

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Asistovaná reprodukce u psů

Bakalářská práce

Autor práce: Kopecká Iveta

Vedoucí práce: Ing. Tůmová Lenka, Ph.D.

2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Asistovaná reprodukce u psů vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2015

.....

Iveta Kopecká

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Tůmové Lence, Ph.D. za její ochotu a laskavost při odborném vedení práce, věcné připomínky a čas věnovaný dobrým radám při jednotlivých konzultacích.

Asistovaná reprodukce u psů

Abstrakt

Pes patří mezi člověkem největší a nejdéle domestikované šelmy a zaujímá v jeho životě nepostradatelné místo. Pro zachování živočišného druhu je nezbytnou podmínkou jeho schopnost rozmnožovat se. Ke zvýšení úspěšnosti rozmnožování přispívají v posledních desetiletích i metody asistované reprodukce.

Mezi nejrozšířenější metody asistované reprodukce u psů patří umělá inseminace. Ta může být prováděna několika způsoby v závislosti na místě deponace semene v pohlavním traktu feny (intravaginální, transcervikální intrauterinní, intratubulární inseminace). Uskutečněna může být za použití nativního, chlazeného či mraženého semene. Způsob provedení inseminace ovlivňuje úspěšnost samotného zabřezávání. Obecně lze říci, že nejúspěšnější bývá provedení intratubulární inseminace čerstvým spermatem.

Další metodou je reprodukce za pomoci *in vitro* oplození oocyty a následného embryotransferu. Úspěšnost této metody je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří například způsob odběru pohlavních buněk, způsob jejich uchovávání, složení kultivačních médií, mechanismy regulující jaderné zrání oocytů a jiné. Je zřejmé, že je potřeba dalších výzkumů, které povedou k pochopení molekulárních mechanismů, které řídí zrání oocytů a embryonální vývoj u psů.

Poměrně novou metodou reprodukčních biotechnologií je přenos jádra somatické buňky do oocyty zbaveného vlastní genetické informace, tzv. klonování. Tato technologie prozatím nedosahuje významnějších úspěchů.

Metody asistované reprodukce u psů ztěžuje celkově fyziologie reprodukčního systému, ale také obtížnější způsob získávání oocytů či embryí a posléze nalezení vhodné příjemkyně. Klíčovým se zdá být nalezení vhodnějšího řešení pro dlouhodobé skladování gamet. Dosažení úspěšného zmrazení spermií a kryokonzervace oocytů by vedlo k většímu využití reprodukčních technologií.

Studie zabývající se asistovanou reprodukcí psů přispívají mimo jiné k celkovému pochopení reprodukčních mechanismů. Získané znalosti mohou umožnit zachování cenných psích genotypů *in vitro*.

Klíčová slova: *in vitro* zrání, pes, umělá inseminace, *in vitro* fertilizace

Assisted reproduction in dogs

Abstract

The dog is among the largest and longest man domesticated beast and holds in his life indispensable place. To preserve the species is a precondition for its ability to reproduce. To increase the success rate of reproduction contribute in recent decades and methods of assisted reproduction.

Among the most common methods of assisted reproduction in dogs include artificial insemination. This can be done in several ways depending on the site deposit seed in genital tract of female (intravaginal, transcervical intrauterine, intratubular insemination). It can be carried out using native, chilled or frozen semen. Insemination process itself affects the success of pregnancy rates. Generally, that is the most successful design insemination with fresh semen intratubular.

Another method is assisted reproduction in vitro oocyte fertilization and subsequent embryo transfer. The success of this method is dependent on many factors, among which include the sampling of gametes method of storage, the composition of culture media, mechanisms regulating nuclear oocyte maturation and others. It is evident that the need of further research, leading to the understanding of the molecular mechanisms that control oocyte maturation and embryonic development in dogs.

A relatively new method of reproductive biotechnology is somatic cell nuclear transfer into an oocyte depleted own genetic information called cloning. This technology does not achieve major success so far.

Methods of assisted reproduction in dogs hinders overall physiology of the reproductive system, but also more difficult method of obtaining oocytes and embryos, and then find the appropriate recipient. The key seems to be to find a more suitable solution for long term storage of gametes. Achieving successful freezing of sperm and oocyte cryopreservation would lead to greater use of reproductive technologies.

Studies on assisted reproduction in dogs are among other things contributing to overall understand of reproductive mechanisms. Acquired knowledge may enable the conservation of valuable dog genotypes in vitro.

Keywords: *in vitro* maturation, dog, artificial insemination, *in vitro* fertilization

Obsah

1.	Úvod	6
2.	Cíl práce	7
3.	Literární přehled	8
3.1.	Anatomie pohlavní soustavy	8
3.1.1.	Anatomie pohlavní soustavy psa	8
3.1.2.	Anatomie pohlavní soustavy feny	10
3.2.	Vývoj pohlavních buněk a pohlavní cyklus	13
3.2.1.	Vývoj samčích pohlavních buněk	13
3.2.2.	Vývoj samičích pohlavních buněk	14
3.2.3.	Pohlavní cyklus	17
3.3.	Plodnost	18
3.4.	Asistovaná reprodukce u psů	19
3.4.1.	Umělá inseminace (AI)	19
3.4.2.	<i>In vitro</i> zrání a <i>in vitro</i> oplození oocyty (IVM, IVF)	31
3.4.3.	Přenos embryí / embryotransfer (ET)	38
3.4.4.	Přenos jádra somatické buňky (SCNT)	39
4.	Závěr	40
5.	Seznam použité literatury	41
6.	Seznam použitých zkratk	43

1. Úvod

Pes domácí (*Canis lupus familiaris*) se řadí mezi psovitě šelmy. Předpokládá se, že jediným společným předkem psa domácího je vlk obecný (*Canis lupus*), jehož domestikace byla zahájena již před více než 14.000 lety. Pes tak patří mezi člověkem největší a nejdéle domestikované šelmy.

Pes zaujímá nepostradatelné místo v životě člověka. Jeho úloha v lidské společnosti byla vždy rozmanitá. Z počátku byl pes výborným pomocníkem při lovu nebo při nahánění stád dobytka. Vynikal také jako strážce lidských obydlí a majetku a byl výborný pomocníkem při přepravě nákladů na dlouhé vzdálenosti. V některých východních zemích slouží pes i jako potravinové zvíře. Dále může být využíván jako pes služební či asistenční. Je také hojně využíván jako laboratorní zvíře. V dnešní době je ovšem nejvýznamnější rolí psa jeho funkce společníka.

Pro zachování daného živočišného druhu je nezbytnou podmínkou jeho schopnost rozmnožovat se. U savců většinou dochází k páření v době ovulace, tedy uvolnění vajíčka z vaječnickových folikulů. Toto období, které se nazývá říje – estrus, je charakteristické četnými strukturálními změnami v organismu, specifickou citlivostí a specifickým chováním samice. Říje se obvykle opakuje v pravidelných intervalech. Zatímco vlk je typ monoestrický, kdy vlčice mívá říji zpravidla jednou do roka, pes je typ diestrický. Feny mívají říji obvykle dvakrát do roka a to začátkem jara a koncem léta, není to však pravidlem.

Mezi důvody, proč se zabývat asistovanou reprodukcí u psů, patří zejména ekonomické, technické, organizační a zejména u psů převažující zdravotní aspekty.

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je podat formou literární rešerše ucelený přehled o současných technikách v asistované reprodukci u psů.

3. Literární přehled

3.1. Anatomie pohlavní soustavy

3.1.1. Anatomie pohlavní soustavy psa

Samčí pohlavní orgány představují párová varlata a nadvarlata, dále chámovod a močová trubice, přídatné pohlavní žlázy, penis a šourek.

Varlata

Varlata jsou párovým orgánem, ve kterém vznikají samčí pohlavní buňky - spermie. U obou varlat můžeme narazit na rozdíl ve velikosti, přičemž největší bývají v období pohlavní dospělosti a ve stáří atrofují (Červený, 2011). Velikost varlat u psů v závislosti na plemeni se pohybuje v průměru okolo 3 x 2 x 1,5 cm (Kvapil a Kvapilová, 2007). Spermatogeneze probíhá v podpůrných Sertoliho buňkách a buňkách zárodečného epitelu. Sertoliho buňky slouží k produkci proteinů regulujících spermatogenezi, k výživě spermií, ke ztrátě cytoplazmatické kapénky a ke zrání spermií dochází v hlavě nadvarlete. K produkci samčích pohlavních hormonů a androgenů slouží Leydigovy buňky ležící vmezežené mezi semenotvornými kanálky (König a Liebich, 2002).

Nadvarle

Nadvarlata - *epididymys* jsou taktéž párovým orgánem stávajícím z hlavy, těla a ocasu. Do jejich hlavy vstupují vývodné kanálky každého varlete. Ty se spojují ve vývod nadvarlete, který u psa v rozvinutém stavu měří 2 – 8 m. Lumen vývodu nadvarlete se směrem k ocasu nadvarlete rozšiřuje až do průměru 1 mm a dále postupuje k semennému provazci jako chámovod (Červený, 2011).

Chámovod

Chámovod je tedy pokračováním vývodu nadvarlete, probíhá směrem k tříselnému kanálu a spolu s cévním svazkem a nervovou pletením tvoří semenný provazec, jehož délka je různá (Červený, 2011).

Obaly a závěsy semenného provazce, varlete a nadvarlete, sestup varlat

Varlata, nadvarlata a semenný provazec jsou uložena v obalech, které tvoří povrchový a hluboký krycí obal a serózní plášť, který se vychlipuje z břišní dutiny tříselným kanálem do podkoží v oblasti budoucího šourku. Vznik obalů je podmíněn fyziologickým procesem zvaným sestup varlat. K němu u psů dochází až po narození, což je částečně dáno důsledkem nedokonalého vývinu, kdy pes patří mezi nidikolní savce. U novorozených štěňat jsou varlata uložena v břišní dutině a k jejich sestupu do tříselného kanálu dochází zpravidla až ve 4. - 5. týdnu života. V 8. - 9. týdnu života se tříselný kanál zužuje a do té doby by měl být sestup varlat dokončen. Tento proces zajišťuje plnou plodnost samce. Pokud k sestupu varlat do tříselného kanálu nedojde, hovoříme o tzv. kryptorchismu, jenž může být jednostranný, jednostranný, nebo oboustranný a dochází tím k částečné nebo úplné neplodnosti samce (Červený 2011).

Močová trubice

Močová trubice slouží jako vývodná močová cesta a také jako vývodná pohlavní cesta od místa vyústění chámovodů do močové trubice. Dělí se na pánevní a pyjovou část a je pokryta urotem. U středně velkého psa je dlouhá cca 20 cm (Červený, 2011).

Přídavné pohlavní žlázy

Mezi přídavné pohlavní žlázy u psa patří pouze prostata, která vzniká jako derivát sliznice močové trubice. Ostatní žlázy běžné u ostatní domácích a hospodářských zvířat, jako jsou ampule chámovodu, měchýřkovitá či bulbouretrální žláza, chybí. Sekret prostaty je téměř průhledný s charakteristickým zápachem a je reflexně uvolňován při ejakulaci (Červený, 2011). Tento sekret je bohatý na fruktózu a citrát, slouží jako transportní prostředek proti kyselému prostředí, jež vytváří pochva feny a jeho tvorba je pozitivně ovlivněna testosteronem (König a Liebich, 2002). U dospělého psa se její rozměry pohybují v rozmezí 1,4 - 1,9 cm až 2,5 - 2,8 cm (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Penis

Penis patří společně se šourkem mezi zevní pohlavní orgány samce a jeho hlavní funkcí je přenos spermatu do pohlavního ústrojí feny. Je navíc vyztužen kostí penisu, jejíž délka u psů velkých plemen může dosáhnout až 10 cm (Kvapil a Kvapilová, 2007). Tato orgánová kost nemá pevné spojení s kostrou a v jejím žlábků ventrálně probíhá močová

trubice. Penis je tvořen třemi sloupcovitými topořivými tělesy a dělí se na ramena, kořen, tělo a žalud penisu, který svým zvláštním tvarem zajišťuje tzv. svázání obou partnerů při pohlavním aktu (König a Liebich, 2002). Při svázání dochází k rotaci psa a feny tak, že stojí zády k sobě. Tento stav trvá v průměru 20 minut, ale i 5 - 60 minut, přičemž doba svázání neovlivňuje úspěšnost krytí (Kvapil a Kvapilová, 2007). Násilné oddělení partnerů může vést k vážnému poškození jejich pohlavních orgánů (König a Liebich, 2002).

Šourek

Šourek patří společně s penisem mezi zevní pohlavní orgány samce. Šourek je vak, ve kterém jsou uložena varlata, nadvarlata i semenný provazec. Zevně je patrná střední brázda šourku podmíněná přepážkou, která rozděluje šourek na dvě části. U psa je kůže šourku holá, lesklá, bývá i bohatá na kožní barvivo, pigment (Červený, 2011). Pro správný vývoj spermií je důležitá nižší teplota v šourku oproti teplotě zbytku těla. Ta je udržována pomocí hladkosvalové tkáně, která ovlivňuje vzdálenost varlat od těla, dále chybí podkožní tuk a pomocí proudění krve, která varlata ochlazuje (Kvapil a Kvapilová, 2007).

3.1.2. Anatomie pohlavní soustavy feny

Samičí pohlavní orgány představují párové vaječníky a vejcovody, děloha, pochva, vulva a klitoris.

Vaječník

Nejdůležitějším orgánem pohlavní soustavy feny jsou párové vaječníky. Ty slouží k tvorbě vajíček a zároveň jako žláza pro tvorbu pohlavních hormonů. Obvykle dosahují délky 1 - 2 cm a průměru 1,5 cm, mají ovoidní tvar (Kvapil a Kvapilová, 2007). Jiný zdroj uvádí délku vaječníku obvykle 1 – 1,5 cm. Vaječník se dělí na dvě vrstvy, vnitřní dřev, která je bohatá na cévy a vnější kůru, kde se ve velkém množství nacházejí funkční struktury ovaria, jako jsou žlutá tělíska a folikuly obklopující vajíčko (König & Liebich, 2002). U většiny fen bývá levý vaječník větší a těžší než ten pravý a také se v něm při narození vyskytuje více preovulačních folikulů. V době estru mohou folikuly dosahovat velikosti až 6 mm. Vaječníky novorozených fen obsahují cca 700 000 vajíček, přičemž s věkem postupně toto číslo klesá až na 500 vajíček (Kvapil a Kvapilová, 2007). Naopak Songsasen

a Wildt (2007) uvádějí, že nejvíce folikulů mívají feny ve věku 6 – 10 měsíců, oproti fenám mladším či starším. Dále je uváděno, že u fen ve věku 1 – 2 roky byl zaznamenán postupný pokles folikulů z přibližně 85.000 až na 3000 ve věku 7 – 11 let.

Vejcovod

Vejcovod společně s dělohou řadíme mezi vývodné pohlavní cesty samice. Je to úzká, ohebná trubice, uložená mezi ovariem a dělohou, která zachycuje vajíčka po ovulaci. Ve vejcovodech dochází ke zrání oocyty a k jeho oplození. Vajíčka se zde udržují několik dní, obvykle 3 – 8 dní, dozrávají a zde také obvykle dochází ke střetnutí se spermii a následnému oplození vajíčka a počátečnímu vývoji zygoty. Vejcovod u feny dosahuje délky zhruba 6 – 10 cm v závislosti na velikosti zvířete (Červený, 2011). Kvapil a Kvapilová (2007) uvádí obvyklou délku vaječníku 5 - 10 cm a průměr 1 - 2 mm.

Děloha

Děloha je dutý orgán, který slouží pro uhnízdění oplozeného vajíčka, vývoj, vyživování a ochranu zárodku. Děložní sliznice má šedočervené nebo žlutohnědé zbarvení, je hladká a má podélné i příčné řasy. Děloha se dělí na tři části. Děložní tělo, jehož délka je u středně velké feny obvykle 2 - 3 cm. Dále děložní krček, který tvoří bariéru mezi dutinou děložní a dutinou poševní, lze ho palpací snadno rozeznat. Slouží také jako dokonalá zábrana proti bakteriálním infekcím a je krátký přibližně 1 cm. A nakonec děložní rohy, které jsou u feny poměrně dlouhé, jejich obvyklá délka u středně velké feny je 20 cm o šířce 1 cm (Červený, 2011).

Vagina, poševní předsíň

Vagina je dlouhá, tenkostěnná trubice, roztažitelná do délky i do šířky a dosahuje délky až 29 cm u velkých plemen. Mezi anatomické zvláštnosti patří zúžení v šířce 1 – 2 cm dorzální řasou a také slepý vak, nacházející se za děložním krčkem, kterým je pochva zakončena (Vitásek *et al.*, 2012).

Žlázy děložního krčku zajišťují zvlhčení sliznice vaginy při kopulaci. V průběhu pohlavních cyklů se mění vzhled epitelu, například změny v průběhu říje u fen. Poševní předsíň je kaudálním pokračováním pochvy. U domácích savců je to poměrně dlouhý úsek vývodných pohlavních cest, společný s konečným úsekem vývodné močové cesty (Červený, 2011).

Vulva

Vulva tvoří u domácích savců společný vývod pro močové a pohlavní vývodné cesty samic. Je tvořena stydkými pysky a jejich ostrým výběžkem ve spodním konci, ohraničují stydkou štěrbinu. U feny má charakteristický srdčitý tvar, má jemně ochlupenou kůži s typickými aromatickými a mazovými žlázami a četnými senzitivními nervovými zakončeními. Ve stěně se nachází jak hladká, tak příčně pruhovaná svalovina (Červený, 2011).

Clitoris

Clitoris feny vyztužuje dno poševní předsíně a je poměrně velký. Je tvořen fibrózním vazivem promíšeným tukovou tkání, pouze jeho žalud obsahuje topořivé těleso. Je nenápadný a hluboko uložený (Červený, 2011).

3.2. Vývoj pohlavních buněk a pohlavní cyklus

3.2.1. Vývoj samčích pohlavních buněk

Spermatogeneze

Pod pojmem spermatogeneze označujeme vývoj spermie.

Spermatocytogeneze

Epitel semenotvorných kanálků je vystlán dvěma základními typy buněk - Sertoliho a zárodečnými buňkami. Zárodečné neboli spermatogenní buňky jsou obklopovány Sertoliho buňkami, jež jsou podstatně větší a jsou tak společně úzce spojené. Sertoliho buňky mají důležitou funkci během procesu spermiogeneze, kdy fagocytují přebytečné buněčné elementy, kterých se spermatogenní buňky zbavují. Původní samčí pohlavní buňky, zvané spermatogonie, prochází kontinuálně sérií buněčného dělení až do doby, kdy se z nich postupně stávají spermatocyty I. a II. řádu. Tento proces se nazývá spermatocytogeneze (Hafez a Hafez, 2000).

Spermiogeneze

Buňky s haploidním počtem chromozómů jsou spermatidy. Spermatidy následně prodělávají řadu progresivních strukturálních a vývojových změn (kondenzace jaderného chromatinu, zformování bičíku spermie, vznik akrozomu splýváním Golgiho aparátu, zbavování přebytečné cytoplazmy) a stávají se tak z nich nezralé spermie. Tyto metamorfnní změny jsou známy pod názvem spermiogeneze. Nezralé spermie následně putují semenotvornými kanálky přes vývodné kanálky varlete až do nadvarlete, kde dochází k jejich skladování a zrání (Hafez a Hafez, 2000).

Doba trvání spermatogeneze

Struktura a funkce psích varlat byla relativně málo zkoumána. Celková doba vzniku spermií je ovlivňována genotypem zárodečných buněk. Obvyklá doba spermatogeneze u savců se pohybuje v rozmezí 30 – 75 dnů. I když délka cyklu spermatogeneze je považována za poměrně konstantní, může být v rámci jednoho druhu ovlivněna i plemennou příslušností jedince (Soares *et al.*, 2009).

Tímto tématem se zabývala studie z roku 2009 (Soares *et al.*, 2009), kdy cílem bylo provést porovnání délky různých fází spermatogeneze u různých plemen psů. Celkem bylo sledováno 56 pohlavně dospělých psů ve věku cca 1,5 – 7 let a různé hmotnosti (12 kříženců, 12 pinčů, 5 bíglů, 9 amerických pitbulteriérů, 12 pudlů a 6 labradorů). Studie prokázala, že různé fáze cyklu tvorby spermií bývají různě variabilní, zejména u kříženců a u psů plemene americký pitbulteriér. Doba trvání spermatogeneze se významně lišila pouze u psů plemene americký pitbulteriér. To by mohlo být teoreticky způsobeno tím, že varlata těchto psů bývají díky vlastnostem kůže šourku přiložena blíže k tělu (anatomická zvláštnost plemene) a mají tak vyšší teplotu oproti varlatům psů ostatních plemen. Studie na myších a rybách prokázaly, že vyšší teplota varlat významně ovlivňuje – urychluje proces spermatogeneze. U tohoto plemene proběhl každý cyklus tvorby spermií rychleji (o jeden den) a celková délka spermatogeneze se zkrátila až o šest dní. Výsledky získané u ostatních plemen psů byly víceméně časově shodné. Nicméně tuto hypotézu (vyšší teplota v šourku u plemene americký pitbulteriér) je potřeba ověřit dalšími studiemi (Soares *et al.*, 2009).

3.2.2. Vývoj samičích pohlavních buněk

Folikulogeneze

Oocyty hrají zásadní roli při vývoji folikulů, počínaje počáteční folikulární formací a konče rozpadem komplexu kumulárních buněk obklopujícím ovulovaný oocyt (Eppig, 2001). V kůře vaječníku se vyvíjí ovariální folikuly, které se liší velikostí a stupněm diferenciací oocytů, které se nachází uvnitř folikulu. Primordiální neboli zárodečné folikuly jsou tvořeny jednou vrstvou plochých buněk folikulárního epitelu, kde se přeměňují v pozdějších stádiích diferenciací ve vnitřní thekální buňky. Primární folikul vzniká po přeměně plochého epitelu stěny folikulu v izopraxmatický. Primární folikul polárním zmnožením buněk roste a přeměňuje se v sekundární folikul, ve kterém dochází ke vzniku štěrbinových prostorů vyplněných tekutinou. Tyto prostory splývají a postupně tvoří později jednotnou dutinu folikulu. Dalším zmnožením tekutiny a zesílením vnitřních vrstev stěny folikulu vzniká terciární folikul. Jeho stěna je tvořena folikulárním epitelem, který obklopuje dutinu folikulu. Vajíčko je přiloženo excentricky ke stěně folikulu. Těsně vajíčko obklopuje glykoproteinová vrstva zvaná *zona pellucida*. Na ni přiléhá vrstva buněk folikulárního epitelu, *corona radiata*. Konečným stádiem zrání folikulu je Graafův folikul, který je připraven k ovulaci. Graafova folikulu dosahuje jen mizivá část embryonálně založených

folikulů a v nich uložených vajíček. Většina folikulů podléhá regresi, tzv. atrézii folikulů a degeneruje (König a Liebich, 2002).

Zajímavým faktem je, že fena produkuje oproti jiným savcům podstatně více folikulů, jež obsahují více než jedno vajíčko. U fen je to přibližně 11 %, u kočky 4 %, u člověka 3 % a u makaka rhesus 2 % ze všech folikulů. Tyto folikuly se objevují teprve krátce před první říjí, jejich počet ve vaječnících není ovlivněn věkem feny a jejich význam a příčina vzniku není zcela jasná. V rámci jednoho folikulu se mohou vyskytovat oocyty v různých stádiích vývoje, zároveň může být jeden oocyt životaschopný, druhý ne (Songsasen a Wildt, 2007).

Velikost ovariálních folikulů je závislá na stupni reprodukčního cyklu. Obvyklé velikosti ovariálních folikulů, které se na vaječniku vyskytují, jsou: $119,2 \pm 0,7 \mu\text{m}$ v době estru, $107,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$ v době diestru a $103,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$ v době anestru. K tomu, aby u oocyty mohla proběhnout meióza, je zapotřebí jeho velikosti minimálně 100 – 120 μm . Velikost oocyty je důležitým, ovšem ne jediným limitujícím faktorem pro úspěšné IVM. Pouze zhruba 20 % získaných oocytů, jež jsou větší než 120 μm , úspěšně dosáhne kompletního jaderného zrání *in vitro*. Až 80 % oocytů obsažených ve folikulu > 2 mm je schopno jaderného zrání *in vitro*. Z folikulů o velikosti 0,5 až < 2 mm je ovšem schopno jaderného zrání pouhých 16 – 38 % oocytů. Během anestru a diestru se setkáváme více s menšími folikuly (0,5 až < 2 mm), naopak během estru převládají folikuly velké (> 2 mm). Lze však také nalézt několik malých folikulů u fen v proestru a naopak některé velké folikuly u fen v diestru (Songsasen a Wildt, 2007).

Oogeneze

Současně s diferenciací ovariálních folikulů probíhá i vývoj samičích pohlavních buněk, oogeneze. Vajíčka pocházejí z malého počtu kmenových buněk, které se nazývají primordiální zárodečné buňky (PGC, primordial germ cells). Poté co se PGC diferencují v samičí zárodečné buňky, začnou se tyto mitoticky dělit a označují se jako oogonie. Když mitotická aktivita ustává, některé z buněk vstoupí do meiózy. Buňky, které do meiózy vstoupily, se označují jako oocyty (Wassarman a Albertini, 1994).

Meiotické dělení oocyty je zastaveno ve fázi diplotene profáze I a poté oocyt začne růst. V oocytech, které jsou plně dorostlé, pokračuje meióza přes metafázi I, anafázi I, telofázi I až do metafáze II, kde nastává druhý meiotický blok (Sedmíková *et al.*, 2003). V druhém meiotickém bloku oocyt zůstává až do oplození spermií (Wassarman a Albertini, 1994). U většiny savců dochází k ovulaci oocyty ve stádiu metafáze druhého meiotického

dělení. Avšak u psovitých šelem opouští dorostlý oocyt folikul již na konci profáze I a zrání do stádia metafáze II probíhá ve vejcovodu (Sládeček, 1986; Hyttel *et al.*, 1990).

Při ovulaci dochází pod vlivem luteinizačního hormonu (LH) hypofýzy k prasknutí stěny folikulu. Místo, kde dochází k prasknutí folikulu, se nazývá stigma. Vajíčko je společně se svými okolními buňkami vyplaveno folikulární tekutinou z folikulární dutiny a dostává se do nálevky vejcovodu (König a Liebich, 2002).

Po ovulaci kolabuje stěna folikulární dutiny, což je zapříčiněné poklesem tlaku uvnitř původní dutiny a vzniká žluté tělísko, latinsky *corpus luteum* (CL). Ke vzniku žlutého tělíska tak vedou následující regresní a proliferační procesy a pučení cév. Na žlutém tělísku se rozlišují rané a pozdní stadium vzniku, stadium rozkvetu a stadium regrese. Soubor těchto stádií žlutého tělíska během estrálního cyklu označujeme jako *corpus luteum cyclicum*. Žluté tělísko produkuje hormon progesteron a thekální buňky tvořící stěnu zralého folikulu produkují estrogeny. Zvýšená tvorba estrogenu za přítomnosti Graafova folikulu vede k říji, zatímco progesteron připravuje uterus pro implantaci oplozeného vajíčka. Prostaglandiny ($\text{PGF}_{2\alpha}$), které jsou produkovány v děloze, zahajují regresi žlutého tělíska. Na konci regresních procesů přetrvává jizva žlutého tělíska. Funkci vaječníků a sekreci jejich hormonů ovlivňují hormony hypofýzy. Dysfunkce v produkci hormonů vedou např. ke vzniku cyst vaječniku nebo k perzistujícím žlutým tělískům (König a Liebich, 2002).

Zrání oocytů u psovitých (jako je pes domácí, liška polární nebo liška stříbrná) je proces, který se výrazně liší od ostatních druhů savců a jeho značná část se odehrává ve vejcovodech. K ovulaci dochází během 24 – 48 hodin po LH vlně. A naopak k LH vlně dochází přibližně 3 dny po prvním dni estru. Nezralé psí oocyty následně potřebují zhruba 72 hodin k tomu, aby dosáhly metafáze druhého meiotického dělení. K obnovení meiózy u většiny oocytů dochází obvykle 1 – 2 dny po vrcholu LH, tedy krátce před ovulací. Bylo také zjištěno, že oba typy oocytů – tedy jak zralé tak nezralé – jsou prostupné pro spermie. Může tedy dojít i k oplození nezralých oocytů. Tento jev mimo jiné ztěžuje určení optimální doby pro krytí či metody asistované reprodukce (Hyttel *et al.*, 1990).

Ke zrání oocytů dochází až ve vejcovodu feny a trvá přibližně 60 hodin a tyto zralé oocyty jsou poté oplození schopné přibližně 48 hodin (Karre, 2012). Ke zrání oocytů dochází v distálních částech vejcovodů, stejně tak jako u lišek, přibližně dva dny po ovulaci a doba zrání se uvádí v rozmezí 96 – 108 hodin. Zralé oocyty si uchovávají schopnost oplození podobu dalších 24 – 48 h (den 5 – den 6) u většiny fen, po dobu 72 – 96 h (D7 – D8) u některých fen a v extrémních případech si tuto schopnost uchovávají až po dobu 120 – 144 h (D9 – D10). Jako nejvhodnější dny k případnému oplození se jeví rozmezí

D0 – D5. Během následujících tří dnů se schopnost oplození výrazně snižuje (Concannon, 2011).

Luvoni *et al.* (2005) uvádí, že psí oocyty bývají ve vejcovodech obvykle po dobu 8,5 – 9 dní, zatímco u jiných savců je tato doba uváděna v intervalu 3 – 4 dnů. Naopak Reynaud *et al.* (2006) uvádí dobu setrvání oocytů ve vejcovodech až 8 – 10 dní, oproti 2 dnům u prasat, 3 – 4 dnům u skotu a 5 dnům u myši.

3.2.3. Pohlavní cyklus

Proestrus je období trvající obvykle 9 dní charakterizované změnami v chování feny, změnami zaznamenanými při poševní cytologii, doprovázené otokem a zarudnutím vulvy a charakteristickým výtokem. V období pozdního proestru dochází ke zvýšení hladiny estradiolu, jehož bazální hodnota bývá v rozmezí 5 – 15 pg / ml až na hodnoty 40 – 120 pg / ml (průměrně 70 pg / ml). Nárůst hladiny estradiolu je současně doprovázen nárůstem hladiny testosteronu ($z < 0,5$ ng / ml až na 2 – 5 ng / ml) a androstendionu ($z < 0,5$ ng / ml až na 4 – 11 ng / ml). Období proestru končí obvykle 0,5 – 3 dny po vrcholu hladiny estradiolu v krvi, jehož hladina se nadále přechodně pohybuje v rozmezí 10 – 20 pg / ml. Toto období je již označováno jako estrus (tedy vlastní říje). V této době také nastává přibližně 1 – 3 denní zvýšení hladiny LH (bazální hodnota 0,4 – 1,5 ng / ml, vrchol 5 – 40 ng / ml) a zároveň 1 – 4 denní zvýšení hladiny FSH (bazální hodnota 15 – 40 ng / ml, vrchol 200 – 400 ng / ml). Po LH vlně se rychle zvyšuje hladina progesteronu na hodnotu 1 – 3 ng / ml a ihned po ovulaci (nebo po 1 – 3 denní pauze) se nadále zvyšuje až na hodnoty 10 – 25 ng / ml v den D10, během nebo krátce po skončení říje. Po skončení estru následuje období metestru, obvykle detekované mezi dny D6 – D11. Dále hladina progesteronu dosahuje vrcholu v době mezi D20 – D35 na hodnotu 15 – 80 ng / ml a poté opět postupně klesá na hodnotu méně než 1 ng / ml ve dnech D55 – D90 (v průměru D70). Toto období je charakterizováno jako konec metestru a začátek anestru. Anestrus je období bez zjevné ovariální aktivity a u fen obvykle není kratší než 7 týdnů po poklesu hladiny progesteronu pod 1 – 2 ng / ml. Průměrně však trvá 18 – 20 týdnů. Děložní sliznice bývá plně regenerována mezi dny D120 – D130 (Concannon, 2011).

Folikuly průměrně zvětší svou velikost před LH vlnou na 6 – 9 mm, poté mezi LH vlnou a ovulací až na 9 – 12 mm. Tento růst folikulu i ovulace může být pozorována ultrazvukem. K porodu běžně dochází 65 ± 1 den po LH vlně (Concannon, 2011).

3.3. Plodnost

V poslední době se u psů vyskytují dva zásadní problémy spojené s reprodukcí. Z důvodu přemnožení zvířat ve volných chovech nebo u zvířat opuštěných se používá zejména cílené snižování jejich reprodukčních schopností. Toto cílené ovlivňování pohlavní aktivity zvířat je prováděno zejména pomocí oddálení nebo úplného zabránění nástupu říje. Jedná se o metody dočasné (medikamentózní), kdy se využívá například aplikace steroidních hormonů, jako jsou gestageny, androgeny, které snižují sekreci hypofyzárních gonadotropinů. Mezi metody trvalé (chirurgické) patří ovariectomie (odstranění vaječnicků) a ovariohysterektomie (odstranění vaječnicků, vejcovodů i dělohy) u fen a orchiektomií (odstranění varlat) u psa. Naopak u zvířat přešlechtěných plemen, která mají často sníženou schopnost rozmnožování, se rozvíjejí metody zvyšující jejich reprodukční výkonnost (Svoboda *et al.*, 2001).

3.4. Asistovaná reprodukce u psů

Studie zabývající se asistovanou reprodukcí psů vedou mimo jiné k celkovému pochopení reprodukčních mechanismů u savců. Získané znalosti umožní zachování cenných psích genotypů *in vitro* (Songsasen a Wildt, 2007).

Metody asistované reprodukce u psů ztěžuje celkově fyziologie reprodukčního systému a také fakt, že je obtížné chirurgicky získat pro produkci *in vitro* embryí zralé oocyty z vejcovodů od fen během probíhající říje. Taktéž pro metodu přenosu jádra somatické buňky (z ang. somatic cell nuclear transfer – SCNT) je obtížné po *in vitro* fertilizaci oocytů najít příjemkyni ve fázi pohlavního cyklu, která by přijmutí embryí umožňovala (Hall *et al.*, 2013). Při kryokonzervaci spermií může dojít k dezorganizaci cytoskeletu a k abnormalitám ve struktuře chromozomů a DNA (Luvoni, 2000).

Mezi těmito technikami se *in vitro* produkce (IVP) embryí jeví jako důležitý nástroj pro ochranu volně žijících druhů živočichů. V posledním desetiletí bylo dosaženo významného pokroku v produkci embryí masožravců. Bylo prokázáno, že psí oocyty mohou pokračovat v meiotickém dělení *in vitro*, a že tyto oocyty mohou být následně oplozeny a nadále vyvíjeny *in vitro*, i když s mnohem menšími úspěchy, než je tomu u oocytů jiných domácích zvířat. Důvod spočívá v odlišnosti reprodukční fyziologie psa v porovnání s ostatními druhy a v nedostatku přesných informací týkajících se prostředí vejcovodů, ve kterém probíhá zrání oocytů, oplození i časný embryonální vývoj (Luvoni, 2000).

Ačkoliv běžné metody asistované reprodukce, jako je umělá inseminace (AI) a kryokonzervace byly velmi úspěšné, další pokročilé technologie se jeví jako nedostatečné pro dosažení vysoké míry úspěšnosti *in vitro* embryonálního vývoje u psa. *In vitro* zrání (IVM) psích oocytů zůstává významně pozadu oproti jiným živočišným druhům (Hall *et al.*, 2013).

3.4.1. Umělá inseminace (AI)

Umělá inseminace je alternativní způsob oplodnění. Ačkoliv první úspěšná umělá inseminace u fen pomocí čerstvého spermatu, která vedla k březosti, byla provedena již v roce 1780 italským vědcem L. Spallanzanim, této metody se začalo využívat až ve druhé polovině

20. století (Vitásek *et al.*, 2012). První březosti po inseminaci mraženým spermatem dosáhl S. W. J. Seager v USA až v roce 1969 (Svoboda *et al.*, 2001).

Hlavními důvody, proč se umělé inseminace u psů využívá, bývají ekonomické, technické, organizační, časové a zejména zdravotní aspekty. Ze strany psa bývají problémy s nezkušeností, předčasnou ejakulací a erekcí, plachostí, pohybovými problémy, poraněními a onemocněními pohlavního aparátu, sníženou sexuální aktivitou apod. U fen to nejčastěji bývá nechuť k vybranému psovi, bolestivost u mladých fen, vývojové vady genitálií či výrazná agrese. Důležitou skutečností, proč se také provádí umělá inseminace je zabránění přenosu nakažlivých infekcí či pohlavních chorob, zejména z feny na psa (Svoboda *et al.*, 2001).

Indukce říje

V rámci asistované reprodukce jsou metody stimulace pohlavní aktivity a indukce říje rozvíjeny zejména k cílenému ovlivnění pohlavní aktivity s cílem sjednocení říje a zvýšení rozmnožovací schopnosti. Dále jsou metody vyvíjeny k léčbě patologického anestrů, kdy je nutné počítat s narušením hypotalamo-hypofýzo-ovariální osy a tím pádem nižší efektivitou vyvíjených metod. Zatímco u hospodářských zvířat se metody asistované reprodukce, již běžně používají i v praxi, u psů se tyto metody používají prozatím k terapeutickým účelům (Svoboda *et al.*, 2001).

Metody indukce říje u fen se v současné době využívají ke zkrácení interestrálního intervalu, k synchronizaci říje pro přenos embryí nebo pro *in vitro* produkci embryí. Ideální podmínky chovatelského prostředí jsou důležitým předpokladem pro úspěšnou indukci říje. Feny by měli mít přístup k ostatním cyklujícím fenám a také časově omezený kontakt se psy. Dále je důležitá kvalitní výživa. Nedostatek vitamínů zejména A, E a esenciálních aminokyselin nebo naopak překrmování působí negativně na pohlavní aktivitu. Taktéž je potřeba zajistit prostředí prosté stresových faktorů, jako je například nevhodná teplota prostředí, vlhkost, hrubé zacházení a jiné (Svoboda *et al.*, 2001).

Indukce říje je možné dosáhnout pomocí nehormonálního ošetření, které ale prozatím nenašlo větší uplatnění, nebo pomocí hormonálního ošetření ovlivňujícího hypotalamo-hypofýzo-ovariální osu. Hormonální ošetření spočívá zejména v aplikaci eCG nebo FSH, což jsou hormony stimulující růst folikulů (obvykle se provádí po dobu 5 - 10 dnů) v kombinaci s hCG nebo GnRH, případně LH stimulující dozrání folikulů a ovulaci. Příznaky proestru bývají lépe vyvolány pomocí eCG, než pomocí FSH. Nicméně účinnost je v obou

případech vysoká. Naopak plodnost zvířat je v těchto vyvolaných říjích výrazně nižší. Mezi příčiny tohoto stavu můžeme zařadit dlouhodobý nadbytek estrogenů, chybějící ovulaci, uvolnění vajíček v nepravidelných intervalech nebo neobvyklý průběh následné luteální fáze pohlavního cyklu, tedy nižší kvalitou žlutých tělísek. Podávání těchto přípravků (eCG a FSH) se doporučuje po dobu maximálně 5 dní, kvůli případnému toxickému účinku dlouhodobé estrogenizace. K vyvolání proestru je též možno použít aplikace estrogenů a aplikace gonadotropinů pro vyvolání říje. Nicméně pro toxické účinky estrogenů se jejich aplikace příliš nevyužívá (Svoboda *et al.*, 2001).

Nejvýhodnější se jeví aplikace přímo GnRH, nebo jeho umělých napodobenin pouze za předpokladu, že u zvířete plně funguje hypofýzo-ovariální osa. Tato metoda je ovšem technicky náročná, jelikož je nutné GnRH aplikovat v krátkých časových intervalech po dobu několika (8 - 12) dnů pomocí pulzačních infuzních pump. Tuto technicky náročnou aplikaci lze nahradit opakovanou injekční aplikací různých podobných forem preparátů s GnRH účinkem (tzv. GnRH agonisté), nebo umělých náhražek GnRH. Je vhodné zmínit ještě aplikaci antiprolaktinů (v ČR se využívá např. přípravek bromokriptin), jehož účinek je založen na přímém ovlivnění gonadotropní sekrece hypofýzy a/nebo ovlivnění schopnosti vaječnicků odpovědět na gonadotropiny. Výsledky použití antiprolaktinů jsou prozatím velmi různorodé (Svoboda *et al.*, 2001).

Proto, aby byla indukce říje úspěšná a mohlo se tak pokračovat v určování optimální doby pro krytí nebo umělou inseminaci je nezbytné zajistit předchozí celostní diagnostiku zdravotního stavu a vyloučení zdravotních dysfunkcí, které by zabránily nástupu říje a negativně ovlivnili průběh pohlavního cyklu (Svoboda *et al.*, 2001).

Závěrem lze říci, že dosud není k dispozici žádná metoda, kterou by bylo dosaženo kvalitních plodných říjí (Svoboda *et al.*, 2001).

Detekce ovulace

U feny se během ovulace, na rozdíl od jiných domácích savců, uvolňují z folikulů nezralá vajíčka ve fázi metafáze II. Ovulace může trvat 12 - 24 (36) hodin (Karre, 2012).

Proces ovulace úzce souvisí se dvěma endokrinními událostmi – koncentrací progesteronu v krvi a LH vlnou. Stanovení LH vlnou se běžně nepoužívá, jelikož je poměrně drahé a časově náročné, kdežto stanovení hladiny progesteronu v krvi se rutinně používá k určení doby ovulace. Dalším způsobem, jak pozorovat *in situ* vaječnický a preovulační folikuly a následnou ovulaci, je laparotomie. Ovšem to je invazivní zákrok, který vyžaduje

celkovou anestezii a může při něm docházet k narušení tohoto procesu. Proto se v poslední době hojně uplatňuje metoda transabdominální ultrasonografie, jež pomáhá určit přesnou dobu ovulace. Tato metoda je poměrně přesná, ovšem vyžaduje pozorování vaječnicků dvakrát až třikrát denně, bezprostředně před a během ovulace (Reynaud *et al.*, 2006).

Vyvolání předčasného proestru a estru bylo dosaženo pomocí FSH, LH i estradiolu. Úspěšnost indukce říje byla různorodá a mezi obvyklé komplikace patřil časný zánik žlutého tělíska, porucha ovulace, komplikovaná luteinizace nebo došlo k selhání implantace oplozeného vajíčka (Concannon, 2011).

Mimoto zrání oocytů je doprovázeno zvýšenou hladinou progesteronu v krvi a oplodnění obvykle probíhá při hladině vyšší než 47,7 ng/ml (Karre, 2012).

Stanovení optimální doby pro krytí či umělou inseminaci

Pod pojmem časování je nutné si představit vymezení určitého časového úseku, během něhož dochází k uvolnění oplození schopných oocytů do vejcovodu, respektive jejich dozrání ve vejcovodu. K co největšímu využití reprodukčních schopností feny je důležitá veterinární asistence. Správné načasování je nezbytné zejména v případech inseminace, tedy jednorázového krytí, mraženým spermatem, jelikož jeho schopnost přetrvání v pohlavním ústrojí feny a oplozovací schopnost je výrazně nižší (3 – 6 dní) než u čerstvého spermatu (Svoboda *et al.*, 2001).

Pro určení nejvhodnější doby krytí lze vycházet z přirozeného chování feny vůči psovi. Během 3 - 5 dní po projevení prvního zájmu feny o psa obvykle dochází k ovulaci (odpovídá 2. - 3. dni estru). Přístupnost feny pro psa je jednou z nejspolehlivějších chovatelských metod k určení nejvhodnější doby ke krytí. Některé feny však mohou odmítat psa během celého cyklu a jiné jsou naopak přístupné po dobu téměř celého období vnějších příznaků říje, což může trvat déle než deset dnů (Kvapil a Kvapilová, 2007).

K ovulaci dochází zhruba 48 – 60 hodin po vrcholu LH (Concannon *et al.*, 2011). Svoboda *et al.*, (2001) uvádí, že u fen probíhá ovulace zpravidla 1 - 4 dny po LH vlně, což bývá obvykle 3. - 7. den říje. K ovulaci dochází kolem druhého dne po LH vlně (Hyttel *et al.*, 1990).

Na rozdíl od ostatních druhů domácích zvířat, kdy je vhodná doba k připuštění bezprostředně před ovulací, u fen je tomu jinak. Optimální doba pro krytí je až chvíle po ovulaci, jelikož vajíčka vycházejí z vejcovodů v nezralé formě oocytu I. řádu. Proto je nutné jejich setrvání ve vejcovodu po dobu dalších 1 - 3 dní po ovulaci, kdy se z oocytů

I. řádu stávají zralé oocyty II. řádu schopné oplození. Schopnost oplození těchto oocytů bývá v rozmezí 24 - 48 hodin (Svoboda *et al.*, 2001). V okamžiku oplození se oocyty nacházejí ve střední a distální části vejcovodu (Reynaud *et al.*, 2006).

Nástup říje je charakteristický sníženou koncentrací estrogenů a zvýšenou koncentrací progesteronu v periferní krvi, což je ovlivněno luteinizací preovulačních folikulů (Svoboda *et al.*, 2001).

V případě inseminace (tedy jednorázového krytí) lze považovat za nejvhodnější termín přibližně 5. - 7. den říje. Podle fyziologických příznaků na těle feny a dle jejího chování vůči psu však nelze přesně určit přesnou dobu ovulace, proto je běžně využíváno různých laboratorních metod, které s větší přesností dokáží určit různá stadia říje a tím i průběh ovulace (Svoboda *et al.*, 2001).

Časování říje obvykle představuje soubor několika vyšetření. V první řadě jde o anamnestické a klinické vyšetření, dále přichází na řadu poševní cytologie, vyšetření a změření hladiny progesteronu v periferní krvi, které je vhodně doplňováno též stanovením hladiny luteinizačního hormonu (LH). Soubor těchto vyšetření se nazývá tzv. OVT (ovulation timing) - pokročilé časování ovulace (Hošek, 2014). Ke zjištění doby ovulace je vedle vyšetření hladiny hormonů v krvi též vhodné využít ultrasonografii vaječnicků (Vitásek *et al.*, 2012).

Poševní cytologie

Poševní cytologie je nejběžněji používanou metodou při stanovení optimální doby ke krytí. Určuje přesnou hormonální aktivitu vaječnicků a upřesňuje posouzení reakce pohlavních orgánů na tyto hormony (vaginoskopie). Konkrétně udává reakci poševních buněk na estrogény, které jsou nejvíce vylučovány právě v období proestru (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Na začátku říje se zobrazuje výrazná převaha superficiálních buněk (více než 90%), přičemž zhruba polovina z nich je bezjaderná. Naopak se vytrácejí erytrocyty, které zde byly původně hojně zastoupeny. Eozinofilní index bývá větší než 80. V tomto období časného estru zatím není nejvhodnější doba vhodná ke krytí. Optimální termín pro krytí nastává v momentě, kdy v cytologickém nálezu převažují bezjaderné superficiální buňky (více než 90%) a eozinofilní index je stoprocentní. Toto období vychází zhruba na 4. - 9. den říje. Pro pozdní estrus je typické opětovné zastoupení parabazálních a intermediálních buněk (kolem 50%) a snížení počtu superficiálních buněk (kolem 50%), které jsou opět z poloviny

bezjaderné a eozinofilní index se snižuje až přibližně na 70. Objevují se neutrofilie a případně erytrocyty. Toto období odpovídá 7. - 10. dni říje. Schopnost oplození je v této fázi říje výrazně snížena (Svoboda *et al.*, 2001).

Výhodou poševní cytologie je šetrné využití a možnost opakování. Pomocí této metody ovšem nelze stanovit přesnou dobu ovulace a reakce poševních buněk na hladiny hormonů v periferní krvi je u každé feny individuální (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Stanovení hladiny progesteronu v krvi

Další metodou je stanovení hladiny hormonu progesteronu v krvi pomocí tzv. progesteronového testu. Jde o poměrně přesnou metodu, která určí přesnou dobu ovulace. Feně se zhruba 7. den od objevení se krvavého výtoku odebere krev a zašle se do laboratoře, která má možnost změřit hladinu progesteronu v krvi (uvádí se v ng/ml). Hodnoty progesteronu v rozmezí 1 – 5 ng/ml poukazují na časný estrus. Při hladině okolo 2,5 ng/ml obvykle do dvou dnů dojde k ovulaci, proto toto období není zatím vhodné pro jednorázové krytí. Připouštět je možné jen v případě, že je zde možnost opakovaného krytí (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Nejvhodnější doba ke krytí je doba krátce po ovulaci, kdy se hodnota progesteronu v krvi pohybuje kolem 5 ng/ml. Optimální hodnota progesteronu v krvi se však uvádí v rozmezí 8 - 13 ng/ml. Vyšší hodnoty již ukazují na pozdní estrus či raný diestrus, kdy dochází k výraznému snížení oplození schopnosti vajíček (Svoboda *et al.*, 2001).

Kvapil a Kvapilová (2007) uvádí hodnoty progesteronu v krvi v rozmezí 5 - 25 ng/ml za vrchol estru. Hodnoty okolo 5 ng/ml naznačují období ovulace, 5 – 10 ng/ml udává období zrání vajíček a hodnoty 10 – 25 ng/ml období, kdy jsou vajíčka oplození schopná. Navíc progesteron je hormon nutný k udržení případné gravidity feny, takže se po ovulaci jeho hladina výrazně zvyšuje.

Pomocí progesteronového testu prováděném během říje můžeme také úspěšně určit termín porodu. Je to nejpřesnější metoda, která se běžně v praxi využívá. Za předpokladu každodenního měření hladiny progesteronu v krvi během říje bylo zjištěno, že délka březosti se pohybuje v intervalu 65 +/- 1 dní u 60%, 65 +/- 2 dní u 76% fen, 65 +/- 3 dní u 87% a 65 +/- 4 dní u 92% fen od stanovení dne D0 (nultý den ovulačního cyklu), během něhož dochází k vzestupu hladiny LH a bývá označován jako LH vlna - nejvyšší hodnota (vrchol) LH v krvi. Tyto výsledky byly zjištěny ve studii celkem 238 fen 49 plemen, z nichž u 60% proběhl porod. Délka gravidity byla stanovena ode dne D0 do dne, kdy byl vypuzen první plod.

Průměrná délka březosti u této skupiny sledovaných fen byla zjištěna jako 65,5 +/- 2,36 dní (Vitásek *et al.*, 2011).

Stanovení hladiny luteinizačního hormonu (LH) v krvi

Stanovení hladiny luteinizačního hormonu (LH) v krvi je dalším přínosným ukazatelem při určování vhodné doby ke krytí. Vyšetření hladiny LH v krvi se zahajuje při zjištění hladiny progesteronu větší než 1 ng/ml (Hošek, 2014).

Odběr semene

Pro úspěšné provedení umělé inseminace je také zapotřebí získat semeno chovného psa. To se provádí třemi základními způsoby, masáží pyje neboli masturbací, použitím umělé pochvy nebo elektroejakulací, jež se běžně neprovádí, jelikož je nutné ji provádět v celkové anestezii (Svoboda *et al.*, 2001).

Masturbace se nejvíce využívá u malých plemen psů a u psů lehce vzrušivých, pomocí umělé pochvy pak u psů středních a velkých plemen. Také zde je vhodné odběr semene ukončit před nástupem třetí semenné frakce. Vždy je nejvhodnější odebírat semeno za přítomnosti hárající feny pro dostatečnou stimulaci psa. Důležité je pravidelné využití psa k reprodukci, nikoliv nadměrné nebo naopak nedostatečné, kdy se zhoršuje kvalita spermatu. Jako optimální se jeví jeden odběr v rozmezí dvou dnů. Semeno by mělo být po odběru nejlépe do deseti minut zpracováno (Svoboda *et al.*, 2001).

Spermie je též možno získat přímo z nadvarlete (tzv. epididymální spermie). Postupuje se tak v případě kastrace nebo úhynu psa. Úspěšnost takového odběru je závislá na včasném dopravení varlat s nadvarlaty (případně těla mrtvého zvířete) do příslušné laboratoře. V případě, kdy není možné varlata transportovat ihned, přepravuje se vzorek při teplotě 5 – 10°C (Přinosilová *et al.*, 2012).

Mezi metody získávání epididymálních spermií patří disekce ocasu nadvarlete nebo výplach ocasu nadvarlete a části chámovodu. V prvním případě se disektovaný, krevních vlásečnic zbavený a na několika místech naříznutý ocas nadvarlete vloží do připraveného média asi na 10 minut. Během této doby spermie do vybraného média samovolně vyplavou. V druhém případě je proveden výplach části chámovodu a ocasu nadvarlete pomocí 0,5 – 1 ml určeného média nataženého do stříkačky s tupou jehlou. Poté za pomoci vzduchu je z ocasu nadvarlete vyplavena veškerá tekutina obsahující spermie (Přinosilová *et al.*, 2012).

U psa probíhá ejakulace ve třech frakcích. První předpermiová frakce obsahuje mikroorganismy, které mají za úkol pročištění močové cesty před vlastní ejakulací. Druhá frakce permiová, obsahující spermie, se získává odděleně pro kryokonzervaci. Třetí frakce je prostatická, obsahující sekret z prostaty (Přinosilová *et al.*, 2012).

Pro inseminaci čerstvým spermatem je důležité odebrat celý ejakulát (Svoboda *et al.*, 2001). Naopak pro zmrazení semene je nutné odebrat pouze jeho prostřední frakci, jelikož sekret uvolňovaný z prostaty snižuje životnost spermií při konzervaci ejakulátu (Svoboda *et al.*, 2001; Přinosilová *et al.*, 2012).

Získávání a kryokonzervace spermií z kaudální části nadvarlat je důležitým nástrojem v reprodukci psů, která umožňuje získání živých buněk i po smrti jedince. Nicméně proces kryokonzervace může způsobit nevratná poškození v membráně spermií a narušit tak jejich životaschopnost (Martins *et al.*, 2009).

Hodnocení kvality spermatu

Tradiční metody určující kvalitu spermatu nekorelují vždy s plodností daného jedince u psů, ani u jiných živočišných druhů. Schopnost spermií reagovat s oocyty závisí na mnoha funkčně – morfologických vlastnostech (Martins *et al.*, 2009).

Mezi parametry, které se běžně sledují při kontrole kvality spermatu (makroskopicky, mikroskopicky, objektivně i subjektivně) patří především objem, barva, vzhled, pH, koncentrace spermií, motilita a morfologie (Šichtař *et al.*, 2014).

Barva zdravého ejakulátu bývá mléčně bílá, přičemž je hodnocena na stupnici 0 – 5 (5 nejvíce zakalený vzorek). Jakékoliv barevné odchylky od mléčně bílé značí zdravotní a jiné potíže (průhledná – vzorek bez spermií, žlutá – kontaminace močí, hnědá – obsah staré krve, červená – obsah čerstvé krve, zelená – značí infekci).

Hodnoty pH psiho ejakulátu se obvykle pohybují v rozmezí 6,4 – 6,8 (Šichtař *et al.*, 2014).

Udává se, že koncentrace spermií v psím ejakulátu by měla být minimálně 300 milionů spermií/ejakulát. Koncentraci ovlivňují mnohé faktory, jako je například velikost psa, věk, sexuální aktivita, stres, pocit bolesti a jiné (Šichtař *et al.*, 2014).

Motilita je vyjadřována podílem motilních, nebo progresivně motilních spermií v ejakulátu. U zdravého psa se udává motilita spermií obvykle 70 – 90 %. Stejně jako koncentrace, je i motilita ovlivňována stejnými faktory (Šichtař *et al.*, 2014).

Při posuzování morfologie se zjišťuje zastoupení morfologicky normálních spermií (MNS), kde se hledí na tvar a strukturu spermií. Zdravý ejakulát by měl obsahovat minimálně 70 % MNS, hodnota pod 60 % MNS už naznačuje sníženou schopnost oplození semene (Šichtař *et al.*, 2014).

Mezi parametry, jež se kontrolují složitějšími vyšetřovacími metodami, patří sledování integrity buněčné membrány, posuzování potenciálu přežitelnosti spermií, zhodnocení kapacity, akrozomu, integrity DNA či mitochondrií spermií. Pro zhodnocení kvality ejakulátu však zatím nejsou stanovena jasně daná pravidla (Šichtař *et al.*, 2014).

Nejběžněji využívanou metodou ověřování kvality ejakulátu patří vizuální zhodnocení pomocí optického mikroskopu. Mezi počítačové metody, které zjišťují kvalitu spermatu, se řadí například CASA (Computer Assisted Semen Analyzer), jež může zjišťovat průměrná rychlost spermií na dráze (VAP) v $\mu\text{m/s}$, přímočará rychlost (VSL) v $\mu\text{m/s}$, křivočará rychlost (VCL) v $\mu\text{m/s}$, amplituda laterálního vybočení hlavičky spermie (ALH) v $\mu\text{m/s}$, frekvence křížení (BCF) v Hz, přímota (STR) v % či linearita (LIN) v %. Dalšími mohou být tzv. analyzátor kvality spermatu (SQA, z angl. Sperm Quality Analyzer), SASMO, HOS – test (hypoosmotický test) kontrolující funkci membrány spermií (Šichtař *et al.*, 2014).

Vazba spermií na *zonu pellucidu* je významnou událostí a užitečným parametrem při posuzování plodnosti zvířete. Pro tento odhad plodnosti je využíváno tzv. „Hemizona Assay“ testu (Martins *et al.*, 2009).

Životnost spermií v pohlavním traktu feny

Spermie jsou skladovány v děloze, nebo na rozhraní dělohy a vejcovodů a při zrání oocytů se pohybují směrem k místu oplození, tedy do vejcovodů (Karre, 2012). Přítomnost spermií v děloze byla zjištěna již několik minut po páření. Také bylo zjištěno, že na rozhraní mezi děložními rohy a vejcovody a i dále ve vejcovodech bylo nalezeno až stokrát méně spermií, než v děložních rozích (Reynaud *et al.*, 2006).

Říje u fen trvá v průměru 7 - 10 dní a může začít již týden před ovulací. To je spolu s dlouhodobým procesem zrání oocytů náročné pro životaschopnost spermií v pohlavním aparátu feny a na jejich schopnost oplození. Bylo zjištěno, že na rozdíl od dalších domácích a hospodářských savců, u kterých bývá životaschopnost spermií v samičím pohlavním ústrojí pouze několikahodinová až několikadenní, u fen jsou spermie schopné přežít až po dobu 11 dní (Songsasen a Wildt, 2007; Karre, 2012). Průměrně přežívají spermie psa v děloze feny 7 dní, tudíž například při páření 5 dní před ovulací bývají často plodné a oplození jednoho

oocytu více než jednou spermií nebývá výjimečné. V případě nekvalitního spermatu, nebo po jeho rozmrazení, je nejvhodnější doba pro oplození 5. – 6. den po LH vlně a po dozrání oocytů (Concannon, 2011). Reynaud *et al.* (2006) udávají běžnou dobu přežití spermií v reprodukčních orgánech feny mezi 3,5 – 6 dní po páření, nejdéle však 11 dní. Mimo jiné také uvádí, že doba přežití spermií je delší, je – li fena v říji.

K oplození oocytů *in vivo* dochází ve stadiu metafáze II (MII), což je přibližně 48 – 83 hodin po ovulaci (Reynaud *et al.*, 2006).

Technika umělé inseminace

Při umělé inseminaci je potřeba zavést katétr co nejlíže k děložnímu krčku pro co nejlepší postup semene. Po aplikaci semene do pochvy je vhodné prstem napodobovat svázání a podporovat tak nasávací aktivitu vývodných pohlavních orgánů feny. Fenu je vhodné po inseminaci držet s vyvýšenou zádí po dobu 10 - 20 minut, poté ji provádět zhruba 10 - 15 minut a snažit se zabránit jí v močení. Dále by měla být hodinu až dvě v klidu (Svoboda *et al.*, 2001).

Dalším způsobem je vpravení semene přímo do dělohy, které se provádí při použití mražené dávky. Mezi tyto možnosti patří zavedení katétru transcervikálně pomocí tenkého endoskopu nebo lze kovový katétr zavést přes děložní krček za pomoci manipulace přes břišní stěnu (Svoboda *et al.*, 2001). Ovšem tento postup bývá velmi ztížený v důsledku zvláštní anatomické stavby pochvy feny. Dále se provádí v celkové anestezii intrauterinní inseminace pomocí laparoskopie. Nicméně tato invazivní metoda není příliš využívána, protože zde obvykle nebývá možnost opětovné inseminace (reinseminace) a to proto, aby se dbalo na pohodlí - welfare inseminovaných fen (Vitásek *et al.*, 2012).

Začátkem 70. let 19. století byla v Norsku vyvinuta technika transcervikální intrauterinní inseminace za pomoci speciálního rigidního katétru (Norský/Skandinávský katétr) u lišek, které byly chovány pro získávání kožešiny. Bylo zjištěno, že tato metoda je aplikovatelná i u fen, nicméně je obtížně proveditelná a vyžaduje zručnost veterináře (Vitásek *et al.*, 2012).

Endoskopicky asistovaná transcervikální intrauterinní inseminace je dokonalejší metodou, která umožňuje dopravit semeno až za děložní krček a zároveň je možno sledovat celý průběh inseminace jak veterinárním lékařem, tak majitelem feny (Vitásek *et al.*, 2012).

Před plánováním inseminace feny do dělohy je, především při použití mraženého semene, nutné znát přesnou fázi pohlavního cyklu feny (Vitásek *et al.*, 2012).

Úspěšnost umělé inseminace

Umělá inseminace bývá ve většině případů méně úspěšná než přirozená plemenitba. Je to dáno jejími metodami, kdy je semeno zavedeno do pochvy různým způsobem. Při přirozeném krytí pyj psa při svázání úspěšně zabraňuje zpětnému výtoky semene ven z pohlavních cest feny a semeno je protlačováno skrz děložní krček do dělohy feny. Svázání také velmi dobře podporuje kontrakce pochvy, dělohy i vejcovodu a tím tak nasávání semene do pohlavního traktu. Při umělém oplodnění je tento mechanismus těžko nahraditelný (Vitásek *et al.*, 2012).

Vitásek *et al.* (2012) ve své retrospektivní studii zjišťovali úspěšnost endoskopicky asistovaných intrauterinních inseminací, které byly postupně prováděny mezi lety 2007 – 2012 ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Údaje byly zjišťovány od 37 fen různých plemen, ve věku mezi 2 – 6 lety, o váze 5 – 66 kg a kdy jejich předchozí porody se pohybovaly v rozmezí 0 – 4. Byly použity tři různé formy ejakulátu. Nativním ejakulátem bylo inseminováno 25 fen, chlazeným spermatem 6 fen a mraženým spermatem také 6 fen. Před provedením samotné inseminace byla zjišťována hladina progesteronu v krvi u všech fen. Inseminace mraženým spermatem byla provedena až 2 – 4 dny po ovulaci, tedy v době, kdy byly ve vejcovodech k dispozici již zralé, oplození schopné oocyty. Použitý ejakulát byl vyšetřen makroskopicky i mikroskopicky a porovnán s doporučenými dávkami pro jednotlivé formy ejakulátu. Případné odchylky byly zaznamenány. Inseminační katétr byl zaveden přes děložní krček v hloubce 1 – 4 cm a bylo tak do dělohy vpraveno 0,5 – 2 ml ejakulátu. Zjištěním gravidity v 25. dni po inseminaci, nebo následným porodem, byla zjištěna úspěšnost této metody asistované reprodukce. Výsledky byly následující: po inseminaci nativním preparátem zabřezlo 15 fen (60%), po inseminaci chlazeným spermatem zabřezly 3 feny (50 %) a po inseminaci mraženým ejakulátem zabřezly také tři feny (50 %). K neúspěchu celkem sedmnácti inseminací vedly různé reprodukční obtíže, jako je pyometra (zánět dělohy), opakované cystitidy, inseminace semenem nízké kvality (nízká motilita spermií) nebo operace vaginální hyperplazie 8 dní před plánovanou inseminací (v době inseminace však byla pochva feny již zhojená). Došlo také k technickým potížím, jako je použití ejakulátu, jež během transportu zmrzl. Jedna fena nezabřezla ani po inseminaci, ani po přirozeném krytí. Pokud by nebyly brány v potaz reprodukční obtíže jednotlivých fen, které nezabřezly po inseminaci nativním ejakulátem a použití spermatu nízké kvality, dosahuje úspěšnost těchto inseminací 86 %.

Vitásek *et al.* (2012) ve své studii také porovnávají data, jež získali jiní vědci. Například Macedo *et al.* (2012) dosáhl 90 % úspěšnosti po inseminaci deseti fen plemene labradorský retrievr celkem třikrát během 48 hodinových intervalů nativním ejakulátem, jehož motilita byla 87 a 82 %. Linde – Forsberg *et al.* (1999) dosáhli úspěšnosti zabřezávání 57,9 % (inseminace intravaginálně), 84,4 % (intrauterinně pomocí norského katétru) a 58,9 % (intrauterinně pomocí endoskopu). Pretzer *et al.* (2006) dosáhli úspěšnosti zabřezávání 89,4 % u 137 fen plemene greyhaund, které byly inseminovány jednorázově intrauterinně pomocí rigidního cytoskopu. Wilson (1993) získal celkem 83,3 % březích fen (z celkového počtu 40), které inseminoval intrauterinně pomocí endoskopu a flexibilního katétru. Linde – Forsberg (2000) uvedla výsledky celkem 2041 inseminací: do pochvy nativním ejakulátem 47,8 %; chlazeným ejakulátem 45,1 %; mraženým ejakulátem 34,6 % a do dělohy nativním ejakulátem 65,2 %; chlazeným ejakulátem 65,6 %; mraženým ejakulátem 52,0 %.

Při umělé inseminaci feny čerstvým spermatem je úspěšnost nejvyšší a dosahuje přibližně 70 - 80%. Při použití semene krátce uchovaného se úspěšnost pohybuje okolo 50 - 60% a při použití mraženého spermatu úspěšnost klesá pod 40% (Svoboda *et al.*, 2001).

Úspěšnost výrazně ovlivňuje způsob zavedení semene do děložního aparátu feny. Aplikace semene do pochvy feny v místě před děložním krčkem úspěšnost inseminace snižuje, zatímco intrauterinní aplikace ji výrazně zvyšuje. To platí u konzervovaného, především mraženého semene (Svoboda *et al.*, 2001).

Dále je úspěšnost umělé inseminace závislá na kvalitě semene, kdy se především u mraženého semene setkáváme s jeho výrazně nižší oplozovací schopností a životaschopností spermií, která je již po hodině po rozmražení dávky nulová. Inseminaci je tedy proto vhodné provádět po celou dobu plodnosti feny, ideálně každý den tohoto období a samotná aplikace by měla být dosti rychlá (Svoboda *et al.*, 2001).

Při inseminaci mraženým ejakulátem je zabřezávání ovlivněno nižší schopností spermií proniknout zejména přes děložní krček a také zkrácená doba přežití spermií v reprodukční soustavě feny (Vitásek *et al.*, 2012).

3.4.2. *In vitro* zrání a *in vitro* oplození oocyty (IVM, IVF)

Metoda *in vitro* fertilizace může být využita například v případě, kdy sperma daného psa obsahuje nedostatečné množství spermií potřebné k oplodnění vajíček v pohlavním traktu feny (Hafez a Hafez, 2000).

Při prvním pokusu z roku 1976 o *in vitro* fertilizaci u psa domácího bylo dosaženo 20 – 30 % oplodněných oocytů. Další studie uvádí, že po kultivaci a oplodnění oocytů *in vitro* obsahovalo 34 % oocytů proniknutou spermii. Normální oplození, posuzované dle přítomnosti dvou prvojader a jednoho bičíku spermie v oocyty, bylo pozorováno pouze u 4 % oocytů. Ve stejné studii získali autoři sedm raných embryí (2 – 12 buněk) po IVF 85 vajíček. V pozdější studii bylo získáno 30 % oplodněných oocytů, z nichž ale polovina byla oplodněna více než jednou spermii. V této studii se též uvádí, že více oocytů bylo oplozeno, když byly získány od fen ve folikulární fázi (42,5 %) a anestrů (34,3 %), než v luteální fázi (18,6 %). Následný embryonální vývoj (8 buněk) proběhl u 10 % oplozených oocytů (Songsasen a Wildt, 2007).

V této první studii z roku 1976 týkající se *in vitro* zrání oocytů (IVM) a *in vitro* oplození (IVF) oocytů u psa bylo zjištěno, že přibližně 25 % ovarálních oocytů, jež byly získány od fen v rozdílných fázích ovulačního cyklu, bylo schopno během 48 – 72 hodinové kultivaci pokračovat v redukčním dělení. Po inseminaci těchto kultivovaných oocytů *in vitro* jich bylo přibližně 70 % schopno proniknutí spermie (Songsasen a Wildt, 2007).

V roce 2000 byla provedena studie, při níž bylo kultivováno *in vitro* 217 psích oocytů, které byly následně oplozeny a z nichž pouze jedno embryo dosáhlo stadia blastocysty. V roce 2001 byly v jiné studii získány oocyty od fen s indukovanou říjí a následně byly před IVF kultivovány po dobu 24 – 72 hodin. Bylo získáno celkem 88 jedno – a dvou – buněčných embryí, která byla přenesena do fen - příjemkyň. Tyto přenosy vedly pouze k jedinému zjištění březosti a to ve 20. dnu po embryotransferu. Tato březost byla bohužel po dalších dvou dnech samovolně ukončena (Songsasen a Wildt, 2007).

Získávání oocytů a spermií

Oocyty se u fen získávají z folikulů po laparotomii (chirurgické otevření břišní dutiny), laparoskopicky (endoskopická operační metoda používaná při operacích orgánů břišní dutiny) nebo bezprostředně po vyjmutí vaječnicků při ovariektomii, případně ovariohysterektomii (Svoboda *et al.*, 2001).

Nejvíce ovariálních folikulů lze získat od fen ve věku 1 - 6 let, oproti fenám mladším (< 12 měsíců) či starším (≥ 7 let). Co se týče plemenné příslušnosti, bylo zjištěno, že více ovariálních folikulů je možné získat od kříženek, než čistokrevných fen. Průměrné počty získaných ovariálních folikulů se udávají takto: $351,8 \pm 52,4$ od kříženek a $288,1 \pm 43,6$ od čistokrevných fen (Songsasen a Wildt, 2007).

Postup při získávání spermií včetně kontroly jejich kvality a životaschopnosti v pohlavním traktu feny byl uveden již v kapitole „Umělá inseminace (AI)“.

In vitro zrání oocytů

Mechanismy regulující jaderné zrání byly důkladně studovány u myši a krav. Nicméně přímá aplikace těchto poznatků u jiných druhů zvířat, včetně psa, nebyla úspěšná. Z toho vyplývá, že tyto mechanismy jsou druhově specifické (Songsasen a Wildt, 2007).

Mezi faktory ovlivňující vývoj oocytů *in vitro* patří regulace meiózy (oocyty nejsou vždy plně schopné dokončit jaderné zrání *in vitro*), věk, plemeno, fáze reprodukčního cyklu a velikost ovariálního folikulu. Někteří autoři uvádějí, že fáze reprodukčního cyklu neovlivňuje stupeň vývoje oocytu. Někteří uvádějí, že více oocytů dozrálo od fen, u kterých právě probíhal estrus, na rozdíl od fen v proestu nebo anestru. Nicméně i oocyty od fen v diestru byly schopné dosáhnout fáze MII *in vitro*, stejně jako oocyty od fen v estru (Songsasen a Wildt, 2007).

Uvádí se, že pouze 4 % psích oocytů, která byla kultivována po dobu 48 hodin *in vitro*, byla schopna dokončit MII. Ovšem oocyty kultivované po dobu 48 hodin a zároveň oplodněné *in vitro*, z 24 % vytváří prvojádro a vyvíjí se v rané embryo (13 % tvořících 4 – 8 buněk) (Songsasen a Wildt, 2007).

Luvoni *et al.* (2005) uvádí, že úspěšné zrání získaných oocytů je závislé na jejich velikosti. Získané oocyty byly rozděleny do tří skupin dle velikosti: < 100 μm , 100 μm a > 100 μm . Bylo zjištěno, že největší množství oocytů (20 %) větších než 100 μm bylo schopno dosáhnout zrání od MI do MII. Oproti tomu menší oocyty byly schopné dosáhnout fáze MII pouze ze 4 – 10 %. V další studii se uvádí, že oocyty větší než 120 μm byly schopny dosáhnout MII a oocyty < 110 μm tohoto zrání schopné nebyly. Proto bylo také nevrženo, aby se pro získávání oocytů pro IVM získávaly folikuly o velikosti > 2 mm a to i přesto, že nejsou k dispozici údaje, které by potvrdili nebo vyvrátili závislost mezi velikostí folikulu a schopností oocytů dosáhnout meiotického dělení *in vitro*. Závěrem lze říci, že pro úspěšné provedení IVM je zapotřebí, aby měly získané oocyty následující morfologické parametry:

tmavě pigmentovanou a homogenní cytoplazmu, průměr > 100 µm a musí být obklopené dvěma či více vrstvami granulózniých buněk. V případě, že mají oocyty jiný než kulovitý tvar, příliš světlou cytoplazmu, méně jak dvě vrstvy granulózniých buněk či jsou menší než 100 µm, musejí být zlikvidovány.

Psí oocyty obvykle dokončující jaderné zrání v rozmezí 48 – 72 hodin ve vejcovodech (*in vivo*). Ovšem jako optimální doba pro kultivaci oocytů se jeví 48 hodinový interval a to i přes to, že v delších časovém úseku (72 hodin) dozrává více oocytů. Delší čas kultivace však vede k degeneraci již zralých oocytů. Tento časový interval (48 hodin) rovněž koreluje s embryonálním vývojem po IVF (Songsasen a Wildt, 2007).

Snížená hladina kyslíku (5 %) při kultivaci oocytů významně ovlivňuje jejich zrání u myši nebo skotu. Ovšem při kultivaci psích oocytů (při IVM v mediu TCM 199 a CMRL) bylo prokázáno, že hladina kyslíku nemá na zrání oocytů významný vliv (5 %, nebo 20 % - obvyklá hladina kyslíku) (Luvoni *et al.*, 2005).

Psí oocyty jsou běžně kultivovány při teplotě 37 – 39 °C. Doposud nebyly prováděny žádné studie, které by se zabývaly rozdílnými teplotami při IVM a jejich vlivem na zrání oocytů (Luvoni *et al.*, 2005).

Faktory ovlivňující zrání a fertilizaci in vitro

Životaschopnost spermií po rozmražení

Byly zkoumány rozdíly v plodnosti mezi spermii získanými po ejakulaci a spermii získanými přímo z ocasu nadvarlete (epididymální) po jejich rozmražení. Studie prokázala, že mezi spermatem získaným těmito dvěma různými způsoby nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v jejich oplozovací schopnosti. Nicméně kryokonzervace výrazně oplozovací schopnost snižuje, a to zejména u epididymálních spermií, než u spermií získaných ejakulací. Proto, aby se dosáhlo vysoké plodnosti po inseminaci psími spermii získanými po ejakulaci i spermii získanými z ocasu nadvarlete (po kryokonzervaci) se doporučuje intrauterinní inseminace do obou děložních rohů, než aplikace velkého množství spermatu do jednoho děložního rohu (Hori *et al.*, 2011).

Martins *et al.* ve své studii z roku 2009 hodnotí životaschopnost spermií získaných z kaudální části nadvarlete po zmrazení a následném rozmrazení, jež byly uloženy ve dvou různých roztocích. Nadvarlata byla získána od čtyř psů (ve věku 2 – 8 let a s váhou < 10 kg) po plánované orchiektomii. Ocasní část nadvarlete byla pomocí anatomické svorky

vymačkána a bylo tak získáno sperma, které bylo rozděleno do dvou skupin. Jedna skupina byla vložena do Petriho misky obsahující 0,9 % solný roztok a druhá skupina do Petriho misky s Ringerovým roztokem bez laktátu. Ihned po odběru byla hodnocena pohyblivost spermií a koncentrace spermatu. Poté byly zorky centrifugovány po dobu 10 minut a získané sperma bylo následně zmrazeno. Zředěné sperma bylo uloženo do pejet o obsahu 0,5 ml, ochlazeno na teplotu 5 °C po dobu 60 minut, uloženo do tekutého dusíku, do páry 6 cm nad kapalným dusíkem po dobu 20 minut a následně přeneseno do tekutého dusíku a tak bylo skladováno v kryokontejneru po dobu jednoho roku. Pejety se rozmrazí tak, že se ponoří do vodní lázně o teplotě 70 °C podobu 8 vteřin. Rozmražené sperma bylo analyzováno systémem CASA. U každého vzorku bylo měřeno několik parametrů. Pod mikroskopem byly pozorovány spermie, které byly nejprve obarveny fluorescenční barvou. Zelené buňky byly považovány za neporušené a červené, nebo červenozelené buňky byly považovány za poškozené. Byl stanoven podíl intaktních buněk (Martins *et al.*, 2009).

Pro testování kvality spermií byly získávány oocyty od fen při plánované ovariohysterektomie. Vaječníky byly transportovány do laboratoře při pokojové teplotě v solném roztoku. Poté byly jednotlivě přeneseny do Petriho misek pomocí stereomikroskopu. Pro testování spermatu byly vybrány pouze oocyty o velikosti cca 100 μm, s tmavou cytoplazmou a obklopené třemi nebo čtyřmi vrstvami kumulárních buněk (Martins *et al.*, 2009).

Oocyty a spermie byly inkubovány ve zvlhčené atmosféře obsahující 5 % CO² při teplotě 38 °C po dobu 18 hodin. Oocyty byly analyzovány fluorescenční mikroskopií při 400 x zvětšení a bylo stanoveno procento spermií, které byly vázány na *zonu pellucidu*, nebo pronikly přímo do oocytů (Martins *et al.*, 2009).

Studie prokázala, že morfologické a funkční vlastnosti semene byly podobné u obou skupin. Nicméně procento spermií, které byly navázané na oocyty, bylo podstatně vyšší u skupiny č. 2 (54,3 % ± 21,9 %), oproti skupině č. 1. (34,5 % ± 11,4 %). Podobných výsledků dosáhli De los Reyes *et al.* v roce 2004 (34 %). Podstatně vyšší podíl uvádí ve své studii z roku 2005 Silva (72 %). Závěrem lze říci, že lepších výsledků dosáhly spermie uložené v Ringerově roztoku, který pravděpodobně svým minerálním složením podporoval ochranu spermií před chladovým stresem (Martins *et al.*, 2009).

Podobnou studii provedl Martins *et al.* také v roce 2012, kdy získal varlata od 13 dospělých psů různých plemen (věkové rozmezí 2 – 8 let, hmotnost < 15 kg) při plánované orchiektomii. Cílem této studie bylo zjistit vliv dvou různých ředidel (konzervačních roztoků) na životaschopnost spermií. Odebraná varlata byla uchována

při teplotě 5°C po dobu 24 hodin v solném roztoku. Poté, podobně jako v předchozí studii, bylo získáno sperma (Petriho miska s Ringerovým roztokem bez laktátu). Ihned po odběru, ještě před rozdělením spermatu do jednotlivých pejet, byla subjektivně hodnocena pohyblivost spermií, celistvost membránových struktur (morfologie) a celková koncentrace. Poté byla provedena centrifugace, odstranění supernatantu a jednotlivé pejety byly zředěny dvěma ředidly. Prvním bylo ředidlo Bovimix® (běžně užívané při reprodukci skotu) a druhým TRIS – glukóza (2,4g TRIS, 1,4g kyseliny citrónové, 0,8g glukózy, 20% vaječného žloutku, 7% glycerolu, 1% Orvus® WA Paste – Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA a 0,02% ampicin) se 7% glycerolu na konečnou koncentraci 80×10^6 spermií/ml. Pejety byly zchlazeny stejným způsobem, jako v předchozí studii. Zmražené byly uchovány v kryokontejneru po dobu třech měsíců a poté stejným způsobem rozmrazeny a analyzovány systémem CASA.

Kryokonzervace, podle očekávání, vyvolala změny na membránových strukturách spermií a celkově zhoršila životaschopnost spermií. Sledováno bylo celkem patnáct parametrů životaschopnosti spermií. Celkově se jako lepší ředidlo jevil Bovimix®, oproti ředidlu TRIS. Závěrem studie lze říci, že Bovimix® by se mohl úspěšně používat při kryokonzervaci psího spermatu. Nutné je však provést další studie, které by vedly ke zjištění, jak omezit poškozování spermií po jejich rozmrazení (Martins *et al.*, 2012).

Kim *et al.* (2007) ve své studii zkoumali počty fen, které zabřezly po intratubální (aplikace semene do vejcovodů) inseminaci rozmraženého semene. Po intratubální inseminaci fen rozmraženým semenem o obsahu spermií 4×10^6 zabřezlo pouze 20% inseminovaných fen. Nicméně po intrauterinní inseminaci fen rozmraženým semenem o obsahu spermií jen 5×10^6 došlo k zabřeznutí u 80% fen a při inseminaci semenem o obsahu spermií 5×10^7 došlo k 100% zabřeznutí.

Kapacitace spermií

Pro uplatnění své fertilizační schopnosti musí spermie nejdříve projít kapacitací a akrozomální reakcí. Proces kapacitace je spouštěn signály z reprodukčního traktu samice a je spojený s celou řadou změn, které se dějí uvnitř i na povrchu spermie. Dochází ke zvýšení hladiny vápníku a pH, ke zvýšení či snížení aktivity některých enzymů a následné změně struktury specifických proteinů uvnitř spermie. Z plazmatické membrány spermie se vylučuje cholesterol a odplavují se proteiny semenné plazmy navázané během ejakulace, čímž dochází k odkrytí receptorů, které jsou potřeba k rozpoznání a vazbě na vajíčko. Během kapacitace

zároveň dochází i k hyperaktivaci motility. To umožní spermii lépe proniknout obaly vajíčka. Počátek kapacitace a její konec je dán druhem zvířete, rychlost děje je podmíněna kvalitou spermatu, teplotou a hormonálním stavem samice (Hafez a Hafez, 2000; Tůmová *et al.*, 2015). V podmínkách *in vitro* ovlivňuje kapacitaci složení kultivačních médií či teplota (Hasegan *et al.*, 2012).

Oplození nezralých oocytů

Vzhledem k tomu, že k páření může dojít již 3 dny před ovulací, je možné, že se spermie setkají ve vejcovodu s nezralými oocyty. Penetrace spermií se podílí na vyvolání jaderného zrání, tj. meiózy. Nicméně *in vivo* studie prokázaly, že k oplození nedochází až 44 – 120 hodin po ovulaci, dokud není dokončeno jaderné zrání oocytu. Ovšem toto pozorování *in vivo* je v rozporu s pozorováním *in vitro*, kdy bylo prokázáno, že zrání oocytu není předpokladem pro proniknutí spermie do *zony pellucidy* (ZP) a její následné jaderné dekonkondenzace. Navíc bylo dokázáno, že docházelo *in vitro* s větší pravděpodobností ke zrání oocytu za přítomnosti spermií, než bez nich. Na základě těchto pozorování, kdy dochází k rozdílům mezi *in vivo* a *in vitro* oplozením, je zřejmé, že limitujícím faktorem pro oplození oocytu bude s větší pravděpodobností opožděná kapacitace spermií ve vejcovodu, než nezralost oocytů (Songsasen a Wildt, 2007).

Psí spermie jsou schopny v podmínkách *in vitro* pronikat i do nezralých oocytů a formovat samčí pronukleus (prvojádro). Tato penetrace spermie vyvolá znovuzahájení meiózy oocytů (od MI). Po proniknutí do savčího oocytu vyvolávají spermie náhlé změny v metabolismu intracelulárního Ca^{2+} , které jsou nezbytné pro dokončení druhého meiotického dělení a pro pokračování vývoje embrya. Z toho vyplývá, že intra - a extra - celulární Ca^{2+} hraje důležitou roli při obnovení a dokončení meiózy. Tak je možné, že po proniknutí spermie do oocytu je meióza obnovena prostřednictvím jednoho či více Ca^{2+} (Songsasen a Wildt, 2007).

Snížená schopnost spermií proniknout do oocytu má za následek, že pouze 4 – 10 % všech oocytů obsahují obě prvojádra po IVF (samičí i samčí). Zčásti to je způsobeno proniknutím více spermií do oocytu, tzv. polyspermií (Hall *et al.*, 2013).

Polyspermie

Je známo, že může dojít i k oplození nezralého oocytu spermií (i několika – polyspermie), a to jak *in vitro*, tak *in vivo*. Proniknutí spermií do nezralých oocytů

je s největší pravděpodobností ovlivňováno kultivačními podmínkami *in vitro* (bývají optimálnější než podmínky *in vivo*), nebo také použitím oocytů, u kterých nebylo dosaženo cytoplazmatického zrání (získaných z menších folikulů) (Reynaud *et al.*, 2006).

Polyspermie neboli oplození oocytu více spermii je poměrně častá u fertilizace oocytů *in vitro*. Bylo zjištěno, že až 6 – 59 % oocytů bylo oplozeno více jak jednou spermii. Nicméně v jiné studii, kdy bylo získáno celkem 112 nezralých oocytů (GV v telofázi I) od třiceti žen v době 17 – 127 hodin po ovulaci a po umělém oplození, byly zjištěny pouze tři oocyty (od jedné ženy), které obsahovaly hlavičku spermie. Proto by za normálních okolností (po páření a *in vivo* oplození oocytů) měl být průnik spermii do nezralých oocytů brán jako ojedinělá událost. Nicméně proniknutí spermii do nezralých oocytů bylo také pozorováno u oocytů získaných z preovulačních folikulů, tudíž původem oocytů lze jen částečně vysvětlit tento jev. Mimo to polyspermie nebyla prokázána po fertilizaci nezralých oocytů *in vivo* (Reynaud *et al.*, 2006).

Kultivační media

Složení kultivačních médií ovlivňuje zrání oocytů a následný embryonální vývoj. Média jsou klasifikována jako jednoduchá nebo komplexní. Jednoduchá media jsou založena na bázi fyziologického roztoku se zdrojem energie, jako je pyruvát, laktát a glukóza. Komplexní media navíc obsahují směs aminokyselin, vitamínů a dalších molekul (Luvoni *et al.*, 2005).

Pro metody asistované reprodukce u psů se využívají, mimo jiné, především tato tři kultivační media: TCM 199, SOF (synthetic oviductal fluid) a CMRL 1066 (Connaught Medical Research Labs), které se běžně využívá při zrání oocytů makaka rhesus. Původně vědci uváděli, že mezi medii TCM 199 a SOF není významný rozdíl, který by ovlivňoval schopnost zrání oocytů. Nicméně bylo následně zjištěno, že TCM 199 medium se jeví jako prospěšnější. Je v něm obsaženo více vitamínů a má vyšší koncentraci cysteinu a kyseliny askorbové, než v mediu CMRL 1066. Bylo prokázáno, že kyselina askorbová a cystein chrání buňky před oxidačním stresem a zlepšují zrání oocytů (zjištěno u krav a myší). Velmi prospěšné je obohacení kultivačních médií o určité antioxidanty, jako je thiolová sloučenina nebo β - merkapoethanol, které snižují riziko oxidačního stresu u psích oocytů obsahujících poměrně vysokou hladinu intracelulárních lipidů (Songsasen a Wildt, 2007).

3.4.3. Přenos embryí / embryotransfer (ET)

Nejvýznamnějšími důvody pro uplatnění přenosu embryí u psů bývá organizační hledisko (kdy jsou od sebe obě vybraná zvířata hodně vzdálená), nebo zdravotní hledisko (např. možná léčba neplodnosti nebo zabránění přenosu některých onemocnění či infekcí). Psi se také využívají jako modelová zvířata při propracování metod umělé inseminace u různých druhů divokých zvířat jim podobných. Také je zapotřebí dlouhodobého uchování konzervovaných embryí u ohrožených druhů zvířat. Limitujícím faktorem pro takovýto způsob podpory ohrožených druhů bývá nepřesná schopnost synchronizovat říje mezi dárci a příjemci (výběr říjících zvířat v kombinaci s indukcí říje pomocí aplikace eCG nebo hCG), také technická náročnost a náhled chovatelů (Svoboda *et al.*, 2001).

Na uplatnění přenosu embryí se velikou měrou podílí možnost jejich *in vitro* produkce. Mezi tři základní stupně *in vitro* produkce embryí patří *in vitro* zrání (IVM) oocytů do stadia metafáze II, *in vitro* fertilizace (IVF) a *in vitro* kultivace embryí, při které dochází k dělení oplozeného vajíčka do stadia 8 blastomer (Svoboda *et al.*, 2001).

Pro získání embryí je obvykle prováděna ovariohysterektomie v době od 17. do 20. dne po ovulaci. Zhruba 9. – 10. den po ovulaci se oocyty nebo embrya nacházejí ve vejcovodech a jejich získávání vyžaduje pečlivou disekci vejcovodů. Následuje propláchnutí vejcovodů pomocí tenkého katétru. V této době je *corona radiata* stále pevně spojena s oocytem, a to i ve fázi prvojádra. Tyto folikulární buňky mizí až 5. – 7. den, a to zejména až ve fázi dvou prvojader, či ve fázi embrya obsahujícího 8 buněk. V této fázi (8 buněk), měla ještě některá embrya jednu vrstvu kumulárních buněk, některá již ne. Zygoty byly pozorovány 72 – 124 h (3 – 5 dní) po ovulaci. Dvoubuněčná embrya byla zjištěna 96 – 168 hodin (4 – 7 dní) po ovulaci. Průměr těchto embryí se pohyboval v rozmezí 110 – 170 μm . Přibližnou vývojovou rychlostí embrya byl jeden buněčný cyklus během 24 hodin a byl ukončen 10. den po ovulaci. Osmi buněčná embrya byla pozorována v rozmezí 112 – 288 hodin (4,5 – 12 dní) po ovulaci a v této fázi též dochází k aktivaci embryonálního genomu. Embrya ve fázi 8 – 16 buněk měla průměr přibližně 188 – 200 μm (včetně vrstvy *zona pellucida*) a nacházela se stále v distálních částech vejcovodů. Později (8,5 – 10 den po ovulaci), byly viditelné moruly, které postupně začínaly vstupovat do děložních rohů (v této fázi, nebo ve stadiu blastocysty; 10 – 12 dní). V děložních rozích byly již nalezena pouze embrya ve stadiu pozdní blastocysty. Jejich velikost se v tomto stadiu zvětšuje postupně z 215 – 350 μm (časná blastocysta) až na velikost 1000 μm (pozdní blastocysta).

Během vývoje blastocysty v děložních rozích dochází ke ztenčení a výraznému zvýšení propustnosti *zony pellucidy*, blastocysty se tak volně pohybují v děložních rozích a dosahují postupně velikosti až 2300 μm . Ještě před implantací embryí, která obvykle probíhá od 12. do 16. – 17. dne po ovulaci, může docházet k transuterinní migraci embryí. Tento proces byl pozorován až u 48 – 49 % fen. Pravděpodobně při tomto procesu dochází k ustálení počtu plodů mezi dvěma děložními rohy, kdy byl zaznamenán podstatný rozdíl v počtu žlutých tělísek mezi oběma vaječníky. Přibližně 16. – 20. den po ovulaci blastocysty dosáhly velikosti až 2500 μm (2,5 mm) a došlo již k odstranění *zony pellucidy*. Implantace embryí byla dokončena 18. – 21. den po ovulaci (Reynaud *et al.*, 2006).

3.4.4. Přenos jádra somatické buňky (SCNT)

Tato technologie by mohla přispět ke zlepšení psí reprodukce, i pro zachování významných psích jedinců. Může šířit vlastnosti, které jsou u psů žádoucí. Taktéž může opětovně reprodukovat jedince, kteří už jsou staří, kastrování, nebo již po smrti (Hall *et al.*, 2013).

Koncept klonování psa byl podpořen již v roce 1997, ovšem z počátku nebyl úspěšný. Prvního psa jménem Snupy, se podařilo naklonovat v roce 2005. Uvádí se, že byly snahy o naklonování již více jak 50 psů s přibližnou mírou březosti téměř 18 % a průměrné porodnosti živých štěňat 1,42 % z celkového počtu transferovaných embryí (Hall *et al.*, 2013).

V současné době existuje několik firem, které se klonováním psa zabývají, nebo nabízejí možnost konzervace psích buněk pro výrobu budoucích psích klonů. Tyto technologie se stávají dokonalejšími a levnějšími (Hall *et al.*, 2013).

Dokonce byl již použit mezidruhový SCNT. Vlk je v mnoha zemích považován za ohrožený druh a tak se podařilo naklonovat vlka pomocí jaderné informace vlčí somatické buňky, psiho vajíčka zbaveného jádra a příjemce (Hall *et al.*, 2013).

4. Závěr

Mezi nejrozšířenější metody asistované reprodukce u psů patří umělá inseminace (AI). Ta může být prováděna několika způsoby v závislosti na místě deponace semene v pohlavním traktu feny (intravaginální, transcervikální intrauterinní, intratubulární inseminace). Uskutečněna může být za použití nativního, chlazeného či mraženého semene. Způsob provedení inseminace ovlivňuje úspěšnost samotného zabřezávání. Obecně lze říci, že nejúspěšnější bývá provedení intratubulární inseminace čerstvým spermatem.

Další metodou je reprodukce za pomoci *in vitro* oplození oocyty (IVF) a následném embryotransferu. Úspěšnost této metody je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří například způsob odběru pohlavních buněk, způsob jejich uchování, kultivační medium, mechanismy regulující jaderné zrání (IVM) a jiné. Je zřejmé, že je potřeba dalších výzkumů, které povedou k pochopení molekulárních mechanismů, které řídí zrání oocytů a embryonální vývoj u psů. Výzkumy zabývající se procesem ovulace a oplození *in vivo* budou nápomocné pro získání větších úspěchů při postupech IVM.

Nelze opomenout ani metodu tzv. klonování, tedy přenosu jádra somatické buňky (SCNT) do oocyty zbaveného jádra za pomoci příjemkyně. Tato technologie prozatím nedosahuje významných úspěchů, proto je stále ve fázi dlouhodobého výzkumu.

Klíčovým se zdá najít výhodnější řešení pro dlouhodobé skladování gamet. Dosažení úspěšného zmrazení spermií a kryokonzervace oocytů by vedlo k většímu rozsahu reprodukčních technologií. Promyšlené techniky zrání oocytů a oplodnění *in vitro* spolu s kryokonzervací oocytů by mohly umožnit snadné vytvoření genetických kombinací. Tím by mohlo být usnadněno rozšíření ohrožených druhů (psovitých) šelem.

V neposlední řadě slouží pes jako modelový živočich při výzkumu různých zdravotních poruch, včetně těch reprodukčních, které bývají velice podobné či dokonce shodné s lidskými.

5. Seznam použité literatury

- Červený, Č. Č. 2011. Vademecum anatomie domácích savců. Brázda. Praha. 272 s. ISBN: 9788020903891.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829-838.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p. 509. ISBN: 9780683305777.
- Haşegan, I., Şonea, A., Matei, M., Vintilă, L., Ion, C., Bîrţoiu, A. 2012. *Animal Science and Biotechnologies*. 45 (1). 163-171.
- Hori, T., Matsuda, Y., Kobayashi, M., Kawakami, E., Tsutsui, T. 2011. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 73 (12). 1685-1688.
- Hošek, L. Stanovení luteinizačního hormonu (LH) při časování říje u fen. 2014. *Veterinářství*. 64. 501-506.
- Hyttel, P., Farstad, W., Mondain-Monval, M., Bakke, L., Smith, A. J. 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anatomy and Embryology*. 181. 325-331.
- Kim H. J., Oh H. J., Jang G., Kim M. K.. 2007. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. *Journal of Veterinary Science*. 8(1). 75-80.
- König, H. E., Liebich, H. G. 2002. *Anatomie domácích savců 2. díl. Svornost'*. Bratislava. 416 s. ISBN: 8088700574.
- Luvoni, G. C. 2000. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reproduction, Nutrition, Development*. 40 (5). 505-512.
- Martins, M. I., Padilha, L. C., Souza, F. F., Lopes, M. D. 2009. Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. *Reproduction in Domestic Animal*. 44 (2). 342-344.
- Přinosilová, P., Kopecká, V., Kunetková, M., Šípek, J. 2012. Odběr epididymálních spermií psa za účelem kryokonzervace – popis dvou případů. *Veterinární klinika*. 9. 232-235.

- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jilek, F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. 60. 1609–1620.
- Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia, Praha, 478 s.
- Soares, J. M., Avelar, G. F., França, L. R. 2009. The seminiferous epithelium cycle and its duration in different breeds of dog (*Canis familiaris*). *Journal of Anatomy*. 215 (4). 462-471.
- Songsasen, N., Wildt, D. E. 2007. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*. 98 (1-2). 2-22.
- Svoboda, M., Senior, D. F., Doubek, J., Klimeš, J. a kol. 2001: Nemoci psa a kočky – II. díl. ČAVLMZ – Noviko, Brno, 1026 s., ISBN: 80-902595-3-7.
- Tůmová, L., Chmelíková, E., Sedmíková, M., Vochomůrková, E. 2015. Oplození savčího vajíčka. *Náš chov*. 4. (v tisku).
- Vitásek, R., Přinosilová, D., Bartošková, A. 2011. Využití hodnot progesteronu při hárání k predikci termínu porodu fen. *Veterinářství*. 61. 63-65.
- Vitásek, R., Janošovská, M., Husník, R., Novotný, R. 2012. Endoskopicky asistovaná transcervikální intrauterinní inseminace: retrospektivní studie. *Veterinární klinika*. 9. 227-231.
- Wassarman, P. M., Albertini D. F. 1994. The mammalian ovum. The physiology of reproduction. 2nd. ed. Raven Press. New York.

6. Seznam použitých zkratk

AI	umělá inseminace (z ang. artificial insemination)
eCG	koňský choriový gonadotropin
ET	přenos embryí (embryotransfer)
FSH	folikulostimulační hormon
GnRH	hormon uvolňující gonadotropiny
hCG	lidský choriový gonadotropin
<i>In situ</i>	na místě
<i>In vitro</i>	v umělých podmínkách
<i>In vivo</i>	v přírodních podmínkách
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
IVM	<i>in vitro</i> zrání
IVP	<i>in vitro</i> produkce (embryí)
LH	luteinizační hormon
MI	metafáze prvního meiotického dělení
MII	metafáze druhého meiotického dělení
OVT	pokročilé časování říje (z ang. ovulation timing)
SCNT	přenos jádra somatické buňky (z ang. somatic cell nuclear transfer)