryo, následné potomstvo má stejnou genetickou informaci jako dárce, s výjimkou mitochondriální DNA, která je derivována příjemcem (Wolf et al., 2001; Yang et al., 2004). Aby bylo SCNT úspěšné, každý krok od maturace oocytů, přes odstranění jádra z buňky (např. pomocí mikromanipulace), mikro - injekce buněk dárce, aktivací a *in vitro* kultivaci na embryo tranfesu k narození klonovaného potomstva musí být velmi dobře sladěno. Nutnou podmínkou pro SCNT jsou zralé oocyty, bez ohledu na to, zda jsou produkovány *in vivo* nebo *in vitro* (Jang et al., 2010). První naklonované štěně bylo z *in vivo* maturovaných oocytů (Lee et al., 2005). Existují různé druhy savců narozených po SCTN za použití fetálních fibroblastů (Cibelli et al., 1998; Onishi et al., 2000; Galli et al., 2003; Woods et al., 2003), cumulárních buněk (Wakayama et al., 1998; Shin et al., 2002) nebo fibroblastů dospělého jedince (Wilmut et al., 1997; Lee et al., 2005). Obecně se věří, že nejvhodnější dárcovské buňky pro metodu SCNT jsou nediferencované dárcovské buňky (embryonální blastomery) (Cibelli et al., 1998; Onishi et al., 2000; Galli et al., 2003; Woods et al., 2003). První naklonovaný potomek psa pochází z kožních fibroblastů (Lee et al., 2004) a cumulárních buněk dospělce (Shin et al.,

2002). Jsou-li fetální fibroblasty nasbírány a transfekovány (zavedení volného DNA do buňky) konkrétním genem, metoda SCNT může být aplikována k produkci transgenně klonovaného potomstva (Shiu et al, 1989; Gralinsky, 2003; Studzinski et al., 2005). K dnešnímu dni byli klonovaní psi přiváděni na svět pomocí císařského řezu (Lee et al., 2005, Jang et al. 2007, 2008b), ten je preferovaným způsobem ukončení březosti, jelikož přirozený porod může být doprovázen dystokií (Simpson et al., 1988; Johnston et al., 2001). Metoda SCNT nabízí jedinečnou příležitost k vytvoření geneticky naprosto identických zvířat (Seidel, 2002).

Obrázek 5 – Klonovaní jedinci plemene beagle, dárce somatických buněk (v rámečku) (Hossein et al., 2009).

7.3 Endoskopická nitroděložní inseminace

V osmdesátých letech 20. století vzrostl zájem o umělé oplodnění fen jak čerstvým, tak zmraženým spermatem (Linde-Forsberg, 1991; Linde-Forsberg and Forsberg, 1989),

výsledky umělého oplození jsou lepší, pokud je semeno vpraveno přímo do dělohy, zejména je – li použito rozmražené sperma (Linde, 1978; Lindsay, 1983; Pineda et al., 1973). Již v roce 1959 Cobb a později, konkrétně v roce 1987 Lagerstedt a Obel popsali nanesení kontrastní látky do dělohy pomocí cervikální katetrizace naslepo. Je třeba si uvědomit, že v nitroděložní inseminaci bylo použito mnoho různých přístupů. Někteří popisují techniku, která využívá speciálního katetru pro transcervikální katetrizaci (Andersen Berg, 1975; Farstad, 1984; Farstad and Andersen Berg, 1989; Ferguson et al., 1989; Linde-Forsberg, 1991; Linde-Forsberg and Forsberg, 1989; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993). Tsutsui et al (1989a) popsali techniku nitroděložní inseminace laparotomií, která byla využívaná v mnoha zemích. Tato technika však vyžaduje celkovou anestezii a případně může narušit pohyblivost a migraci oocytů (Jedruch and Gajewski, 1986; Jedruch et al., 1989). V reprodukci psů bylo zjištěno, že při použití rozmraženého spermatu je počet štěňat ve vrhu nižší, než při použití spermatu čerstvého, a to v důsledku zhoršené kvality spermatu po jeho opětovném rozmražení (Concannon, 2004; Thomassen et al., 2006). Nitroděložní inseminace se u psů a fen využívá v případě neschopnosti přirozeného rozmnožování, např.: kvůli vaginálnímu zúžení, ortopedickým problémům (např. zlomeniny), při odmítání páření nebo v z důvodů týkajících se chování (Feldman and Nelson, 2004). Přístup k děloze je kvůli anatomii děložního krčku obtížný a katetrizace bez vizualizace je nepříznivá (Wilson, 1993; Silva et al., 1995, 1996; Linde-Forsberg et al., 1999, 2001), délka pochvy může být taktéž problémovým faktorem při nitroděložní inseminaci, u velkých plemen může dosahovat až 29 cm (Wilson, 2003). Farstad (1984) jako první porovnal nitroděložní a vaginální inseminaci za použití norského katetru v obou technikách. Dále ukázal, že nitroděložní inseminací se podstatně zvýší množství vrhnutých mláďat, než inseminací vaginální za použití zmraženého spermatu. Výrazně vyššího množství a velikosti vržených mláďat bylo získáno nejen rozmraženým spermatem, ale také po použití čerstvého a chlazeného semene (Silva et al., 1996; Nizański, 2005). Endoskopická metoda zahrnuje použití pružné duté plastové trubičky uvnitř pevného endoskopu, tím dochází k dosažení děložního hrdla skrz vaginu a děložní kanál. Technika endoskopické inseminace byla poprvé popsána Wilsonem (Wilson, 1993). Metoda katetrizace prováděná endoskopem byla vyvinuta speciálně k použití u fen, umožňující zviditelnění celého vaginálního lumen a části děložního hrdla (vnější otvor). V této technice se využívá prodloužený cysto – uretroskop (Davidson, 2007).

7.4 Vaginální cytologie

Vaginální cytologie je jednoduchá, rychlá, neinvazivní a levná metoda, která umožňuje určit stádium reprodukčního cyklu a zároveň diagnostikovat některá patologická onemocnění pohlavního traktu (hormonální dysfunkce, zánětlivá nebo nádorová onemocnění) (Christiansen, 1984; Johnston et al., 2001; Goodman, 2002). Naopak mezi nevýhody patří individuální reakce buněk na poševní sliznici na zvýšenou hladinu říjových hormonů estrogenu a fakt, že pouze podle cytologického vyšetření není možné s určitostí prohlásit, že již došlo k ovulaci, což je pro odhad plodnosti zásadní informace (Láznička, 1992). Ačkoliv se určení říje cytologickým hodnocením vaginálních stěrů u feny datuje do doby před více než 30 - ti lety (Roszel, 1975), mnohé aspekty jsou stále neznámé. Mezi leukocyty jsou neutrofily převládajícími buňkami ve vaginálním stěru (Johnston et al., 2001), existují však protichůdné údaje týkající se přítomnosti neutrofilů v pochvě během folikulární fáze. Někteří autoři popisují netrofily během celého období proestru (Schutte, 1967; Post, 1985), ale ne během estru (Schutte, 1967; Feldman and Nelson, 1996) a někteří je popisují vždy ve folikulární fázi (Allen, 1985; Noakes et al., 2009). V obvyklé vaginální cytologii se vzorky lymfocytů a eosinofilů vyskytují vzácně (Johnston et al., 2001). Hodnocení vaginálních epiteliálních buněk za pomocí cytologické analýzy, může být v kombinaci s dalšími diagnostickými nástroji využito k určení doby ovulace, a ke zlepšení detekce optimálního období k páření (Linde and Carlson, 1984; Post, 1985; Wright, 1990; Davidson, 2004). Během ovulace jsou povrchové epiteliální buňky ≤ 90% epiteliální buňky (Evans and Savage, 1970). Bylo prokázáno, že se míra březosti u fen zvyšuje, je – li období páření detekováno pomocí vaginální cytologie, oproti fenám, které byly nakryté několik dnů po nástupu proestru (England, 1992). Vaginální cytologie je subjektivní hodnocení epiteliální morfologie buněk, za použití kritérií pro rozdělení buněk do skupin dle fáze cyklu (Schutte, 1967; Johnston et al., 2001). V průběhu anestru je vaginální epitel tvořen pouze několika vrstvami buněk a skládá se především z buněk parabasálních a menších (Post, 1985). Jakmile fena prochází obdobím proestru a dále pak estru, vaginální epitel se z důvodu přípravy na páření zahušťuje a vytváří mnohonásobnou buněčnou vrstvu (Linde and Carlson, 1984). Epiteliální buňky přítomné na stěru se změnily z původních, převážně malých a středně velkých buněk s nižším počtem parabasálních a keratinizovaných buněk na velké množství středně velkých a keratinizovaných buněk (Schutte, 1967; Post, 1985). Ve stěru jsou v hojném počtu přítomny i erytrocyty, obvykle však jejich množství klesá s pokračujícím nástupem estru (Schutte, 1967). Jakmile fena vstupuje do fáze estru, procento keratinizovaných buněk na stěru vzrůstá až do

doby, kdy je dosaženo vrcholu kornifikace a kdy plazmatická koncentrace progesteronu dosahuje hladiny potřebné pro ovulaci (Linde and Carlson, 1984). V estru na stěru obvykle nejsou přítomny erytrocyty ani leukocyty, a v porovnání se stěrem z období proestru a metestru, je v něm obsaženo pouze malé množství nečistot (Schutte, 1967). Na začátku metestru dochází na stěru k přílivu leukocytů a velkému počtu parabasálních a středně malých buněk (Schutte, 1967; Post, 1985). Samotnou vaginální cytologií od sebe nelze rozlišit anestrus a metestrus (diestrus), a proto je vhodné spojit hodnocení vaginální cytologie se sérovou koncentrací progesteronu, která rozliší anestrus a metestrus (diestrus) (Feldman and Nelson, 1996; Johnston et al., 2001). Feny v anestru budou mít odpovídající vaginální cytologii a sérovou koncentraci progesteronu v hodnotách < 1 až 2 ng/ml (Grundy et al., 2002).

7.5 **Progesteronový test**

Stanovení koncentrace progesteronu (P4) z krve je klíčovým nástrojem pro reprodukční management. Vzhledem k výrazné luteinizaci preovulačních folikulů, umožňuje detekce vysokých koncentrací progesteronu (~ 6 ng/ml při ovulaci) (Concannon et al., 1989; Chastant-Maillard et al., 2011) předpovídat období ovulace a naplánovat nakrytí, či umělé oplodnění s předstihem. V porovnání s ovariální ultrasonografií (USG), která bezprostředně umožňuje prokázat folikulární kolaps při ovulaci, progesteronový test správně určí čas ovulace u 85 % fen (Marseloo et al., 2004). Progesteron je dominujícím hormonem během březosti a dlouhotrvajícího metestru (diestru) (Concannon et al., 1975, 1989; Weilenmann et al., 1993). Mimoto, v případě březích fen, diagnóza luteální nedostatečnosti spoléhá pouze na progesteronový test (Root Kustritz, 2001). Období, ve kterém u fen dochází přirozeným pářením k zabřeznutí, se liší od 7 (Johnston et al., 2001) do 10 dní (Concannon et al., 1987). K dosažení březosti je tudíž nezbytné vícenásobné nakrytí. V průběhu každého estrálního cyklu není možné spářit všechny feny několikrát, takže se stanovení optimální doby k páření stává rozhodujícím pro sladění (optimalizaci) plodnosti (Concannon et al., 1989). Měření sérových nebo plazmatických koncentrací progesteronu z krevních vzorků odebraných fenám v proestru a estru je způsob, jak přesně předpovědět období ovulace, zároveň napomáhá k vhodnému rozhodnutí ohledně načasování inseminace u fen, které jsou vyčleněny pouze pro jednorázovou inseminaci. Hodnoty sérového progesteronu (P4) se mezi fenami značně liší a zároveň se liší i u jedné feny, a to s každým estrálním cyklem (England, 1991). Fena je jedinečná v tom, že koncentrace sérového progesteronu začne v periferním krevním oběhu

před ovulací stoupat. Neobvyklé je, že při preovulační luteinizaci roste koncentrace sérového progesteronu zhruba od 1 ng/ml v průběhu anestru a raného proestru (Concannon, 1998) do 4 – 10 ng/ml při ovulaci (Johnston et al., 1994). Hladina progesteronu se rapidně zvýší 15. – 30-den po LH vrochulu a to na hodnoty 15 – 90 ng/ml (Concannon, 1989; Root Kustritz, 2001). Tradičně je sérová koncentrace progesteronu měřena v laboratoři za použití techniky radioimunotestu (RIA, z angl. RadioImmunoAssay) (Fieni et al., 2001). Technika RIA má několik nevýhod - je finančně i časově náročná (Abraham, 1981). Kromě toho, techniku RIA poskytuje veterinární lékař, který vyhodnotí kvantitativní hodnotu a k tomu potřebuje speciální laboratorní vybavení. Techniky jako je například ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) jsou dostupné jako sada. ELISA je levná a snadno proveditelná, není zapotřebí laboratorního vybavení a zároveň tato technika nezabere mnoho času. Touto metodou jsou veterináři poskytnuty pouze kvalitativní nebo semi – kvalitativní výsledky, které jsou méně spolehlivé pro přesné určení ovulace (Hegstad et al., 1993). Alternativní metodou pro přesné a spolehlivé stanovení koncentrace progesteronu v periferním krevním oběhu je tzv. IMMULITE (chemiluminiscence assay). Metoda IMMULITE umožňuje snadné testování krevních vzorků, přičemž je bezpečná, rychlá, přesná a opakovatelná (Boland et al., 2004). Vzorky mohou být poslány poštou bez předchozího odstřeďování nebo jakéhokoli chlazení. Z hlediska výzkumu mohou být zmražené a rozmražené vzorky nadále bez zkreslení používány pro další progesteronové testy. Na rozdíl od jiných domestikovaných druhů zvířat, zejména skotu a koní, lze se vzorky fen manipulovat v různých podmínkách bez ovlivnění výsledků progesteronového testu (Tahir et al., 2013).

7.6 Umělá inseminace

Uplynulo už více než 40 let od první transcervikální inseminace, metoda byla vyvinuta v raných 70 letech 20. století (Andersen, 1972; Andersen, 1975). Tato metoda je často zmiňována jako norská nebo skandinávská a v reprodukci psů se prokázala jako velmi úspěšná (Andersen, 1975; Farstad, 1984; Linde-Forsberg and Forsberg, 1989; Linde-Forsberg and Forsberg, 1993; Farstad, 1996; Linde-Forsberg et al., 1999; Linde-Forsberg, 2001; Thomassen et al., 2001). Metoda umělého oplodnění čerstvým semenem je s velkým úspěchem používána již mnoho let (Harrop, 1954; Linde-Forsberg, 1991). Plodnost je po vložení čerstvého semene do pohlavního traktu dle chovatelů vyhovující a přijatelná (Farstad, 1984; Tsutsui et al., 1988; Linde-Forsberg and Forsberg, 1989; Silva et al., 1996). Výsledky umělé inseminace rozmraženým spermatem bývají obvykle chudší a variabilní (Gill et al.,

1970; Seager and Fletcher, 1973; Seager et al., 1975; Morton and Bruce, 1989; Linde-Forsberg et al., 1999; Rota et al., 1999). Umělé oplodnění a zmrazování spermatu je pro chovatele celosvětově dostupné a poptávka po zamraženém spermatu se během velké mezinárodní výstavy psů zvyšovala. Sperma psů, kteří pocházejí z Evropy a stejně tak i z Ameriky a Austrálie, bylo kryoprezervováno na Světové výstavě psů ve švédském Stockholmu v roce 2008, dále toto sperma mělo být použito k pozdější umělé inseminaci skandinávských fen. Čerstvé, chlazené sperma je stále častěji využíváno jako alternativa páření, v případě že je nedostatek času pro umělou inseminaci a není - li dopravní vzdálenost příliš velká, je použito zmražené sperma (např. fena je již v estru). Pro čerstvé sperma jsou vyvíjena nová komerční rozpouštědla (diluents), která budou moci umožnit skladování chlazeného spermatu po několik dní, což odstraní transportní vzdálenost jako překážku k umělé inseminaci čerstvým spermatem (Verstegen, 2008). Pro úspěšnost umělé inseminace je důležité provádět inseminaci ve vhodný čas, použít kvalitní semeno a zavést sperma na optimální místo k oplodnění (Thomassen and Farstad, 2009). Oplodnění rozmraženým spermatem vyžaduje správné načasování vzhledem ke kratší životnosti spermie, proto by se inseminace měla provádět 2 – 3 dny po předpokládané ovulaci a to na základě měření sérové koncentrace progesteronu (Thomassen et al., 2006). Přirozené páření zajišťuje nitroděložní uložení značné části ejakulátu, díky transportu spermií z pochvy skrz děložní kanál v průběhu svázání. U psovitých jsou k dispozici tři nebo čtyři hlavní techniky umělého oplodnění. Sperma může být umístěno hluboko do pochvy nebo do dělohy buďto transcervikální katetrizací nebo chirurgicky, případně intratubálně (intratubal), což taktéž vyžaduje chirurgický zákrok (Thomassen and Farstad, 2009). Použití zamraženého psího spermatu je prospěšné z hlediska záchrany genetického potenciálu ohrožených plemen a pracovních psů, k záchraně genetického materiálu před léčbou v případě nemoci u samce a z hygienických důvodů (Lévy and Fontbonne, 2007). Obecně se předpokládá, že inseminace zmraženým spermatem v kraniální části pochvy vede k malé míře březosti (Linde-Forsberg, 1991; Silva et al., 1996; Linde-Forsberg et al., 1999). Přijatelných výsledků bylo dosaženo po vyvinutí transcervikální děložní inseminace (Andersen, 1975).

7.6.1 **Vaginální umělá inseminace**

Vaginální umělá inseminace může být provedena za použití jednoduchého plastového katetru, jako je například proplachovací děložní katetr používaný u skotu, zkrácený na vhodnou délku. K němu je připojena jednorázová injekční stříkačka obsahující semeno, případně je možné takto připravené katetry zakoupit od komerčních dodavatelů. Fena při

vložení pipety stojí na vyšetřovacím stole a pipeta se vkládá do spodní části pochvy, blízko k děložnímu krčku. Během inseminace a až 10 minut po inseminaci držíme fenu za zadní končetiny hlavou dolů, abychom zabránili vyloučení semene zpětným tokem. Nicméně, snížení intervalu zvednutých končetin na 1 minutu neovlivňuje plodnost (Pinto et al., 1998). Některé komerční katetry mají pružnou latexovou trubici, jejíž špička je nafukovací. Pokud je špička nafouknutá, vytvoří balonek, který zabraňuje zpětnému toku spermatu. Takovéto katetry jsou konstruovány tak, aby napodobily psí penis při svázání, a jsou určeny ke zvýšení pravděpodobnosti nitroděložní přepravy semene (Théret et al., 1987; Nizanski, 2006).

7.6.2 **Nitroděložní inseminace za pomoci chirurgického zákroku**

Chirurgická a laparoskopická inseminace jsou metody, které zajišťují řádné uložení semene v děloze (Smith and Graham, 1984; Hutchison, 1993; Brittain et al., 1995; Silva et al., 1995; Hutchison, 1997). Tato metoda je preferována v Severní Americe a částečně v Evropě. V tomto případě obvykle stačí jednorázové uložení spermatu. Inseminace chirurgickým zákrokem je dle výsledků perfektní, ale vědecké publikace zveřejňují informace o této metodě vzácně. Příkladem z roku 2004 je inseminace 157 fen anglického chrta na soukromé klinice ve Velké Británii. Míra porodu byla u inseminovaných fen 92 % a v průměru bylo 7 štěňat na jednu inseminaci, u přirozeného oplodnění byla míra porodu 81 % a 5 štěňat v jednom vrhu. Většina evropských zemí bere v případě použití invazivní metody v potaz welfare zvířat, protože dnes jsou k dispozici metody neinvazivní (Boland, 2004).

7.7 **Embryo transfer a metody in vitro fertilizace (IVF)**

Primární rolí embryo transferu (ET) je umožnění produkce geneticky specifických jedinců a to zejména u neplodných fen nebo u takových, které nemohou mít vlastní štěňata. U skotu a koní je genetické šlechtění metodou ET již úspěšně zavedeno. Avšak ET u fen je úspěšný pouze experimentálně (Kinney et al., 1979; Kraemer et al., 1989). Načasování LH a ovulace je pro produkci embryí a ET zásadní. Typickou metodou pro správné načasování je stanovení koncentrace progesteronu (použití techniky RIA), začínající 7. – 8. den po nástupu proestru, se vzorky odebíranými každý druhý den až do příslušné LH vlny. Na základě techniky RIA, koncentrace progesteronu v krvi je před LH vlnou 0,5 – 2 ng/ml, s rostoucí koncentrací LH se souběžně zvyšuje koncentrace progesteronu v krvi až na 3 ng/ml a začíná ovulace. Po LH vlně se míra zvýšení progesteronu mezi jednotlivci liší (de Gier et al., 2006),

v souladu s vývojem folikulů a reakcí na LH. U psů je ET možný buď chirurgickou (intratubálně za použití skleněného kateru) nebo nechirurgickou cestou (Tsutsui et al., 2001). Dalším chirurgickým přístupem je nitroděložní umístění embryí. Nejpraktičtějším přístupem (pro široké klinické využití) je transcervikální umístění embryí (Fayrer-Hosken, 2007).

Reprodukční technologie in vitro jsou užitečné nejen pro feny, ale i pro ohrožené psovité šelmy (Hewitt and England, 2001; Otoi et al., 2002). Mahi and Yanagimachi (1976) učinili první pokus provedení IVF u fen a dosáhli přibližně 20 – 30 % hodnoty oplození, což ohodnotili dle přítomnosti zvětšujících se jader spermií uvnitř vajíčka. Songasen et al. (2002) inseminoval oocyty kultivované in vitro a zjistil, že spermie pronikly do 34 % oocytů. Běžné oplození (hodnoceno dle přítomnosti dvou jader a jednoho ocásku spermie v cytoplazmě) bylo zpozorováno pouze u 4 % oocytů. V této studii, autoři získali 7 embryí raného stádia (2 – 12 buněk) po in vitro fertilizaci 85 oocytů.

U novější studie bylo dosaženo 30 % oplození oocytů, z nichž polovina byla oplodněna polyspermaticky. V této studii bylo také uvedeno, že celková míra oplození byla vyšší u fen ve folikulární (42,5 %) a anestrické (34,3 %) fázi, než v luteální (18,6 %). Celkový embryonální vývoj byl 10 %, přičemž žádné z rozvíjejících se embryí nedosáhlo 8 – buněčného stádia (Rodrigues et al., 2004). V posledních letech byl v oblasti asistované reprodukce savců učiněn velký pokrok; technika IVF je využívána v různých reprodukčních biotechnologiích, např. klonování (Kato et al., 1998; Shin et al., 2002) a zakládání embryonálních kmenových buněk (Thomson et al., 1998; Suemori et al., 2001), avšak IVF zralých oocytů z podmínek in vitro nebyla u fen tak úspěšná, jako u jiných druhů zvířat (např. hospodářských a laboratorních) (Yamada et al., 1992; Otoi et al., 2000; England et al., 2001; Rodrigues et al., 2004). Až do roku 2000 existovala pouze jedna studie popisující vývoj blastocystu z in vitro fertilizace psích oocytů (Otoi et al., 2000).

7.8 USG a RTG diagnostika březosti

Ultrasonografie je bezpečná a přesná metoda pro diagnostiku březosti. Do dnešního dne nebyla identifikovaná žádná rizika ani u pacienta, ani u obsluhujícího pracovníka (Miles, 1995). USG je důležitým nástrojem u klinických reprodukčních studií fen, pro posuzování ovulace, březosti, ztráty embrya a šestinedělí (England and Russo, 2006; Davidson and Baker, 2009). Včasné a přesné stanovení gestačního věku za použití USG je užitečné pro stanovení data porodu, řízení porodu a plánování císařského řezu. Ultrasonografické vyšetření může být

použito k potvrzení gravidity již 17 dní po LH vlně (England et al., 1990; Yeager and Concannon, 1990; Yeager et al., 1992; England et al., 1993). Embryo roste lineárně, v průměru o 1 mm denně od 17 – 30 dnů po LH vlně (England, 1998), po které je tempo růstu embrya exponenciální (Yeager and Concannon, 1996). Dohromady jsou popsány tři typy diagnostických ultrazvuků; A-mode, Dopplerův a B-mode (Allen and Meredith, 1981; Bondestam et al., 1984; Toal et al., 1986; Concannon et al., 1989; Miles 1995; England and Allen, 1990; England et al., 1990; Yeager et al., 1992). A-mode nebo také amplitudový hloubkový ultrazvuk označuje přítomnost tekutiny. Nemůže určit její původ, ani neumožňuje hodnocení životaschopnosti plodu a jejich počet (Allen and Meredith, 1981; Toal et al., 1986; Miles 1995). Dopplerův ultrazvuk poskytuje zvukový signál rozpoznávající tlukot srdce plodu, ale neposkytuje žádnou informaci o počtu plodů nebo přesnější informace týkající se životaschopnosti fétu (Allen and Meredith, 1981). Z těchto důvodů se tyto techniky u feny provádějí jen velmi vzácně (Root Kustritz, 2005). B-mode nebo také ultrazvuk v reálném čase, umožňuje posouzení stavu březosti, počet plodů a jejich životaschopnost, dále umožňuje vyšetření dělohy a reprodukčních břišních struktur. Doporučuje se nechat fenu před procedurou nevymočenou, aby měla obsluhující osoba možnost nalézt močový měchýř jako kaudální orientační bod v dutině břišní (Miles, 1995). Plodové váčky mohou být viditelné již v 19. – 20. dni březosti, zároveň však mohou být tyto malé váčky naplněné tekutinou zastřeny střevními plyny, proto se doporučuje, aby se posouzení březosti provádělo nejdříve v 25. dni gravidity (Concannon et al., 1989; England and Allen, 1990; Yeager et al., 1992). Tlukot srdce plodů byl viditelný od 23. - 28. dne březosti (Concannon et al., 1989; England et al., 1990; Yaeger et al., 1992), pohyby byly zaznamenány 34. - 36. den (Yeager et al., 1992). Sonografie není vhodnou metodou pro stanovení velikosti vrhu. Omezené sledovací okno vytvořené převodníkem a klikatou povahou děložních rohů znemožňuje průběžné hodnocení rohů. Pro posouzení množství plodů, bylo zjištěno, že je ultrazvuk přesný v 31,8 – 36 % případů, s nadhodnocením malých vrhů a s podhodnocením vrhů velkých (Bondestam et al., 1984; Toal et al., 1986; England and Allen, 1990).

Obrázek 6 – B-mode USG gestačního váčku 36 dní před porodem. (A) Latero – laterální interní (LLI) a dorso – ventrální interní (DVI) průměry. (B) Latero – laterální externí (LLE) a dorso – ventrálně externí (DVE) průměry. Plod uvnitř gestačního váčku (Miranda and Domingues, 2010).

Pro dosažení RTG diagnostiky březosti, musí nastat mineralizace skeletu. Před mineralizací je zvětšená březí děloha nerozpoznatelná od dělohy, u které jsou pozorována onemocnění. Nebezpečí ionizujícího záření na plody je úměrné dávce přijaté a gestačnímu věku; plody jsou nejvíce citlivé na škodlivé účinky ionizujícího záření v průběhu organogeneze, ke které dochází v průběhu prvního trimestru gravidity (Miles, 1995). Kostry plodů jsou viditelné od 44. dne březosti (Concannon and Rendano, 1983; Toal et al., 1986; Concannon et al., 1989). RTG není tak přesným ukazatelem životaschopnosti plodů jako USG. Pokud by byly plody mrtvé ≥ 24 hodin, známky smrti, včetně přítomnosti plynu uvnitř nebo kolem plodu, kolaps axiálního skeletu nebo překrytí lebečních kostí mohou být zřejmé. Stupeň fetální mineralizace může být využit k posouzení gestačního věku a k předpovědi data porodu. Jsou – li například na laterální projekci RTG viditelné zuby plodu, porod bude následovat v průměru o 4 dny později (Rendano, 1983). Ventrodorsální RTG může poskytnout další informace, např. nám pomáhá posoudit velikost pánevního kanálu ve vztahu k velikosti hlavičky plodu (Rendano, 1983; Toal et al., 1986).

8 Závěr

Vývoj a výzkum biotechnologických metod u fen je ve srovnání s jinými zvířaty velmi pomalý. Vaginální cytologii lze považovat za nejhoněji využívanou metodu, jelikož je lehce proveditelná v domácím prostředí a také je poměrně levná. Hojně využívaná je i metoda progesternového testu; k RIA progesteronovému testu je zapotřebí laboratorní techniky, což je finančně i časově náročné. Pro chovatele je tudíž vhodnější ELISA a IMMULITE, což jsou varianty, které chovatelům ušetří čas, jsou snadno proveditelné a se vzorky je možné maniplovat bez omezení. USG a RTG jsou hodně využívané metody, které mohou sloužit k detekci březosti. Nejsou zdraví škodlivé, jsou rychlé a neinvazivní. Metody transferu jader somatických buněk nelze adekvátně využít ke komerčním účelům a zatím je omezena pouze na vědecké laboratoře.

Metody, které se momentálně v reprodukci fen využívají, jsou poměrně dobře rozvinuté, ale stále je co zlepšovat, jelikož ne všechny dosahují žádoucích výsledků, což je způsobeno velmi komplikovanou anatomií a fyziologií fen. To se týká zejména metod *in vitro* maturace, embryo transferu a *in vitro* fertilizace, které mají u fen poměrně malý úspěch.

Některé procedury jsou finančně nákladné, protože je k jejich provádění třeba drahého vybavení, proto by se měl výzkum zaměřit na vývoj biotechnologií, při kterých si vědci vystačí se základním, případně komerčním vybavením.

9 Seznam literatury

Abraham, G. E. 1981. The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology. In: Abraham, G. E. editor. Radioassay systems in clinical endocrinology. Books on Demand. New York. p. 687. ISBN: 9780783708522.

Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nature Genetics. 28. 92–95.

Allen, W. E., Meredith, M. J. 1981. Detection of pregnancy in the bitch: a study of abdominal palpation, A-mode ultrasound and Doppler ultrasound techniques. Journal of Small Animal Practice. 22. 609–22.

Allen, W. E. 1985. Abnormal vaginal cytology in a fertile bitch. Journal of Small Animal Practice. 26. 343–347.

Andersen A. C., Simpson M. E. 1973. Ovarian development, from birth to puberty. 48-102. In: Geron-X Inc (Ed.), The Ovary and the Reproductive Cycle of the Dog (Beagle). Los Altos, California. p. 290. ISBN: 0876760076.

Andersen K. B. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. Zuchthygiene 10. 1-4.

Andersen K. B. 1972. Fertility of frozen dog semen. Acta Veterinaria Scandinavica. 13. 128–30.

Barmat, L. I., Worrilow, K. C., Paynton, B. V. 1997. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. Fertility and Sterility. 67. 775–779.

Bolamba, D., Bordern-Russ, K. D., Durrant, B. S. 1997. In vitro maturation of dog oocytes derived from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid: bovine serum albumin and fetal calf serum are not essentials. Biology of Reproduction. 1. 96.

Boland, P., Potts, G., Chapwanya, A., Vangen, M. 2004. The Whelping Rate and Litter Size of 157 surgical artificial inseminations with frozen semen in racing and coursing Greyhounds. In: Congress S.I.R.A. p. 37–38.

Boland, P. 2004. Surgical insemination and other ways. In: The fourth congress of the European veterinary society for small animal reproduction, Barcelona, Spain, July 4–6th; 2004 [oral press].[46] The Kennel Club (UK). Policy statement on surgical artificial insemination.

Bondestam, S., Karkkainen, M., Alitalo, L., Forss, M. 1984. Evaluating the accuracy of canine pregnancy diagnosis and litter size using real-time ultrasound. Acta Veterinaria Scandinavica. 25. 327–332.

Bongso, A., Ng, S. C., Fong, C. Y., Ratnam, S. 1991. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. Fertility and Sterility. 56. 179–191.

Bouchard, G., Youngquist, R. S., Vaillancourt, D., Krause, G. F., Guay, P., Paradis, M., 1991. Seasonality and variability of the interestrous interval in the bitch. Theriogenology 36. 41–50.

Bowles, J., Koopman, P. 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development. 134. 3401-3411.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science. 312. 596-600.

Brittain, D., Concannon, P. W., Flanders, J. A., Flahive, W. J., Lewis, B. L, Meyers-Wallen, V. 1995. Use of surgical intrauterine insemination to manage infertility in a colony of research German shepherd dogs. Laboratory Animal Science. 45. 404–407.

Budras, K. D., McCarthy, P. H., Fricke, W., Richter, R., Horowitz, A., Berg, R. 2007. Anatomy of the Dog. 5 ed. Hannover. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH. p. 218. ISBN: 978389990184.

Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science. 280. 1256–1258.

Cobb, L. M. 1959. The radiographic outline of the genital system of the bitch. Veterinary Record. 71. 66-68.

Concannon, P., England, G., Farstad, W., Linde-Forsberg, C., Lopes, M. D., Verstegen, J., Kastelic. J., 2006a: Basic and applied research on reproduction of domestic, exotic and endangered carnivores. Theriogenology 66. 1407–1809.

Concannon, P., England, G., Verstegen, J., Doberska, C. 1997. Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores. The Journals of Reproduction and Fertility Ltd. Cambridge. p. 372. ISBN 0906545315.

Concannon, P., England, G., Verstegen, J., Farstad, W., Linde-Forsberg, C., Doberska, C. 2001a. Advances in Dog, Cats and Exotic Carnivore Reproduction. The Journals of Reproduction and Fertility Ltd. Cambridge. p. 450. ISBN: 9780906545379.

Concannon, P., England, G., Verstegen, J., Russell, H. 1993. Fertility and Infertility of Dogs, Cats and Non-Domestic Carnivores. The Journals of Reproduction and Fertility Ltd, Cambridge. p. 569. ISBN 0906545269.

Concannon, P., Tsutsui, T., Shille, V., 2001b. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility. 57. 159–169.

Concannon, P. W. 1989. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 149–160.

Concannon, P. W. 1993. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 23–27.

Concannon, P. W. 2009. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. Reproduction in Domestic Animals. 44. 3–15.

Concannon, P. W., McCann, J. P., Temple, M. 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 3–25.

Concannon, P. W., Rendano, V. 1983. Radiographic diagnosis of canine pregnancy: onset of fetal skeletal radiography in relation to times of breeding, preovulatory luteinizing hormone release, and parturition. American Journal of Veterinary Research. 44. 1506–1511.

Concannon, P. W., Temple, M., Montanez, A., Newton, L. 2006b. Effects of dose and duration of continuous GnRH-agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. Theriogenology. 66. 1488–1496.

Concannon, P. W., Weinstein, P., Whaley, S., Frank, D. 1987. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. Journal of Reproduction and Fertility. 81. 175–180.

Concannon, P. W. 1986. Canine pregnancy and parturition. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 16. 453–475.

Concannon, P. W. 1998. Physiology of canine ovarian cycles and pregnancy. In: Linde-Forsberg, C. 1998. Advances in canine reproduction. CRB Report 3. Uppsala. p. 9–20.

Concannon, P. W., Butler, W. R., Hansel, W., Knight, P. J., Hamilton, J. M. 1978. Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin. Biology of Reproduction. 19. 1113-1118.

Concannon, P. W. 2004. Canine breeding management and artificial insemination: techniques and caveats. In: 29th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhodes.

Concannon, P. W. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch, Animal Reproduction Science. 124. 200–210.

Concannon, P. W., Altszuler, N., Hampshire, J., Butler, W. R., Hansel, W. 1980. Growth hormone, prolactin and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. Endocrinology 106. 1173–1177.

Concannon, P. W., Hansel, W., Visek, W. J., 1975. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. Biology of Reproduction. 13. 112–121.

Concannon, P. W., McCann, J. P., Temple, M., 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. In: Concannon, P. W., Morzon, D. B., Weir, B. J. Dog and Cat reproduction, contraception and artificial insemination. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 3–25.

Concannon, P. W., Weigand, N., Wilson, S., Hansel, W., 1979. Sexual behavior in ovariectomized bitches in response to estrogen and progesterone treatments. Biology of Reproduction. 20. 799–809.

Davidson, A. P. 2004. Controversies in ovulation timing in the bitch. Proceedings, ACVIM 22nd Ann. Veterinary Medicine Forum.

Davidson, A. P. 2007. Endoscopy as a tool in assessing the reproductive tract in bitches and queens. In: Compendium of the Norwegian school of veterinary science postgraduate continuing education course in canine and feline reproduction, obstetrics and neonatology, Oslo.

Davidson, A.P., Baker, T.W., 2009. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. Topics in Companion Animal Medicine. 24, 55–63.

de Gier, J., Kooistra, H. S., Djajadiningrat-Laanen, S. C., Dieleman, S. J., Okkens, A. C. 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone,estradiol-17beta, progesterone, prolactin and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory,and early luteal phase in the bitch. Theriogenology. 65. 1346–1359.

Durrant, B. S., Pratt, N. C., Russ, K. D., Bolamba, D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. Theriogenology. 49. 917–932.

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. Endocrine Reviews. 30. 624-712.

Ellegren, H. 2005. Genomics: the dog has its day. Nature. 438. 745–746.

England, G., Russo, M., Freeman, S. L. 2009. Follicular dynamics, ovulation and conception rate in bitches. Reproduction in Domestic Animals. 44. 53-58.

England, G. 1992. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. Journal of Small Animal Practice. 33. 577– 582.

England, G., Verstegen, J. P., Hewitt, D. A. 2001. Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. Veterinary Record. 148. 20–22.

England, G., Allen, W. E., Porter, D. J. 1990. Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age. Journal of Small Animal Practice. 31. 324–329.

England, G., Allen, W. E. 1990. Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: diagnosis of early pregnancy and the number of conceptuses. Journal of Small Animal Practice. 31. 321–323.

England, G., Yeager, A. E. 1993. Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 107.

England, G. 1991. ELISA determination of whole blood and plasma 236 progestogen concentrations in bitches. Veterinary Record. 129. 221–222.

England, G. 1998. Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 28. 849–868.

England, G., Russo, M. 2006. Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. Theriogenology. 66. 1694–1698.

Evans, H. M., Cole, H. H. 1931. An introduction to the study of the oestrous cycle in the dog. Memorial University. 9. 65–118.

Evans, J. M., Savage, T. J. 1970. The collection of vaginal smears from bitches. Veterinary Record. 87. 598–599.

Farstad, W., Andersen, K. B. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 289-292.

Farstad, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. Journal of Small Animal Practice. 25. 561–565.

Farstad, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Anim Reprod Sci. 42. 251–260.
Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. Theriogenology. 53. 175-186.

Fayrer-Hosken, R. 2007. Embryo transfer in the dog and cat. Theriogenology. 68. 382–385.

Feldman, E. C., Nelson, R. W. 1996. Ovarian cycle and vaginal cytology. p. 526-546. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Saunders Company. Philadelphia. p. 1104. ISBN: 0721693156.

Feldman, E. C., Nelson, R. W. 2004. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Saunders Company. Philadelphia. p. 1104. ISBN: 0721693156.

Ferguson, J. M., Renton, J. P., Farstad, W., Douglas, T. A. 1989. Insemination of beagle bitches with frozen semen. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 293-298.

Fieni, F., Martal, J., Marnet, P. G., Siliart, B., Riou, M. 2001. Hormonal variations in bitches after early or mid pregnancy termination with aglepristone (Ru 534). Journal of Reproduction and Fertility. 57. 243–248.

Galli, C., Lagutina, I., Crotti, G., Colleoni, S., Turini, P., Ponderato, N. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. Nature. 424. 635.

Gill, H. P., Kaufman, C. F., Foote, R. H., Kirk, R. W. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. American Journal of Veterinary Research. 31. 1807–1813.

Gobello, C., Castex, G., Corrada, Y. 2002. Use of cabergoline to treat primary and secondary anestrus in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association. 11. 1653–1654

Goodman, M. 2002. Demystifying ovulation timing. Clinical Techniques in Small Animal Practice. 17. 97–103.

Gralinski, M. R. 2003. The dog's role in the preclinical assessment of QT interval prolongation. Toxicologic Pathology. 31. 11–16.

Grundy, S. A., Feldman, E. C., Davidson, A. 2002. Evaluation of Infertility in the Bitch. Clinical Techniques in Small Animal Practice. 17. 108-115.

Harrop, A. E. 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. British Veterinary Journal. 110. 424–425.

Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. 2000. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. Journal of Veterinary Medical Science. 62. 243–248.

Heape, W. 1897. Artifical insemination of mammals and the subsequent fertilisation or impregnation of their ova. Proceedings of the Royal Society. 61. 52-63.

Hegstad, R. L., Johnston, S. D., Pasternak, D. M. 1993. Concentrations and pulse analyses of adrenocorticotrophin and luteinizing hormone in plasma from dogs in pro-oestrus, oestrus, dioestrus or anoestrus. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 77–84.

Hewitt, D. A., England, G. 2001. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. Journal of Reproduction and Fertility. 57. 111–125.

Hewitt, D. A., England, G. 1997. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of the domestic bitch. Journal of Reproduction and Fertility. 51. 83–91.

Hewitt, D. A., England, G. 1999a. Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. Veterinary Record. 144. 237–239.

Hewitt, D. A., England, G. 1998a. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. Theriogenology. 49. 957–966.

Hewitt, D. A., Watson, P. F., England, G. 1998. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. Theriogenology. 49. 1083–1128.

Hossein M. S., Jeong Y. W., Park, S. W., Kim, J. J., Lee, E., Ko, K. H., Hyuk, P., Hoon, S. S., Kim, Y. W., Hyun, S. H., Shin, T., Hwang, W. S. 2009. Birth of Beagle dogs by somatic cell nuclear transfer. Animal Reproduction Science. 114. 404–414.

Hutchison, R. V. 1997. Maximizing conception rates using fresh cooled or frozen canine semen. In: Proceedings of the canine male reproduction symposium. 61–70.

Hutchison, R. V. 1993. Vaginal & surgical intra-uterine deposition of semen. In: Proceedings of the canine theriogenology short course. 33–37.

Chastant-Maillard, S., Viaris de Lesegno, C., Chebrout, M., Thoumire, S., Meylheuc, T., Fontbonne, A., Chodkiewicz, M., Saint-Dizier, M., Reynaud, K. 2011. The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. Reproduction Fertility and Development. 23. 391–402.

Christiansen, I. J. 1984. Reproduction in the dog and cat. Tindah Bailliere. London, p. 320. ISBN: 0721609740.

Christie, D. W., Bell, E. T. 1971. Journal of Small Animal Practice. 12. 159.

Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G. 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 67. 941–947.

Jang, G., Hong, S. G., Oh, H. J., Kim, M. K., Park, J. E., Kim, H. J., Kim, D. Y., Lee, B. C. 2008b. A cloned toy Poodle produced fromsomatic cells derived from an aged female dog. Theriogenology. 69. 556–563.

Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. 2007. Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer. Theriogenology. 67. 941–947.

Jedruch, J., Gajewski, Z., Ratajska-Michalczak, K. 1989. Uterine motor responses to an alfa2-adrenergic agonist medetomidine hydrochloride in the bitches during the end of gestation and the post-partum period. Acta Veterinaria Scandinavica. 85. 129-134.

Jedruch, J., Gajewski, Z. 1986. The effect of detomidine hydrochloride (Domosedan) on the electrical activity of the uterus in cows. Acta Veterinaria Scandinavica. 82. 189-192.

Jeffcoate, I. A. 1993. Endocrinology of anoestrous bitches. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 69–76.

Johnston, S. D., Olson, P. N, Root, M. V. 1994. Clinical approach to infertility in the bitch. Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. 9 (1). 2–6.

Johnston, S. D, Root Kustritz, M. V., Olson, P. N. 2001. The canine estrus cycle. p. 16-31. In: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Saunders Company. Philadelphia. p. 1104. ISBN: 0721693156.

Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. N. S. 2001. Breeding management and AI of the bitch. p. 41-65. In: Kersey, R, 2001. Canine and feline theriogenology. Saunders Company. Philadelphia. p. 592. ISBN: 9780721656076.

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science. 282. 2095–2098.

Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J., Hwang W. S. 2007. Endangered wolves cloned from adult somatic cells. Cloning Stem Cells. 9. 130 –137.

Kinney, G., Pennycook, J., Schriver, M., Templeton, J., Kraemer, D. 1979. Surgical collection and transfer of canine embryos. Biology of Reproduction. 20. 170.

Kirk, A. D. 2003. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. Immunological Reviews. 196. 176–196.

König, H. E., Liebich, H. 2002. Anatomie domácích savců 2. díl Splanchnologie, cévní a nervová soustava. Hajko & Hajková. Bratislava. ISBN: 80888700574.

Kooistra, H. S., Okkens, A. C., Bevers, M. M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S. J., Schoemaker, J. 1999a. Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and folliclestimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. Biology of Reproduction. 60. 65–71.

Kooistra, H. S., Okkens, A. C, Bevers, M. M., Popp-Snijders, C., van Haaften, B., Dieleman, S. J., Schoemaker, J. 1999b. Bromocriptine- induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. J Reproduction Fertility and Development. 117. 387–393.

Kraemer, D., Kinney, G., Schriver, M. 1989. In: Embryo transfer in dogs and cats. Embryo transfer and in vitro fertilization. Second World Conference. 223–233.

Lagerstedt, A. S., Obel, N. 1987. Uterine cannulation in the bitch. Journal of Veterinary Medicine Series. 34. 90-101.

Láznička, A. 1992. Poševní cytologie v diagnostice reprodukčních stavů fen. Vysoká škola veterinární a farmaceutická. Brno. 29 s.

Lee, B. C., Kim, M. K., Jang, G., Oh, H. J., Yuda, F., Kim, H. J. 2005. Dogs cloned from adult somatic cells. Nature. 436. 641.

Lévy, X., Fontbonne, A. 2007. Canine Semen Banking: sanitary and ethical aspects. Legislation Revista Brasileira de Reproduo Animal, Belo Horizonte. 31. 92–107.

Lindblad-Toh, K., Wade, C. M.., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. 438. 803–819.

Linde, C., Karlsson, I. 1984. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. Journal of Small Animal Practice. 25. 77– 82.

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 299–310.

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. 1993. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 313-323.

Linde-Forsberg, C., Holst B. S., Govette, G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen–thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology. 52. 11–23.

Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 21. 467–485.

Linde-Forsberg, C. 2000. Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in dogs. In: Proceedings of the fourth international symposium on canine and feline reproduction. [abstract]. 120.

Linde-Forsberg, C., 2001. Intra-uterine insemination in the dog using the scandinavian trans-cervical catheter and a comparison with other methods. In: Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J. 2001. Recent Advances in Small Animal Reproduction.

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M. P., Gordon, D. 1994. Effects of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilisation and culture in vitro. Molecular Reproduction and Development. 37. 48-55.

Mahi, C. A., Yanagimachi, R., 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. Journal of Experimental Zoology. 196. 189–196.

Marseloo, N., Fontbonne, A., Bassu, G., Riviere, S., Leblanc, B., Rault, D., Biourge, V., Chastant-Maillard, S. 2004. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. 75–77.

Marvan F., 2007. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 9788021316584.

McDougall, K., Hay, M. A., Goodrowe, K. L., Gartley, C. J., King, W. A. 1997. Changes in the number of follicles and of oocytes in ovaries of prepubertal, peripubertal and mature bitches. Journal of Reproduction and Fertility. 51. 25–31.

Metcalfe, S. S. 1999. Assisted reproduction in the bitch. Thesis for the degree of Master of Science, Monash University, Victoria, Australia, p. 160.

Miles, K. 1995. Imaging pregnant dogs and cats. Compendium on Continuing Education. 17. 1217–1226.

Miranda, S. A., Domingues, S. F. S. 2010. Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dogs. Theriogenology. 74. 608–617.

Mol, J., van Garderen, E., Rutteman, G. R., Rijnberk, A., 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 57. 67–71.

Morton, D. B., Bruce, S. G. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 311–316.

Nickson, D. A., Boyd, J. S., Eckershall, P. D., Ferguson, J. M., Harvey, M. J. A., Renton, J. P. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 231–240.

Nizański, W. 2005. Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen–thawed semen. Electronic Journal of Polis Agricultural University. 8.

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.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W., Arthur, G. H. 2001. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics (Eighth Edition), Saunders. London. p. 868. ISBN: 9780702025563.

Okkens, A. C., Bevers, M. M., Dieleman, S. J., Willemse, A. H. 1985. Shortening of the interoestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. Veterinary Quarterly. 7. 173–176.

Okkens, A. C., Kooistra, H. S. 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. Reproduction in Domestic Animals. 41. 291–296.

Onclin, K., Verstegen, J., Silva, L. D. M., Concannon, P. 1995. Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs. Biology of Reproduction. 52. 314.

Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A. C. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. Science. 289. 1188–1190.

Otoi, T., Murakami, M., Fujii, M., Tanaka, M., Ooka, A., Une, S., Suzuki, T. 2000. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. Veterinary Record. 146. 52–53.

Otoi, T., Willingham, L., Shin, T., Kraemer, D. C., Westhusin, M. 2002. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. Reproduction. 124. 775–781.

Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L., Conti, M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. Science. 303. 682–684.

Park, S. K., Keenan, M. W., Selmanoff, M. 1993. Graded hyperprolactinemia first suppresses LH pulse frequency and the pulse amplitude in castrated male rats. Neuroendocrinology. 58. 448–453.

Patterson, D. F. 2000. Companion animal medicine in the age of medical genetics. Journal of Veterinary Internal Medicine. 14. 1–9.

Pfeifer, T. L., Chegini, N. 1994. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins 1–4 in human fallopian tube at various reproductive stages. Biology of Reproduction. 50. 281–289.

Pinto, C. R. F., Eilts, B. E., Paccamonti, D. L. 1998. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. Theriogenology. 50. 301–305.

Post, K. 1985. Canine vaginal cytology during the Estrous Cycle. The Canadian Veterinary Journal. 26. 101–104.

Reece, O. W. 1998. Fyziologie domácích zvířat, 1998, Grada Publishing. Praha. 456 s. ISBN: 8071695475.

Rendano, V. T. 1983. Radiographic evaluation of fetal development in the bitch and fetal death in the bitch and queen. In: Kirk, R. W. Current veterinary therapy VIII. Saunders. Philadelphia. p. 1360. ISBN: 9780721654652.

Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrout, M., de Lesegno, C. V., Chastant-Maillard, S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. Reproduction. 130. 193–201.

Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Viaris de Lesegno, C., Saint-Dizier, M., Chastant-Maillard, S., 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. Theriogenology. 66. 1685–1693.

Robertson, J. B., Srsen, V., King, W. A. 1992. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured in vitro. Proceedings of 12th International Congress on Animal Reproduction. 4. 1808–1810.

Rodrigues, B. A., Dos Santos, L. C., Rodrigues, J. L. 2004. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. Molecular Reproduction and Development. 67. 215–223.

Root Kustritz, M. V. 2005. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. Theriogenology. 64. 755–765.

Root Kustritz, M. V. 2001. Use of commercial luteinizing hormone and progesterone assay kits in canine breeding management. In: Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. Recent Advances in Small Animal Reproduction.

Root Kustritz, M. V. 2001. Use of supplemental progesterone in the management of canine pregnancy. In: Concannon, P. W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. Recent Advances in Small Animal Reproduction.

Roszel, J. F. 1975. Genital cytology of the bitch. Veterinary Scope. 11. 2.

Rota, A., Iguer-Ouada, M., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. 1999. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with of without Equex STM Paste. Theriogenology. 51. 1045–1058.

Sargan, D. R. 2004. IDID: inherited diseases in dogs: web-based information for canine inherited disease genetics. Mammalian Genome. 15. 503–506.

Saunder, S. E., Frager, M., Case, G. D., Kelch, R. P., Marshall, J. C. 1984. Abnormal patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion in women with hyperprolactinemia and amenorrhea: responses to bromocriptine. The Journal of Clinical Endocrinoly and Metabolism. 59. 941–948.

Seager, S. W. J., Fletcher, W. S. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. Veterinary Record. 92. 6–10.

Seager, S. W. J., Platz, C. C., Fletcher, W. S. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. Journal of Reproduction and Fertility. 45. 189–192.

Seidel, G. E. 2002. Genetic and phenotypic similarity among members of mammalian clonal set. In: Cibelli, J., Lanza, P., Campbell, K. H. S., West, M. D. Principal of Cloning. Academic Press. USA/UK. p. 531. ISBN: 9780080492155.

Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. Nature. 415. 859.

Shiu, G. K., LeMarchand, A., Sager, A. O., Velagapudi, R. B., Skelly, J. P. 1989. The beagle dog as an animal model for a bioavailability study of controlled-release theophylline under the influence of food. Pharmaceutical Research. 6. 1039–1042.

Schaefers-Okkens, A. C. 1996: Ovaries. In: Rijnberk, A. Clinical Endocrinology of Dogs and Cats. Springer. Dordrecht, The Netherlands, p. 256. ISBN: 9780792334163.

Schatten, H., Constantinescu, G. M. 2007. Comparative Reproductive Biology. Blackwell. Iowa. p. 412. ISBN: 9780813815541.

Schutte, A. 1967. Canine vaginal cytology. II. Cyclic Changes. Journal of Small Animal Practice. 8. 307–311.

Schutte, A. 1967. Canine vaginal cytology. III. compilation and evaluation of cellular indices. Journal of Small Animal Practice.. 8. 313–317.

Silva, L. D. M., Onclin, K., Lejeune, B., Verstegen, J. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. Veterinary Record. 138. 154–157.

Silva, L. D. M., Onclin, K., Snaps, F., Verstegen, J. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. Theriogenology. 43. 615–623.

Simpson, G. M., England, G. C. W., Harvey, M. 1988. BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. Telford College. Edinburgh. p. 1998. ISBN: 0905214366.

Smith, F. O., Graham, E. F. 1984. Cryopreservation of canine semen: technique and performance. In: Proceedings of the Xth international congress on animal reproduction and AI. 2. p. 216 [abstract].

Smotrich, D. B., Stillman, R. J., Widra, E. A., Gindoff, P. R., Kaplan, P., Graubert, M., Johnson, K. E. 1996. Immunocytochemical localization of growth factors and their receptors in human pre-embryos and Fallopian tubes. Human Reproduction. 11. 184–190.

Songsasen, N., Yu, I., Leibo, S. P. 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. Molecular Reproduction and Development. 62. 407–415.

Soyal, S., Amleh, A., Dean, J. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development. 4645-4654.

Starkey, M. P., Scase, T. J., Mellersh, C. S., Murphy, S. 2005. Dogs really are man’s best friend--canine genomics has applications in veterinary and human medicine! Briefings in Functional Genomics and Proteomics. 4. 112–128.

Stovring, M., Moe, L., Glattre, E. 1997. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. APMIS. 105. 590–596.

Studzinski, C. M., Araujo, J. A., Milgram, N. W. 2005. The canine model of human cognitive aging and dementia: pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry. 29. 489–498.

Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H, Kondo, Y., Iritani, A., Nakatsuji, N. 2001. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. Developmental Dynamics. 222. 273-279.

Sutter, N. B., Ostrander, E. A. 2004. Dog star rising: the canine genetic system. Nature Reviews Genetics. 5. 900–910.

Tahir, M. Z., Thoumire, S., Raffaelli, M., Grimard, B., Reynaud, K., Chastant-Maillard, S. 2013. Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch. Domestic Animal Endocrinology. 45. 141–144.

Tani, H., Inaba, T., Tamada, H., Sawada, T., Mori, J., Torii, R. 1996. Increasing gonadotropin-releasing hormone release by perifused hypothalamus form early to late anestrus in the beagle bitch. Neuroscience Letters. 207. 1–4.

Telfer, E., Gosden, R. G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (Canis familiaris). Journal of Reproduction and Fertility. 81. 137–147.

Theiss, T. 1997. Investigations on the collection, in vitro maturation and-fertilization of dog oocytes. PhD. Ludwig-Maximillian Universit of Munich, Munich, Germany.

Theret, M., Treize, G., Dumon, C. 1987. Artificial insemination of the bitch, using the Osiris gun. Modern Veterinary Practice. 68. 229–230.

Thomassen, R., Farstad, W., Krogenas, A., Fougner, J. A., Berg, K. A. 2001. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study. Journal of Reproduction and Fertility. 57. 341–346.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Berg, K. A., Farstad, W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. Theriogenology. 66. 1645–1650.

Thomassen, R., Farstad, W. 2009. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. Theriogenology. 71. 190–199.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282. 1145–1147.

Toal, R. L., Walker, M. A., Henry, G. A. 1986. A comparison of real-time ultrasound, palpation and radiography in pregnancy detection and litter size determination in the bitch. Veterinary Radiology & Ultrasound. 27. 102–108.

Tsutsui, T., Hori, T., Kawakami, E. 2001. Intratubal transplantation of early canine embryos. Journal of Reproduction and Fertility. 57. 309–314.

Tsutsui, T., Kawakami, E., Murao, I., Ogasa, A. 1989. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: Observations through uterine fistula. Japanese Journal of Veterinary Science. 51. 560-565.

Tsutsui, T., Tezuka, T., Shimizu, T., Murao, I., Kawakami, E., Ogasa, A. 1988. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. Japanese Journal of Veterinary Science. 50. 193–198.

Tsutsui, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 269–275.

Van Haaften, B., Bevers, M. M., Van den Brom, W. E., Okkens, A. C., Van Sluijs, F. J., Willemse, A. H., Dieleman, S. J. 1994. Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. Journal of Reproduction and Fertility. 101. 221–225.

Van Haaften, B., Dieleman, S. J., Okkens, A. C., Bevers, M. M., Willemse, A. H. 1989. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. Journal of Reproduction and Fertility. 39. 330–331.

Verstegen, J. P., Onclin, K., Silva, L. D., Concannon, P. W. 1999. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. Theriogenology. 51. 597–611.

Verstegen, J. P. 2008. In: The sixth international congress on canine and feline reproduction, Vienna. [personal communication].

von Baer, K. E. 1827. De ovi mammalium et hominis genesi. Nabu Press. Charleston, South Carolina. p. 56. ISBN: 1141621339.

Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature. 394. 369 –374.

Weilenmann, R., Arnold, S., Döbeli, M., Rüsch, P., Zerobin, K., 1993. Östradiol und Progesteronkonzentrationen im Plasma von nicht trächtigen Hündinnen während des Sexualzyklus. Schweiz Arch Tierheilkd. 135. 51–57.

Wildt, D. E., Levinson, C. A., Seager, S. W. J. 1977. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. The Anatomical Record. 189. 443-449.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature. 385. 810 –813.

Wilson, M. S. 1993. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 307–311.

Wolf, D. P., Meng, L., Ely, J. J., Stouffer, R. L. 2001. Recent progress in mammalian cloning. Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 15. 235–239.

Woods, G. L., White, K. L., Vanderwall, D. K., Li, G. P., Aston, K. I., Bunch, T. D., Meerdo, L. N., Pate, B. J. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Science. 301. 1063.

Wright, P. J. 1990. Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. Journal of Small Animal Practice. 31. 335–340.

Yamada, S., Shimazu, Y., Kawaji, H., Nakazawa, M., Naito, K., Toyoda, Y., 1992. Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. Biology of Reproduction. 46. 853–858.

Yamada, S., Shimazu, Y., Kawao, Y., Nakazawa, M., Naito, K., Toyoda, Y. 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. 47. 227–229.

Yang, C. X., Kou, Z. H., Wang, K., Jiang, Y., Mao, W. W., Sun, Q. Y., Sheng, H. Z., Chen, D. Y. 2004. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. Reproduction. 127. 201–205.

Yazigi, R. A., Wuintero, C. H., Salameh, W. A. 1997. Prolactin disorders. Fertility and Sterility. 67. 215–225.

Yeager, A. E., Concannon, P. W. 1990. Association between the preovulatory luteinizing hormone surge and the early ultrasonographic detection of pregnancy and fetal heartbeats in Beagle dogs. Theriogenology. 34. 655.

Yeager, A. E., Concannon, P. W. 1996. Ovaries. In: Green, R. W. Small animal ultrasound. Willey. Philadelphia. p. 377. ISBN: 9780397513871.

Yeager, A. E., Mohammed, H. O., Meyers-Wallen, V., Vannerson, L., Concannon, P. W. 1992. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus, and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. American Journal of Veterinary Research. 53. 342–351.