

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Umělá inseminace fen

Bakalářská práce

Autor práce: Andrea Zvěřinová

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

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Umělá inseminace 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

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, Ing. Jiřímu Šichtařovi, který mi byl velmi nápomocen při vyhledávání odborných zdrojů a samotném zpracování rešerše. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli, kteří mě maximálně podporovali.

Umělá inseminace fen

Souhrn

Tato bakalářská práce pojednává o umělé inseminaci fen. Anatomie feny se nijak neliší od ostatních savců a její reprodukční orgány mají úměrnou velikost vzhledem k velikosti těla. Naopak fyziologie feny je velmi specifická, a proto se umělé oplodnění u fen rozvíjelo pomaleji. Říjový cyklus se skládá z proestru, estru, při kterém dochází k ovulaci, metestru a anestru. Díky velké rozmanitosti plemen, kterých máme v současné době více než 400, jsou některé feny monoestrické, diestrické či polyestrické. Další zvláštností ve fyziologii feny je období, kdy může být oplodněna, tzv. fertilizační perioda. Oocyt feny totiž ještě není při ovulaci zralý, jelikož nedokončil meiotické dělení. To je dokončeno až přibližně 2 dny po ovulaci, kdy nastává optimální doba pro oplodnění. Reprodukce je u feny řízena hormonálně. Podstatou ovulace je změna poměru koncentrací estrogenu a progesteronu. Zároveň je důležitá koncentrace luteinizačního hormonu (LH) tvořící tzv. LH vlnu, jejíž vrchol stimuluje ovulaci.

Pro úspěch umělé inseminace je nejdůležitější stanovení optimální doby pro oplodnění. Ta nastává, když fena tzv. hárá. Detekce optimálního času inseminace je prováděna na základě biotechnologických metod – vaginální cytologie, vaginoskopie či progesteronového testu. Pokud se tedy hladina progesteronu pohybuje mezi 6 až 10 ng/mL, je vhodné přistoupit k samotné inseminaci.

Umělá inseminace má dva přístupy – invazivní a neinvazivní. Mnohem šetrnější je inseminace neinvazivní, která může probíhat buď transvaginálně nebo transcervikálně. Nejběžnějším způsobem inseminace je inseminace transvaginální. Nejčastěji probíhá bez speciálního vybavení, přímou aplikací čerstvého či chlazeného semene do pochvy. Její úspěšnost dosahuje až 95%. Transcervikální inseminace je založena na aplikaci nejčastěji mraženého semene přímo k děložnímu krčku. Úspěšnost této techniky se liší v jednotlivých studiích, průměrně je to mezi 50 – 80%. Tato metoda rozeznává 2 přístupy. Skandinávská metoda je ale obtížně uskutečnitelná u obézních a nervózních fen, jelikož vyžaduje manuální fixaci děložního krčku. Novozélandská metoda využívá endoskop, který umožňuje dobrou orientaci, avšak je obtížné ho použít u miniaturních či obřích plemen vzhledem k délce jejich vagíny. K chirurgické inseminaci by se mělo přistupovat pouze ve výjimečných případech. Tento zákrok totiž vyžaduje celkovou anestezii, která je pro organismus feny velmi náročná. Z tohoto důvodu je v několika, zejména severských zemích, tento způsob inseminace zakázán.

Klíčová slova: reprodukce, fena, inseminace, načasování ovulace

Artificial Insemination in Bitch

Summary

This bachelor work is about artificial insemination. Anatomy of a bitch is not different from other mammals and her reproductive organs are proportional to the size relative to body size. Conversely, bitch physiology is very specific and therefore the artificial insemination in bitches developed slower. Estrus cycle consist of proestrus, oestrus at which ovulation occurs, metoestrus and anoestrus. Thanks to the wide variety of breeds, which we currently have over 400, some bitches are monoestric, diestric or posestric. Another distinction in physiology is the period when the bitch can be fertilized, also called fertilization period. During the ovulation the oocyte is not mature yet, because it does not ended the meiosis. The meiosis is ended approximately 2 days after ovulation when the optimal period for fertilization begins. Reproduction is controlled by the hormones in bitch. The essence of ovulation is the change of the concentrations of oestrogen and progesterone. The level of luteinizing hormone (LH) is also important, because it makes LH surge whose peak stimulates ovulation.

For the success of artificial insemination is important to determine the optimum time for fertilization. This occurs when a bitch is willing to mate. Detection of this period also takes place on the basis of biotechnological methods – vaginal cytology, vaginoscopy or progesterone assay. Therefore, if progesterone levels between 6-10 ng/mL, it is advisable to inseminate.

The artificial insemination has two approaches – surgical and non-surgical. The non-surgical technique is much sparing. There are two approaches – transvaginal and transcervical. The transvaginal insemination is the most common approach. There is no need of the special equipment. The semen is fresh or chilled and is deposit directly into the vagina. The success of this technique is almost 95%. Transcervical insemination is based on applying the semen directly into the cervix. The semen is mostly frozen. There 2 approaches of this technique. Scandinavian method is difficult in obese or nervous bitches, because it requires manual fixation of the cervix. New Zealand method uses an endoscope which enables easy orientation, but it is difficult to use in miniature or giant breeds due to the lenght of their vaginas. The surgical approach should be used only in rare cases. This technique requires anaesthesia and abdominal surgery. It is very demanding for the bitch's organism. Because of that the surgical approach is forbidden in the Nordic countries.

Keywords: reproduction, bitch, insemination, ovulation timing

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod..... | 8 |
| 2 Cíl práce | 9 |
| 3 Anatomie pohlavního aparátu feny | 10 |
| 3.1 Vaječníky | 10 |
| 3.2 Vejcovody | 11 |
| 3.3 Děloha | 11 |
| 3.4 Pochva | 12 |
| 3.4.1 Poševní předsíň | 13 |
| 3.4.2 Zevní pohlavní orgány | 13 |
| 4 Fyziologie pohlavní soustavy feny..... | 14 |
| 4.1 Hormonální řízení | 14 |
| 4.2 Folikulogeneze a oogeneze | 16 |
| 4.3 Oplození | 18 |
| 4.4 Estrální cyklus | 18 |
| 4.4.1 Proestrus..... | 19 |
| 4.4.2 Estrus | 20 |
| 4.4.3 Metestrus a diestrus (luteální fáze) | 21 |
| 4.4.4 Anestrus | 22 |
| 5 Stanovení optimální doby pro inseminaci..... | 23 |
| 5.1 Zevní projevy říje | 23 |
| 5.2 Vaginální cytologie | 23 |
| 5.3 Vaginoskopie..... | 24 |
| 5.4 Progesteronový test | 24 |
| 5.5 Stanovení optimální doby pro inseminaci | 25 |
| 6 Přirozená plemenitba | 26 |
| 7 Umělá inseminace..... | 26 |
| 7.1 Odběr a hodnocení spermatu..... | 27 |
| 7.2 Neinvazivní metody inseminace | 30 |
| 7.2.1 Transvaginální inseminace | 30 |
| 7.2.2 Transcervikální inseminace (TCI) | 31 |
| 7.3 Invazivní (chirurgická) inseminace..... | 32 |
| 7.4 Výhody a nevýhody | 33 |
| 7.5 Legislativa | 34 |
| 8 Závěr..... | 35 |
| 9 Obrazová příloha | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 10 Seznam použitých zdrojů | 40 |
|---|-----------|

1 Úvod

Pes byl prvním domestikovaným zvířetem. Doprovází člověka po tisíciletí na každém kroku při lovu či honu, chrání ho a zejména je mu věrným přítelem.

V posledních několika stoletích došlo k zintenzivnění chovu, bylo vyšlechtěno mnoho plemen a v současnosti jich je přes 400.

V posledních dekádách díky pokroku ve veterinární medicíně dochází k zintenzivnění veterinární péče. S tím souvisí i dohled nad reprodukcí. Po tisíciletí se psi rozmnožovali přirozeně a tento způsob je i dnes nejžádanějším a nejdůležitějším. Stále častěji se ale vyskytují případy, kdy musí být přirozený způsob plemenitby vyloučen. Je tomu tak v případě určitých anatomických anomálií nebo v případě, že se jedná o záchranu plemene, jehož konstituce vlivem šlechtění neumožňuje přirozenou reprodukci, jak je tomu v současné době u anglických buldoků.

Dalším důvodem vyloučení přirozené plemenitby mohou být i finance. V případě, že je naplánováno krytí několika fen jedním samcem, nebo samce a samici dělí velká vzdálenost, je ideální odebrat psovi semeno, připravit z něj inseminační dávky a ty odeslat chovatelům, se kterými bylo dohodnuto krytí.

Ve všech těchto případech je možno využít umělou inseminaci.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vytvoření literární rešerše shrnující nejnovější poznatky pojednávající o umělé inseminaci fen.

3 Anatomie pohlavního aparátu feny

Pohlavní ústrojí feny vytváří samičí pohlavní buňky a poskytuje vhodné prostředí a výživu rozvíjejícímu se zárodku a plodu. Kaudální části samičího pohlavního ústrojí jsou uzpůsobeny pro přijetí samčího semene při kopulaci a slouží i jako porodní cesty při vypuzování zralého plodu (Evans et de Lahunta, 2013).

Samičí pohlavní ústrojí se skládá z vaječníku, v němž se vyvíjejí vajíčka, a z vývodných samičích pohlavních cest. Vaječník má bohatě prokrvený vazivový základ, v němž jsou zárodečné buňky uloženy v primárních vaječných váčcích.

Vývodné pohlavní cesty tvoří vejcovod, děloha a pochva. Vejcovod začíná v blízkosti vaječníku, kde ústí volně do pobřišniční dutiny, druhým koncem ústí do dělohy. Děloha je mohutně rozšířená část vývodných pohlavních cest. Má velmi silnou svalovou stěnu, která jí nejen umožní značné rozšíření během březosti, ale i svými silnými stahy při porodu vypudí zralý plod.

Porodní cesty i kopulační orgány tvoří pochva navazující kaudálně na dělohu. Vlastní samičí vývodné pohlavní cesty končí v místě, kde do nich ústí močová trubice. Další, již společnou vývodnou cestou, je poševní předsíň (Najbrt et al., 1982).

3.1 Vaječníky

Vaječníky jsou párové oválné orgány, připojené vlastním okružím (tzv. mesovarium) k břišní stěně. Mesovarium je část širokého vazy, která mimo jiné obsahuje cévy. Vaječníky leží kaudálně od ledvin a obsahují oocyty. Dochází zde k syntéze některých samičích pohlavních hormonů. U feny o váze cca 12,5 kg měří tyto žlázy přibližně 1,5 cm, široké jsou asi 0,5 cm a váží cca 0,3 g. Vaječník je umístěn směrem k nálevce vejcovodu, která je díky svému řasnatému epitelu schopna zachytit a posouvat dál zralé vajíčko (Evans et de Lahunta, 2013).

Vaječník je zcela uzavřen v ovariální burze, která je otevřena do peritoneální dutiny pouze úzkou štěrbinou na její mediální straně v délce asi 0,8cm (Svoboda et al., 2001). Jedná se o malý váček obklopující vaječník, tvořený závěsem vejcovodu. Její velikost je různá a závisí na věku a velikosti feny (Evans et de Lahunta, 2013).

Předtím, než u feny dojde k první říji, je povrch vaječníku hladký. U fen, které již několikrát rodily, bývá povrch zvrásněný a hrbolatý. Může se také stát, že jeden z vaječníků, většinou levý, je větší (Evans et de Lahunta, 2013). U sexuálně zralé průměrně velké feny je levý vaječník umístěn přibližně 12 cm kaudálně od třináctého žebra a 1 až 3 cm od levé

ledviny a leží mezi břišní stěnou a sestupným tračníkem. Pravý vaječník je poté lokalizován přibližně 10 cm kaudálně od posledního žebra na pravé straně. U feny, která absolvovala několik porodů, se vaječníky mohou posunout kaudálně a ventrálně (Wildt et al., 1977).

Vaječníky se skládají z kůry, dřene a obalu z tuhého vaziva. Kůra je složena z pojivové tkáně, která obsahuje velké množství folikulů. Dřen tvoří hladká svalovina a pojivová tkáň a procházejí jí krevní a lymfatické cévy a nervy (Evans et de Lahunta, 2013).

Výživa probíhá prostřednictvím krve, kterou sem přivádí vaječnicková tepna. Krev je poté odváděna pravou a levou žilou, které mají rozdílné zakončení. Pravá žíla se napojuje na dolní dutou žílu a levá na ledvinovou žílu (Del Campo et Ginther, 1974).

3.2 Vejcovody

Vejcovody jsou trubicovitý párový orgán, který slouží k transportu oocyty do dělohy. Měří přibližně 4 až 7 cm s průměrem od 1 do 3 mm.

Začátek vejcovodu je opatřen nálevkou, která je otevřena směrem k ovariální burze. Tato nálevka je lemována velkým množstvím řasinkatých útvarů – tzv. fimbriemi. Od ovulace po zachycení oocyty fimbriemi se vajíčko nachází vlastně v peritoneální dutině. Ale díky tomu, že v době ovulace jsou fimbrie oteklé a schopné pohybu, je oocyt pohlcován do vejcovodu, čemuž také pomáhá folikulární tekutina a hlen, který je produkován sekrečními buňkami. Pohyb oocyty, zygoty či blastocysty směrem k děloze je umožněn hlavně díky peristaltickým pohybům a činnosti řasinek, které vystylají vnitřní stěnu. Ke splnutí vajíčka a spermie dochází většinou v blízkosti nálevky.

Vejcovod se v dolní části otevírá směrem k děloze a toto místo je nazýváno ústí vejcovodu. Je to velmi důležitá část opatřená svěračem, který může regulovat průchod spermií dále do vejcovodu (Evans et de Lahunta 2013).

3.3 Děloha

Děloha je orgán, který slouží k transportu spermií dále do vejcovodu a pro nidaci a výživu vyvíjejícího se zárodku. Skládá se z krčku, těla a dvou děložních rohů a má tvar písmene Y. Velikost dělohy se mění s věkem, s množstvím a velikostí vrhů a také s fází estrálního cyklu. U feny o průměrné velikosti, která ještě nebyla gravidní, měří děloha na délku 10 až 14cm a v průměru má do 1cm.

Děložní rohy mají přibližně stejnou velikost a kraniálně je každý z nich připevněn k vaječníku prostřednictvím vaječnickového vazy (Evans et de Lahunta, 2013). U feny jsou

dlouhé, rovnoměrně široké. Probíhají v mírném ventrálně konvexním oblouku. U středně velké feny jsou objemné asi jako tužka (Najbrt et al., 1982).

Tělo dělohy je často umístěno částečně v břišní a částečně v pánevní dutině – obecně u fen, které ještě nebyly březí, se větší část nachází v břišní dutině a s přibývajícím vrhy děloha „klesá“ do pánevní dutiny (Evans et de Lahunta, 2013).

Krček je část dělohy, která je s výjimkou říje a porodu uzavřena (Reece, 2010). Je skloněn ventrokaudálním směrem tak, že vnitřní branka směřuje kraniodorzálně a zevní branka, prominující do pochvy 0,5-1 cm, směřuje kaudověventrálně. Směr děložního krčku spolu s vazivovou řasou v pochvě před vnější brankou znesnadňuje transcervikální zavedení katétru nebo pipety do dělohy (Svoboda et al., 2001). Děložní krček také představuje bariéru vůči různým infekcím díky obsahu eozinofilních granulocytů a mastocytů, jejichž množství závisí na fázi estrálního cyklu (Goericke – Pesch et al., 2010).

Stěna dělohy je tvořena třemi vrstvami. Nejsvrchnější vrstva se nazývá perimetrium, jedná se o tenkou vrstvu pobřišnice, která přechází z mesometria – děložního okruží. Mesometrium slouží jako závěs u fen, které ještě nebyly gravidní, u březích samic se děloha značně zvětšuje a hlavní oporu pak tvoří břišní stěna. Střední svalová vrstva se nazývá myometrium a skládá se z hladkosvalových buněk. Jeho hlavní funkcí je napomáhat přivypuzování plodu při porodu. Vnitřek dělohy je vystlán endometriem, což je bohatě prokrvená žláznatá sliznice, která zajišťuje výživu embrya a později se podílí na tvorbě placenty (Reece, 2010).

3.4 Pochva

Pochva o délce 6-20 cm (v závislosti na plemeni) vytváří na kranialním konci úzkou štěrbinu ventrálně pod zevní brankou děložního krčku, rozšiřuje se směrem kaudálním a končí před ústím močové trubice. Hymenální prstenec na rozhraní pochvy a poševní předsíně vytváří zúžení vlivem cirkulární slizniční řasy a vyvýšené ventrální stěny způsobené tlakem pánevního dna (Svoboda et al., 2001). Vagina feny je relativně dlouhá a poševní sliznice je zřasena podélně i cirkulárně. Nejdůležitější částí vaginy vzhledem k transcervikální inseminaci je děložní čípek (Najbrt et al., 1982).

Vaginální stěna je tvořena třemi vrstvami – vnitřní slizniční vrstvou, střední hladkosvalovou a vnější vrstvou z pojivové tkáně. Sliznice pochvy je bezžláznatá, tvořená vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Struktura epitelu se mění v závislosti na fázích estrálního cyklu (Roszel, 1975). Podslizniční tkáň obsahuje bohatě rozvětvené krevní řečiště. Svalová

vrstva je tvořena tenkou vrstvou podélné svaloviny, dále silnější okružní vrstvou a na vrchu opět podélnou svalovinou a společně vytváří svěrač (Evans et de Lahunta, 2013).

3.4.1 Poševní předsíň

Poševní předsíň je místo spojující vaginu se zevními pohlavními orgány a na rozhraní mezi pochvou a poševní předsíní ústí krátká močová trubice. Její velikost je variabilní a závisí na tom, zda je žena březí (Evans et de Lahunta, 2013). Obecně se svou délkou rovná asi třetině délky pochvy. Kutánní sliznice poševní předsíně je růžově červená, kryta vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Na rozdíl od poševní sliznice obsahuje mucinózní žlázy, zvlhčující sliznici předsíně i pochvy. Na dně předsíně jsou nahloučeny malé předsíňové žlázy, jejichž vývody ústí do mělké nepravidelně ohraničené jamky blízko poštváčku. Pod sliznicí je hladká svalovina, která se rozpadá ve vnitřní, kruhovou a vnější podélnou vrstvu. Nejzevnější vrstvu tvoří řídké vazivo. Na stavbě stěny poševní předsíně se též podílí žíhaná svalovina. Obkružuje neúplně předsíň v podobě svěrače. Ve stěně jsou četné žilné pleteně, které se koncentrují v útvar označovaný jako bulbus vestibuli. Jde o druh topořivého tělesa a u ženy dosahuje velikosti lískového ořechu (Najbrt et al., 1982).

3.4.2 Zevní pohlavní orgány

Mezi zevní pohlavní orgány patří vulva a klitoris. Vulva tvoří vstup do pohlavní soustavy a je tvořena dvěma stydkými pysky, které jsou od sebe odděleny stydkou štěrbinou. Pysky tvoří vnější hranici vulvy a jsou analogií samčího šourku. Jsou měkké, ohebné a tvořené příčně pruhovanou svalovinou (Evans et de Lahunta, 2013). Stydké pysky jsou zevně kryty kůží s četnými potními a mazovými žlázami a chlupovými váčky s jemnými chloupky. Jedná se v podstatě o kožní řasu s bohatým podkožním vazivem obsahujícím značné množství tukové tkáně, hladkosvalová vlákna a v hloubce uložený žíhaný sval (Najbrt et al. 1982). Klitoris je samičí analogií penisu. Je tvořen topořivou tkání, která obsahuje senzitivní nervová zakončení (Reece, 2010). U ženy je nápadně velký a má vytvořen žalud skrytý ve fossa clitoridis. Předkožková jamka je zčásti překryta slizniční klapkou, takže tento útvar by mohl být mylně považován za kranialněji uložené ústí močové trubice (Najbrt et al., 1982).

4 Fyziologie pohlavní soustavy feny

Reprodukční funkce u samic zajišťují produkci vajíček a poskytují prostředí pro růst a vývoj plodu, který se vyvíjí po oplození zralého vajíčka spermií. Samice tak plní svojí základní roli – porodit ve správném čase živé mládě a laktací zajišťovat jeho výživu (Reece, 2010). Vaječníky obsahují vajíčka – tzv. oocyty, u kterých pravidelně dochází k ovulaci, po které putují do vejcovodu, kde může dojít k oplození, a jsou transportovány do dělohy. Pokud dojde k oplození, z fertilizovaného oocyty se stává blastocysta, která přechází doděložních rohů a dochází zde k jejímu dalšímu dělení (Evans et de Lahunta, 2013).

4.1 Hormonální řízení

Reprodukční funkce všech domácích zvířat jsou primárně řízeny interakcí hypothalamu, hypofýzy a podmínek vnějšího prostředí. Základní mechanismy pozitivní a negativní zpětné vazby ovlivňují sekreci hormonů a faktory prostředí, jako je světlo, sociální vztahy, délka laktace a množství a kvalita potravy, mohou mít modifikující efekt (England, 2010). Dalšími složkami reprodukčního funkčního okruhu jsou adenohipofýza, gonády a vývodné pohlavní cesty (Kudláč et Elečko, 1987).

Syntéza a uvolňování gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH) je kontrolována komplikovaným systémem který zahrnuje pestrou škálu neurotransmiterů, opiátů, melatoninu (který je asociovaný s délkou dne) a mechanismů zpětné vazby. GnRH je syntetizován v neuronech hypothalamu a uvolňován z nervových zakončení. Je transportován hypofyzárním portálním systémem do přední části hypofýzy. Zde GnRH stimuluje syntézu gonadotropinů, folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). Tyto hormony ovlivňují funkci vaječnicků, které během růstu folikulů, ovulace a luteální fáze produkují v různých poměrech estrogen a progesteron (viz Obrázek č.1) (England, 2010). Folikuly stimulační hormon slouží ke stimulaci růstu a zrání folikulů a společně s LH zahajuje a podněcuje tvorbu estrogenů. Luteinizační hormon navazuje na účinek FSH a přivodí samici dozrání a ovulaci folikulů, dále také stimuluje tvorbu žlutého tělíska (Kudláč et Elečko, 1987).

Velmi důležitým hormonem je prolaktin (PRL). Jedná se o hormon hypofýzy, který má významný vliv na reprodukční funkci psů i nedomestikovaných psových jako je vlk, kojot či liška. Je nezbytný pro přípravu mléčné žlázy na laktaci a její udržení, vyvolává smysl pro mateřskou i otcovskou péči (Jöchle, 1997) a podporuje činnost žlutého tělíska (England, 2010). Samci a samice psů a vlků totiž vykazují téměř shodné sezónní změny v koncentraci PRL. PRL také způsobuje pseudograviditu, která je významná u nedomestikovaných

psovitých. Usnadňuje to situaci mladých alfa samic, které se musí co nejdříve po porodu vrátit ke svým povinnostem jako je organizace lovu apod. Pseudogavidní samice jim pomáhají s péčí o mladé a mohou jim také poskytovat mateřské mléko (Jöchle, 1997). Prolaktin je syntetizován hypofýzou a podporuje činnost žlutého tělíska. Jeho hladina je u březích fen 4x vyšší.

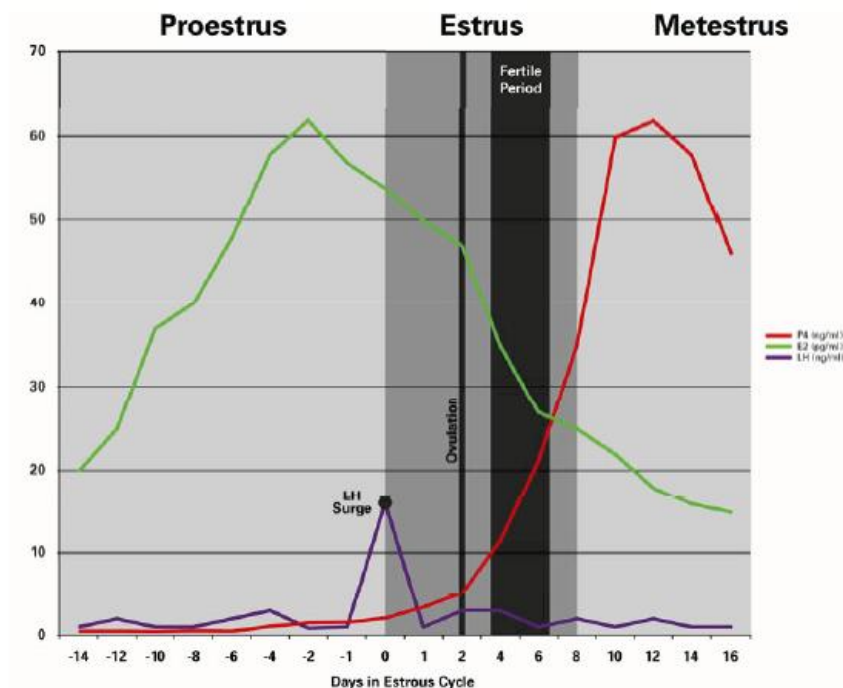
Mezi nejdůležitější ovariální hormony patří estrogen a progesteron (Kudláč et Elečko, 1987). Jedná se o steroidní hormony, které ovlivňují jak reprodukční trakt, tak behaviorální centra (England, 2010). Na rozdíl od jiných domácích zvířat jsou koncentrace progesteronu a estrogenů u březích fen i těch, které nezabřezly, stejné (Hoffmann et al., 1999).

Estrogen stimuluje tvorbu sekundárních pohlavních znaků, vyvolává psychické projevy říje a podmiňuje morfologické funkční změny na vejcovodech, děloze a pochvě během cyklu. Progesteron je nezbytný pro vznik a zachování březosti a také pro ovulaci folikulů (Kudláč et Elečko, 1987). U fen je hlavním zdrojem progesteronu žluté tělísko, které udržuje jeho koncentraci stále stejnou až do svého zániku. Tento proces se nazývá luteolýza, nastává bezprostředně před porodem a je doprovázen prudkým poklesem progesteronu a estrogenů (Hoffmann et al., 1999).

Prostaglandiny jsou skupinou biologicky aktivních lipidů, zasahujících do průběhu mnoha reprodukčních procesů. Mají hormonům podobné účinky, a proto se někdy označují jako tkáňové hormony. Nejdůležitější z nich je prostaglandin F_{2α} vytvářený v endometriu. Jeho hlavní funkcí je schopnost navodit rychlou regresi žlutého tělíska a zastavit tím tak produkci progesteronu a to v případě, že nedojde k oplození vajíčka.

Hlavním tzv. sekundárním hormonem reprodukce je somatotropin (STH). Somatotropní hormon ovlivňuje mimo jiné růst dělohy a nepřímo stimuluje tvorbu estrogenů (Kudláč et Elečko, 1987).

Velmi specifický pro březí feny je relaxin. V plazmě se nachází kolem 25. dne po ovulaci a jeho vrchol nastává kolem 50. dne. Relaxin je syntetizován placentou a určování jeho přítomnosti je jednou z diagnostických metod pro potvrzení březosti (England, 2010).



Obrázek 1 – Mění se koncentrace estrogenu, progesteronu a luteinizačního hormonu během estrálního cyklu (Christensen, 2004)

4.2 Folikulogeneze a oogeneze

Proces růstu folikulů se nazývá folikulogeneze, proces růstu oocytů oogeneze. Folikuly jsou uloženy v kůře vaječníků. Můžeme je rozdělit do 5 kategorií podle morfologie, velikosti, typu a počtu folikulárních buněk a přítomnosti folikulární tekutiny (Songsasen et Wildt, 2007). Jedná se o folikuly primordiální, primární, sekundární, terciární a Graafovy (Braw – Tal et Yossefi, 1997). Z vrozeného souboru primordiálních folikulů se postupně vyvíjejí folikuly do vyšších stupňů zralosti a jejich celkový počet se snižuje (Doležal et Kudláč et al., 1997). Štěně má na svých vaječnících při narození přítomno přibližně 50 000 folikulů, jejichž počet se během postnatálního vývoje zredukuje, přičemž při dosažení pohlavní dospělosti jich je o polovinu méně a v 10 letech života už je to pouhých 500 folikulů. Folikuly vykazují funkci endokrinní a generativní, to znamená, že uchovávají vajíčko, tzv. oocyt, v určitém stádiu vývoje (Doležal et Kudláč et al, 1997).

Folikul v různém stupni vývoje obsahuje různý počet granulózniích buněk, které obklopují oocyt (Evans et de Lahunta, 2013). Granulózní buňky vznikají z povrchového epitelu a oocyty z oogonií zárodečného epitelu (Reece, 2010).

Po narození jedince je na vaječnících přítomno přibližně 50 000 primordiálních folikulů, které představují jednu vrstvu plochých či kubických buněk. Tyto buňky obklopují nezralé vajíčko, tzv. oocyt I. řádu. Tento oocyt podstoupil meiózu, konkrétně první zrací dělení, ale v profázi se tento proces zastavil. V tomto klidovém stádiu přetrvávají oocyty ve

folikulu, dokud nenastoupí vlna LH, která obnoví meiózu a dojde k ovulaci (Evans et de Lahunta, 2013). Ve fázi primordiálního folikulu ještě není vytvořena zona pellucida (Doležel et Kudláč et al., 1997).

Z primordiálního se folikul mění na primární, který ještě nemá vytvořenou dutinu zvanou antrum (Reece, 2010), ale je již zřetelná zona pellucida (ZP) (Blackmore et al., 2004). Skrz póry ZP jsou vedeny výběžky granulóznic buněk a tím dochází k interakci mezi povrchem oocytu a granulóznicí buňkami (Reece, 2010). ZP je extracelulární glykoproteinová matrix, který obklopuje oocyt a embryo v časně fázi vývoje. Hraje důležitou roli během folikulogeneze, ovulace, oplození a transportu embrya. Oligosacharidové řetězce tvořící glykoproteiny hrají klíčovou roli pro schopnost spermie rozpoznat ZP a navázat se na ni (Blackmore et al., 2004).

V okamžiku, kdy se kolem oocytu nachází minimálně 40 granulóznic buněk, začíná oocyt růst, což se vyznačuje zvětšením jeho průměru (Ireland et al., 2000).

Antrum (dutina) se začíná tvořit ve chvíli, kdy je ve folikulu přítomno minimálně 250 granulóznic buněk (Smitz et Cortvrindt, 2002).. Tato dutina je nakonec vyplněna folikulární tekutinou a takový folikul se nazývá Graafův (Evans et de Lahunta, 2013), také nazývaný antrální (Smitz et Cortvrindt, 2002). Takový folikul má již jasně zřetelný vnější a vnitřní obal (Reece, 2010). Na jedné straně dutiny se nachází útvar zvaný cumulus oophorus, což je hrbolek obsahující zrající vajíčko. Radiálně uspořádané granulózní buňky kolem se pak nazývají corona radiata a slouží k výživě oocytu. Jak přibývá folikulární tekutiny, tak se zralé folikuly stěhují na okraj vaječníku. Když dojde k ovulaci, folikul praskne, oocyt je uvolněn do ovariální burzy a vtáhnut do nálevky vejcovodu díky fimbriím (Evans et de Lahunta, 2013).

Vajíčko feny je unikátní vzhledem k ostatním savcům (Songsasen et Wildt, 2007). U ostatních domestikovaných zvířat dochází k ovulaci, kdy se ze sekundárních oocytů stávají haploidní buňky, které jsou připraveny na splynutí se samčí haploidní pohlavní buňkou, spermií. Po splynutí zformují diploidní zygotu a probíhá normální embryonální vývoj. Fena je unikátní v tom, že u ní dochází k ovulaci již primárního oocytu (Renton et al., 1991). V tento moment ale nejsou ještě oocyty zralé a nemohou být tedy ihned oplodněny (England et von Heimendahl, 2010). Musí nejprve dokončit meiózu, aby se staly sekundárními oocyty a mohlo dojít k oplodnění (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 10) (Renton et al., 1991).

Dokončení jaderného a cytoplasmatického dělení probíhá uvnitř vejcovodu, konkrétně v jeho distální části (England et von Heimendahl, 2010), pod vlivem vzrůstající hladiny progesteronu (Songsasen et Wildt, 2007). Toto zrání trvá přibližně 48-60 hodin (England et von Heimendahl, 2010), přičemž Songsasen a Wildt (2007) uvádí až 72 hodin. Vedle

sekundárního oocyty vzniká ještě tzv. pólové tělísko, které ale nemá dostatek plazmatického materiálu a postupně degeneruje. Sekundární oocyt se dále dělí a vzniká oocyt s haploidním počtem chromozomů, který už je schopen splynout s haploidní spermií (Reece, 2010). Toto zpoždění v oplodnitelnosti je pro feny specifické a spolu s prodlouženou životností oocyty má významný vliv na počátek a trvání fertilizační periody.

Nedojde-li k oplození vajíčka a nevytvářejí-li se v uteru změny vyvolávané vyvíjející se blastocystou (embryem), činnost žlutého tělíska je přerušena prostaglandinem $F2\alpha$ a dochází k jeho regresi (Svoboda et al., 2001). Pokud dojde k oplození, tělísko zůstává plně vyvinuto po celou dobu, co je fena březí, a syntetizuje progesteron. Po porodu zaniká a tím je umožněno, aby docházelo opět ke zrání dalších folikulů (Evans et de Lahunta, 2013).

4.3 Oplození

Oplození představuje splynutí samčí a samičí pohlavní buňky a dochází k němu ve střední části vejcovodu (Svoboda et al., 2001). Psí spermie může přežít až několik dnů v samičí reprodukční soustavě, průměrně kolem 2-3 dnů. Zralé vajíčko je schopno přežít asi 3 až 4 dny (Evans et de Lahunta, 2013). England (2010) dokonce uvádí, že k degeneraci oocytů dochází až po přibližně 10 dnech. Přesný termín oplození lze stěží stanovit, poněvadž svolnost feny k páření trvá několik dní. Nejčastěji se určuje od termínu prvního krytí, další možnosti stanovení počátku gravidity je cytologický průkaz prvního dne diestru (Svoboda a kol., 2001). Doba gravidity se pohybuje kolem 63 dnů od ovulace (Beccaglia et Luvoni, 2012), přičemž Concannon et al. (1983) uvádí mnohem širší rozpětí a to mezi 57 až 72 dny.

Nejoptimálnější doba pro oplození nastává kolem 2. roku života a trvá přibližně do 6-7 let. V průběhu tohoto období mohou feny zabřeznout při každé říji, přestože to není běžné a ani se to nedoporučuje. U starších samic velikost vrhu a plodnost klesají (England, 2010).

4.4 Estrální cyklus

Termín estrální cyklus označuje rytmické změny pozorované v chování a na reprodukčních orgánech samic všech savců, které zahrnují pravidelné, ale omezené periody svolnosti k páření (Reece, 2010). U většiny domácích zvířat je interval mezi dvěma ovulacemi přibližně 21 dní. Cyklus feny se ale od cyklu domácích zvířat liší (England, 2010). Svobnost k páření se u fen objevuje obvykle dvakrát ročně – na jaře a na podzim, ale tato pravidelnost není u všech plemen a může kolísat s každým rokem. Baseti a kokršpanělé mají interval mezi jednotlivými říjemi přibližně 5 měsíců, zatímco němečtí ovčáci mají tento

interval nejkratší a to 5 měsíců \pm 28,5 dne. Průměrný výskyt svolnosti k páření u německých ovčáků je tedy 2,4krát za rok, zatímco u ostatních plemen je to přibližně 1,5krát. Díky velké rozmanitosti různých plemen psů dnes existují feny polyestrické, diestrické a monoestrické (Christiansen, 1984). Domestikované feny nejsou sezónní, to znamená, že jejich říje není závislá na ročním období. Výjimkou je například basenji, který spolu s vlky a divokými psy vykazuje určitou sezónnost (Root – Kustritz, 2006).

Estrální cyklus má několik fází. Proestrus, který trvá přibližně 10 dní, estrus, trvající dalších 10 dní, následovaný dlouhou luteální fází, která nastává jak v případě březosti, tak i v případě nezabřeznutí a má délku kolem 2 měsíců. Nejdelší periodou je anestrus, který není závislý na ročním období a je velmi variabilní. Průměrná délka anestru je 4,5 měsíce (England, 2010).

Počátek prvního (tzv. pubertálního) estru je velmi variabilní, a přestože se v průměru objevuje kolem 9. měsíce věku, může to být i v 6. měsíci u malých plemen či 14. měsíci u obřích plemen. U některých fen se puberta neobjevuje dříve než v 24-30. měsíci. Puberta nastupuje ve chvíli, kdy tělo feny dosáhne 80% hmotnosti dospělého jedince (England, 2010).

4.4.1 Proestrus

Proestrus je období, kdy dochází ke zvýšení hladiny estrogenů a otoku vulvy (Evans et de Lahunta, 2013). Délka proestru je variabilní, v průměru kolem 9 dní. Dochází k vaginální epitelální proliferaci a ve vaginálním stěru se nachází velké množství buněk, zpočátku hlavně parabazální buňky a neutrofilů a ke konci proestru se zde nachází 98-100% zrohovatělých buněk (Concannon, 2011). Epitel sliznice pochvy se mění z kubického na vrstevnatý dlaždicový (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 4). Tato změna pravděpodobně pomáhá k tomu, aby nedošlo k poškození pochvy během páření. Ke konci periody dochází k sekreci feromonů, které mají zaujmout samce (Evans et de Lahunta, 2013). Feny se stávají pro samce atraktivnější, často se toulají a značkují (England, 2010). Avšak během proestru nesvolují ke kopulaci a na pokusy samců reagují vrčením, sednutím si, nebo lehnutím (Evans et de Lahunta, 2013). Concannon (2011) tvrdí, že se tato agresivita v průběhu proestru značně snižuje. Mezi klinické příznaky proestru patří rozšíření a zčervenání stydkých pysků a objevuje se serózní výtok. Vyšetření feny endoskopem v tomto období odhaluje rozšířené a nateklé vaginální epitelální záhyby a zvýšený otok dělohy, který se diagnostikuje pomocí ultrasonografie (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 3).

Proestrus je spojený s růstem folikulů, který je stimulován FSH, LH a sekrecí estrogenu granulózními buňkami folikulů. Na každém vaječníku vyrostou 2 až 8 folikulů.

Typak vyčnívají nad povrch vaječníku asi 10 dní před ovulací a mají v průměru kolem 4 mm. Před LH vlnou je průměr folikulu 6 až 9 mm. Zvýšené hladiny LH a FSH jsou stěžejní pro stimulaci růstu folikulů. Avšak jak folikuly zrají, začínají produkovat hormon inhibin, který inhibuje sekreci FSH, takže v pozdním proestru se jeho hladina již nezvyšuje a spíše klesá. Nicméně FSH hraje významnou roli v růstu a částečně i zrání folikulů a v přeměně buněk na žluté tělísko po ovulaci (England, 2010).

4.4.2 Estrus

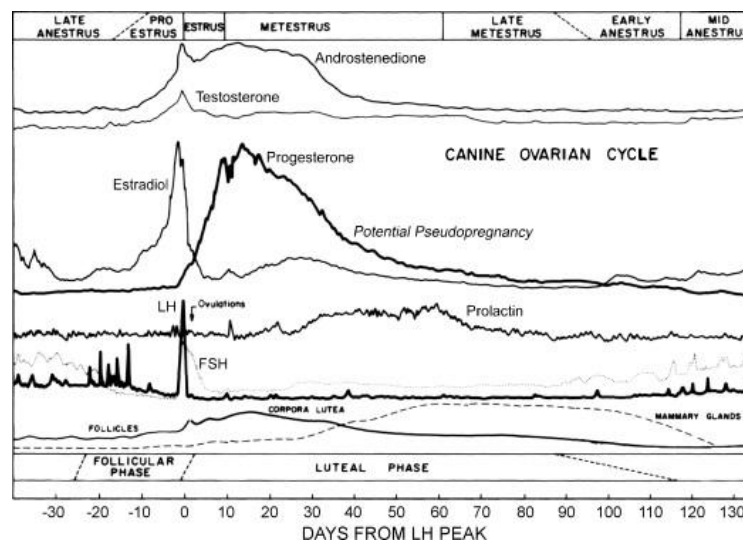
Estrus je obdobím zvýšené sexuální aktivity trvající v průměru 9 dní. Chování v této periodě je charakteristické tím, že fena je svolná ke kopulaci, nastavuje se samci, má prohnutý hřbet a odchýlený ocas (Evans et de Lahunta, 2013).

V tomto období jsou díky estrogeneru vylučovány feromony a to jak reprodukčním traktem, tak také močí. Samec detekuje feromony díky čichovému či vomeronasálnímu orgánu a zvýší se tak jeho pohlavní aktivita. Feromony mají také za následek stimulaci GnRH center, což může způsobit také synchronizaci říje u ostatních fen (England, 2010).

Dochází také k hormonálním změnám. Zpočátku je hladina estrogeneru vysoká, což potlačuje sekreci LH a FSH, ale s blížící se ovulací jeho koncentrace klesá (England, 2010). Začátek estru souvisí s nástupem vlny luteinizačního hormonu (Concannon, 1991). Pokles estrogeneru a vzrůst hladiny progesteronu umožňují plnou expresi estrálního chování. Zároveň tato změna koncentrací stimuluje LH vlnu, která trvá 1-3 dny.

U feny dochází ke spontánní ovulaci, takže není potřeba stimulace ve formě páření. Ovulace je stimulována již zmiňovanou vlnou uvolněného LH. Luteinizace stěny folikulů se objevuje před ovulací, kdy zároveň roste hladina plazmatického progesteronu. Koncentrace progesteronu začíná růst několik hodin nebo během počátku LH vlny. Preovulační LH vlna je stěžejní událostí cyklu a protože estrální chování pokračuje i po ovulaci, stádium březosti se nejlépe určí ve vztahu právě k vrcholu LH vlny, než k prvnímu dni estru či dni připuštění, což je normální postup u ostatních zvířat. Dále LH vlna ovlivňuje změnu syntézy steroidních hormonů, kdy granulózní buňky produkují více progesteronu, což pomáhá k přeměně folikulu ve žluté tělísko. V tomto procesu se z granulózních buněk stávají velké luteální buňky prostřednictvím hypertrofie (England, 2010). Při každém estru zraje několik folikulů, ale ne všechny zrají až do stádia ovulace – drtivá většina degeneruje v různých stádiích vývoje (Zuckerman, 1971). Histologická a laparoskopická vyšetření ukazují, že přestože většina folikulů ovuluje během 48 až 60 hodin po LH vlně, některé folikuly nemusí ovulovat dříve než 96 hodin po LH vlně. Proto je počátek ovulace velmi individuální, průměrně 12. den po

začátku proestru, ale u některých fen to může 5 dní a u některých až 25 dní (England, 2010). Období, kdy jsou oocyty oplodnitelné, se nazývá fertilizační perioda. U feny tato fáze začíná 2 dny po ovulaci a trvá přibližně do 5. dne po ovulaci, kdy postupně dochází k uzavírání děložního čípku, což zabraňuje spermiím, aby vnikly do samičího reprodukčního traktu. Zatímco je fertilizační perioda velmi důležitá, není to jediné období, během kterého může dojít k oplodnění. Dalším důležitým obdobím v reprodukci feny je fertilní perioda. Fertilní perioda je definována jako období, během něhož může páření vyústit v početí. Fertilní perioda proto zahrnuje fertilizační periodu, ale její počátek předchází počátek fertilizační periody o několik dní (England, 2010).



Obrázek 2 – Koncentrace příslušných hormonů během estrálního cyklu, Concannon 1977

4.4.3 Metestrus a diestrus (luteální fáze)

Termín diestrus se používá v některých veterinárních textech jako náhrada a synonymum metestru u fen. Začíná po vymizení chování, které je pro říjí typické (Concannon, 2010). Dochází k náhlému vymizení sexuálního chování a zvyšování hladiny plazmatického progesteronu (England, 2010). Progesteron je syntetizován žlutým tělískem, které se stává funkčním (Evans et de Lahunta, 2013). Dochází k opadnutí otoku vulvy, naopak začínají otékat mléčné žlázy (Evans et de Lahunta, 2013). Progesteron mění charakteristiku slizniční sekrece a snižuje dráždivost hladkého svalstva. Způsobuje to zpomalení průchodu oocyty vejcovodem, což také oddaluje vstup embrya do dělohy. Progesteron také uzavírá děložní čípek a připravuje dělohu na uhníždění embrya. Vzestup hladiny progesteronu začíná několik hodin před nebo během preovulační LH vlny a pokračuje do dosažení hodnoty 10-25 ng/ml, což je obvykle kolem dne 10. (England, 2010).

Holst a Phemister (1974) popsali počátek diestrus s ohledem na změny ve vaginálním epitelu a datovali díky tomu určité procesy – diestrus minus 3 dny = fertilizace, diestrus minus

4 dny = vznik sekundárního oocytu, diestrus minus 5 dní = začátek meiózy, diestrus minus 6 dní = ovulace.

4.4.4 **Anestrus**

Anestrus je obdobím klidu reprodukčního systému, poklesu hladin hormonů a absence sexuálního chování. Evans a de Lahunta (2013) uvádějí, že trvá od 2 do 10 měsíců s průměrem kolem 4 měsíců. Concannon (2010) je v těchto údajích přesnější, uvádí, že anestrus musí trvat minimálně 7 týdnů, průměr je ovšem 18 až 20 týdnů. Jedná se o periodu mezi koncem luteální fáze a počátkem následujícího proestru. Pokud v předchozím cyklu došlo k oplodnění, pak počátek anestru zahrnuje i laktaci. Během anestru je reprodukční soustava klidná a vnitřní a zevní genitálie, včetně mléčných žláz, jsou na své nejmenší možné velikosti (viz Obrazová příloha, obrázek č. 9). Vaginální stěna je relativně tenká. Přibližně 60 dní před další ovulací jsou již folikuly na vaječnicích rozeznatelné. V pozdním anestru lze pozorovat relativně vysoké hladiny estrogenu (England, 2010).

5 Stanovení optimální doby pro inseminaci

Pro úspěšný průběh inseminace je důležitá řada faktorů – použití dostatečně velké inseminační dávky s dostatečným množstvím živých spermií, dobrá příprava dávky a správná manipulace, adekvátní depozice dávky do samičích reprodukčních orgánů a, to nejdůležitější, správné načasování pro inseminaci (Payan-Carreira et al., 2011). Doba, kdy může dojít k oplození, se nejlépe určuje pomocí kombinace vaginální cytologie, endokrinologie, pozorování změn na poševní sliznici a změn chování (Jeffcoate et Lindsay, 1989).

Mnoho problémů s „neplodností“ má původ v nesprávném managementu reprodukčního cyklu. Předtím, než chovatel zavrhne fenu či psa jako neplodné, je důležité shromáždit přesná data o předchozích cyklech, pářeních, nemocech, medikaci a aktivitách. Tyto informace pomohou k vytvoření plánu pro příští páření. Způsob reprodukce – zda dojde k přirozenému páření, inseminaci čerstvým semenem, chlazeným, či mraženým – závisí na mnoha faktorech. Semeno o nižší kvalitě nebo životnosti vyžaduje intenzivní sledování ovulace u feny a přímé vložení do dělohy, ne jen tradiční aplikaci do pochvy (Makloski, 2012).

5.1 Zevní projevy říje

Pohlavní cyklus u fen představuje 4 fáze. Zevně se projevují fáze proestrus a estrus a představují tzv. hárání (Svoboda et al., 2001). Ale pouze několik dní v tomto období je fena svolná ke kopulaci. Projevuje se to tak, že má v tomto období prohnutá záda a odkloněný ocas (Evans et de Lahunta, 2013). Mezi další projevy patří řídký žlutooranžový výtok v menším množství. Fena je nejen atraktivní pro psy, ale sama psy vyhledává a podbízí se jim (Svoboda et al., 2001), jak již bylo řečeno v kapitole o estru.

5.2 Vaginální cytologie

Stanovení koncentrace progesteronu a vaginální cytologie patří mezi nejčastěji používané techniky, ke kterým se v současné době přidává ještě vaginální endoskopie a ultrasonografie, která sleduje vývoj folikulů a ovulaci (Payan-Carreira et al., 2011). Vaginální cytologie je jednou z nejdůležitějších metod při detekci jednotlivých fází cyklu. Nazákladě histologických změn jsou patrné v poševním hlenu různé typy buněk, díky nimž můžeme fázi určit (Turmalaj et al., 2011). Buňky mění svou formu v závislosti na hladině estrogenu. Na počátku se jedná o kulaté buňky s jasně zřetelnou cytoplasmou, kdy je hladina estrogenu téměř nulová. Poté, již pod vlivem rostoucí hladiny estrogenu, se buňky zvětšují, kornatí a mění svůj tvar na hranatý s malým pyknotickým jádrem (viz. Obrazová příloha,

obrázek č. 6). Na počátku estru vaginální cytologie vykazuje maximální hodnotu indexu kornatění (>70%). Stěr pro přípravu vaginální cytologie je realizován pomocí sterilní vatové tyčinky, kterou se odebere hlen z pochvy. Dále dojde k fixaci, sušení, následnému barvení a mikroskopickému vyšetření. Analýza epitelových buněk vaginálního sekretu se používá k prokázání optimálního okamžiku pro páření či umělé oplodnění (Turmalaj et al., 2011). Pro proestrus je typická přítomnost erytrocytů a zrohovatělých buněk. V estru je výskyt obdobný, erytrocytů ovšem značně ubývá a v metestru a anestru se v poševním hlenu objevují leukocyty, zejména neutrofily (Concannon, 2010). Náhlý vzestup počtu kulatých buněk a neutrofilů značí nástup diestru (Payan-Carreira et al., 2011).

5.3 Vaginoskopie

Přesné určení vhodného okamžiku pro inseminace je důležité zejména při inseminaci mraženým spermatem. V tomto případě se používá vaginoskopie, což je endoskopická metoda sloužící k detekci slizničních záhybů sliznice v oblasti pochvy a děložního čípku (Jeffcoate et Lindsay, 1989). Přesnější je z toho důvodu, že na rozdíl od vaginální cytologie, která sleduje pouze účinky estrogenů, vaginoskopie umožňuje sledovat působení jak estrogenů, tak iprogesteronu.

Během anestru je hladina estrogenů nízká, což způsobuje, že poševní sliznice je tenká a má hladký růžový povrch. Estrogen, mající vazokonstrikční efekt, zde způsobuje edém (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 8) (Rehm et al., 2007).

S rostoucí hladinou estrogenu se otok zvětšuje, sliznice začíná být zvrásněná a objevují se zde tzv. primární ligamenty. V průběhu proestru se otok ještě o něco zvětšuje a vznikají sekundární ligamenty (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 3) (Jeffcoate et Lindsay, 1989). Na konci proestru vzrůstá hladina progesteronu, což sníží vazokonstrikční účinek estrogenu a výsledkem je pokles primárních a sekundárních ligamentů a dehydratace. Sliznice je tak bledá a vrásčitá (viz. Obrazová příloha, obrázek č. 5), což je typické pro období estru (Christensen, 2004).

5.4 Progesteronový test

Dalším ukazatelem vhodného okamžiku pro inseminaci je koncentrace sérového progesteronu. Jeho koncentrace je obvykle v období anestru menší než 1 ng/mL. V průběhu proestru nastává preovulační luteinizace v některých folikulech, což způsobí, že místo estrogenu začnou některé folikuly produkovat progesteron. Koncentrace sérového progesteronu tak vystoupá na 1 ng/mL a na této hladině několik dní setrvá (Concannon et al.,

1977). Poté začíná hladina progesteronu stoupat a nastává LH vlna, která spouští v průběhu 2 dnů ovulaci. Koncentrace progesteronu se pohybuje mezi 4 až 10 ng/mL (Payan-Carreira et al., 2011). LH vlna trvá obvykle 24 až 36 hodin (de Gier et al., 2006). Pro přesnou chronologii následujících událostí je vrchol LH brán jako den nula (viz graf) a poté trvá přibližně 2 dny, než dojde k ovulaci. Ovulace tedy nastává přibližně v den 2 (Concannon et al., 1977). V momentě, kdy dojde k ovulaci je koncentrace progesteronu obvykle >5 ng/mL. U všech ostatních domestikovaných zvířat nastává plodné období ihned po ovulaci. Toto ale neplatí v případě feny, u které je oocyt oplodnitelný až 1-2 dny po ovulaci (Badinand et al., 1993). V tuto dobu je koncentrace sérového progesteronu 6-10 ng/mL (Jeffcoate et Lindsay, 1989).

5.5 Stanovení optimální doby pro inseminaci

Období maximální plodnosti nastává mezi ovulací a přibližně 4. dnem po ovulaci. Pokud je fena oplodněna v některém z těchto dnů, nenastávají žádné významné rozdíly ve velikostech vrhu, pokud je ale oplodněna později nebo dříve, vrhy bývají menší. Vrchol plodnosti nastává těsně před počátkem fertilizační periody, kdy dochází ke kapacitaci spermií v samičí pohlavní soustavě, přičemž tento proces trvá přibližně 6 hodin. Nejčastějším důvodem neplodnosti fen je páření v nevhodnou dobu (England et von Heimendahl, 2010).

Vhodná doba se dá odhadnout například pomocí počítání dnů od počátku proestru, kdy se chovatel spoléhá na to, že fena bude ovulovat v určitý den. Ale přestože většina fen ovuluje 9 až 14 dnů po počátku proestru, existují i takové, které ovulují 5 či 30 dní po začátku proestru (Johnston et al., 2001).

Další odhad vhodné doby pro inseminaci probíhá na základě propuknutí chování typického pro říji (viz kapitola o Estrálním cyklu). Nicméně u feny není příliš těsný vztah mezi hormonálními změnami a chováním. Například u bíglů se „říjové“ chování objevuje již 2 dny před ovulací a celkově jsou tyto změny velmi plemenně specifické. Proto tento způsob nepatří mezi ty nejvhodnější (England et von Heimendahl, 2010).

Další, přesnější metodou je stanovení optimální doby inseminace prostřednictvím koncentrace hormonů, zejména estrogenu, LH a progesteronu. Těsně před ovulací dochází k rychlému poklesu hladiny estrogenu za současného vzrůstu hladiny progesteronu. Růst hladiny progesteronu je způsoben luteinizací stěny folikulů (viz podkapitola Progesteronový test). Koncentrace LH začíná stoupat přibližně 2 dny před ovulací (Tsutsui, 2009).

6 Přirozená plemenitba

Přestože se tato bakalářská práce zabývá umělou inseminací, bylo by vhodné se zmínit také o přirozené plemenitbě. Cílem každé plemenitby je dosáhnout co nejlepšího a nejpočetnějšího vrhu. Přirozená reprodukce představuje nejjednodušší a nejlevnější způsob jak dosáhnout březosti u většiny druhů zvířat. Rozeznáváme 3 způsoby, které můžeme použít.

K nejlevnějšímu způsobu plemenitby, který vyžaduje nejméně organizace, může dojít tehdy, když psa i fenu, které spolu chceme spářit, vlastní stejný chovatel. Jedinci jsou ustájeni odděleně a fena je jednou denně přiváděna k psovi, aby chovatel mohl pozorovat, zda už je fena svolná k páření.

Druhá strategie zahrnuje určení přibližného dne ovulace a naplánování páření na 4. až 6. den, nebo 3. až 5. den po ovulaci (Makloski, 2012).

Třetí způsob je založen na intenzivnějším monitoringu ovulace a páření. Úspěšnost při připouštění feny od 4. dne před ovulací do 3. dne po ovulaci je více než 95% (Holst et Premister, 1974). Tato strategie může být použita, pokud fena a pes nejsou ustájeni na stejném místě nebo pokud je samec svolný pouze k jednomu či dvěma pářením (Makloski, 2012). Tato metoda může být také propojena s umělou inseminací (Johnson et al., 2001). Je důležité přivést fenu do samcova teritoria, aby se snížily projevy chování alfa samice, což by mohla být velká překážka při páření. Pokud fena vykazuje projevy říje, ale odmítá páření nebo pokud je samec neschopen se pářit, pak by měl být vyhledán veterinární lékař, který oba jedince vyšetří (Makloski, 2012).

Existují ale případy, kdy musíme od přirozené plemenitby ustoupit. Hlavními důvody jsou agresivita, odmítání páření, různé tělesné abnormality jako je malá vagina, nízké libido, bolest nezkušenost či sociální problémy a problémy s chováním jako je například přílišná dominance feny (Payan-Carreira et al., 2011).

7 Umělá inseminace

Reprodukce ve veterinární medicíně malých zvířat je velmi se rozvíjející obor, kde je vysoká poptávka po znalostech a zkušenostech, které jsou nezbytné k produkci početných vrhů (Makloski, 2012).

Metody asistované reprodukce u psa se začaly rozvíjet již v 18. století, kdy byla poprvé zaznamenána umělá inseminace, jejímž výsledkem byla 3 zdravá štěňata (Johnson et al., 2001). Přestože základy této procedury byly položeny velmi brzy, vývoj, který by směřoval k vylepšení těchto metod, byl zdlouhavý. V polovině 20. století byl zapsán první

vrh, který vznikl za použití mraženého semene (Farstad, 2000). Od této doby vznikají k rozsáhlé studii o fyziologii a anatomii feny, vyvíjejí se techniky pro správné načasování inseminace, úspěšná provedení jak transvaginální tak transcervikální inseminace, chirurgické metody pro vložení semene do dělohy a vejcovodů a další techniky jako embryotransfer nebo in vitro oplození. Payan-Carreira et al. (2011) uvádí, že počátky asistované reprodukce u fen byly zpočátku komplikované a to díky specifické fyziologii jejich reprodukce a špatné mrazitelnosti psího ejakulátu. Na toto téma bylo provedeno mnoho výzkumů, zejména v severní Evropě (Makloski, 2011).

Pro úspěch umělé inseminace je nezbytné dodržet několik zásad: vhodné načasování, použití adekvátního počtu motilních spermií, dobrá příprava inseminační dávky a opatrné zacházení s ní (Payan-Carreira et al., 2011).

7.1 Odběr a hodnocení spermatu

Odběr semene u psa je relativně snadná procedura, která ale vyžaduje určité zkušenosti. Odběr a následné hodnocení spermatu jsou nezbytné součásti toho, abychom obdrželi dobré výsledky umělé inseminace. Přestože jsou lékaři často vyzýváni chovateli, aby provedli umělé oplodnění bez detailní analýzy semene, je nutné, aby byla provedena alespoň analýza pohyblivosti spermií, jejich morfologie a stanoven jejich konečný počet předtím, než k inseminaci či kryoprezervaci dojde. Hodnocení ejakulátu před inseminací odhaluje potencionální plodnost psa (Payan-Carreira et al., 2011).

Odběr ejakulátu psa by měl probíhat v prostředí, kde je rovný, nekluzký povrch. Pes by měl být co nejmíň vystresovaný (Blendinger, 2007). Semeno může být odebráno u většiny psů bez přítomnosti samice a to v tiché a izolované místnosti, přestože přítomnost feny může zlepšit kvalitu ejakulátu (Payan-Carreira et al., 2011). Pokud se nedaří odběr semene bez přítomnosti feny a žádná fena v estru není k dispozici, je možno použít zmražený tampon s močí feny v estru (Blendinger, 2007) nebo vzorek výtěru pochvy (Payan-Carreira et al., 2011), ale reakce psů může být různá. Dále se používá feromon methyl paraben. Pokud je k dispozici fena v estru je vhodné ji mít v přítomnosti psa, jelikož to usnadní kolektivizaci (Blendinger, 2007), zejména u nervózních či mladých samců (Kutzler, 2012).

Odběrové nádoby mohou být skleněné, gumové či plastové (Blendinger, 2007), přičemž zapotřebí jsou minimálně dvě 50 ml sterilní nádoby (Kutzler, 2012). Interval mezi jednotlivými odběry či mezi odběrem a pářením by měl být zaznamenán a měl by činit 2 až 5 dní, zatímco interval delší než 10 dní by mohl způsobit zvýšený výskyt morfologických abnormalit a pokles pohyblivosti spermií (Payan-Carreira et al., 2011).

Nejběžnější metodou odběru ejakulátu u psa je prostřednictvím manuální manipulace za přítomnosti feny. Jak je uvedeno výše, její přítomnost není nezbytná, ale je dokázáno, že pokud přítomna je, dochází ke zvýšení koncentrace ejakulátu. V minulosti byla k odběru využívána umělá vagína. Dnes je odběr proveden pomocí masáže penisu a za využití speciální odběrové nádoby (Payan-Carreira et al., 2011). Osoba, která provádí odběr, má na ruce nelatexovou rukavici (Blendinger, 2007). Kontakt psího semene s latexem má totiž škodlivý vliv na pohyblivost spermií (Althouse et al., 1991). Proces začíná masáží psí předkožky, dokud nedojde k částečné erekci. Poté je předkožka rychle stahována. Během tohoto pes hýbe pánví a veterinární lékař by měl v této chvíli držet lahvičku, určenou k odběru, v dostatečné vzdálenosti od psa, aby nedošlo k traumatu. Když jsou tyto pohyby dokončeny a pes zvedne zadní nohu, penis psa by měl být nasměrován do lahvičky, do které začne proudit ejakulát (Payan-Carreira et al., 2011). Semeno a prostatická tekutina jsou vyloučeny prostřednictvím peristaltických pohybů ve svalech v okolí močové trubice (Kutzler, 2012). Pro lepší stimulaci je dobré psa poškrábat na hrudi, stimulovat oblast hráze, jemně se dotýkat žaludu či mluvit na něj povzbudivě (Blendinger, 2007). Ve chvíli, kdy se konzistence ejakulátu změní na krystalicky průhlednou tekutinu (prostatickou tekutinu), může veterinární lékař lahvičku opatrně sejmut (Payan-Carreira et al., 2011). Penisová kost zabraňuje ucpání močové trubice během erekce a natáčení penisu (Kutzler, 2012).

Ejakulát psa se skládá z 3 frakcí. První a třetí se skládají z prostatické tekutiny a druhá je bohatá na spermie. První frakce je vylučována půl až 1 minutu, a to během první fáze erekce, kdy dochází k očividným kopulačním pohybům. Je bezbarvá a její objem činí 1 až 5 ml. Druhá frakce je vyloučena během 1-2 minut, kdy dojde k zastavení kopulačních pohybů. Má šedobílou barvu (Payan-Carreira et al., 2011), je zakalená a obsahuje velké množství spermií (Blendinger, 2007). Její objem činí 1-3ml (Payan-Carreira et al., 2011). Třetí frakce odchází z prostaty a její objem může být 30-40 ml, což je přibližně 95% celkového objemu ejakulátu. Její vylučování může trvat od 5 do 30 minut. Celkový objem ejakulátu závisí na plemeni a velikosti psa. Bylo zjištěno, že neoddělení frakcí od sebe může mít negativní vliv na kvalitu ejakulátu, zvláště v případě, že je semeno určeno k chlazení či zmrazení. Zejména by mělo dojít k oddělení třetí frakce, a pokud je následný objem ejakulátu velmi malý, můžeme jej zředit k usnadnění manipulace během inseminace (Payan-Carreira et al., 2011). V nádobě se oddělení frakcí projeví tak, že čirá tekutina se začne usazovat na kalné sekundární frakci. V tomto bodě by měl být odběr ukončen (Blendinger, 2007).

Hodnocení semene je důležitou součástí posouzení plodnosti psů a mělo by být běžnou součástí vyšetření předcházející přirozené páření, umělou inseminaci či kryoprezervaci.

Ejakulát by měl ohodnocen ihned po odběru a mělo by se s ním zacházet velmi opatrně. Náhlé změny vnějšího prostředí, například teploty, by mohly být škodlivé pro motilitu a strukturu spermií a mohly by tak ovlivnit výsledek vyšetření. Zároveň dlouhý interval mezi odběrem a ohodnocením může snížit motilitu spermií a zvýšit počet mrtvých spermií v ejakulátu. Je vhodné, aby všechno vybavení potřebné k ohodnocení a odběru mělo teplotu 37°C (Payan-Carreira et al., 2011). Dále je semeno náchylné vůči náhlým změnám teplot, nevhodné manipulaci, vodě, germicidním a čistícím prostředkům. Psí sperma není příliš náchylné vůči nízkým teplotám, ale je velmi citlivé vůči teplu. Aby nedošlo k jeho poškození, mělo by být udržováno mezi 37°C (tělesná teplota) a 20°C (pokojová teplota) (Kutzler, 2012). Hodnocení semene se skládá ze stanovení přítomnosti, obsahu, koncentrace, pohyblivosti a procentuálním zastoupení normálních živých spermií. Objem je variabilní, záleží na množství odebrané prostatické tekutiny a velikosti psa. Pohybuje se od méně než 2 do více než 20 ml s průměrem kolem 5 ml. Vyšetření probíhá tak, že se kapka semene umístí na čisté sklíčko a je mikroskopicky vyšetřena. U normální spermie to vyvolá rychlý chaotický pohyb a takových spermií by mělo být ve vzorku více než 70% (Blendinger, 2007), což je kolem 200 milionů (Kutzler, 2012). Naopak takových, které se točí do kruhu nebo ze strany na stranu, by mělo být co nejméně, jelikož jsou vadné (Blendinger, 2007). Je nezbytné, aby kontrola kvality ejakulátu byla provedena několikrát, nejlépe 2-3x v intervalech 1-2 týdnů, aby se potvrdila samcova (ne)plodnost. Vyšetření, které nebylo opakováno, není spolehlivé z několika důvodů: časté páření či více odběrů ejakulátu za sebou mohou způsobit dočasný pokles kvality semene; dlouhý sexuální půst může znamenat velké množství mrtvých, imobilních spermií v ejakulátu (Payan-Carreira et al., 2011).

Mezi nejčastější indikace pro hodnocení ejakulátu jsou vyšetření předcházející umělé inseminaci či kryoprezervaci, klinické příznaky určité nemoci pohlavních orgánů psa či podezření na neplodnost. U některých jedinců je schopnost oplození okamžitě vyloučena. Jedná se například o psy s aspermií, u kterých úplně chybí ejakulát. Dále o psy azoospermatické, kterým chybí spermie či nekrospermatické, kterým chybí motilní spermie. Pokud je kvalita ejakulátu u samce s neúspěšnou plemenitbou nízká, má všechny předpokladu k tomu, aby byl vyřazen z chovu (Payan-Carreira et al., 2011).

7.2 Neinvazivní metody inseminace

7.2.1 Transvaginální inseminace

Transvaginální inseminace je nejrozšířenější metodou inseminace s čerstvým semenem a je dostupná i v malých veterinárních klinikách (Payan-Carreira et al., 2011). Tato technika se používá, pokud kvalita semene a plodnost feny jsou dostačující, ale přirozené páření nemůže být uskutečněno kvůli fyzické neschopnosti nebo problémům v chování. Pokud se chovatel a veterinární lékař uchýlí k tomuto způsobu inseminace, je nezbytné odpovídající vybavení (Johnson et al., 2001). Pro tento způsob umělého oplodnění je zapotřebí plastový katétr, na který je připevněna jednorázová injekční stříkačka obsahující semeno. V poslední době je často využíván katétr v latexovém obalu, který má na svém vrcholu nafukovací balón a je výhodný v tom, že zabraňuje zpětnému toku spermatu (Payan-Carreira et al., 2011). Vzhledem k tomu, že různá plemena psů se velikostně liší, je důležité použít sterilní inseminační katétr odpovídající délky, aby mohlo být semeno úspěšně vloženo k ústí děložního čípku (Johnson et al., 2001). Inseminační katétr může pojmout 6-12 ml spermatu (Pinto et al., 1998). Před samotnou inseminací je nutné očistit oblast hráze a okolí vulvy. Majitel zvířete by měl zajistit, aby mělo zvíře prázdný žaludek, což usnadní jak palpaci pro zjištění pozice katétru, tak také celou proceduru inseminace. Fena je umístěna na vyšetřovací stůl ve stoje, pokud se jedná o obří plemeno, tak na zem. Aby bylo zabráněno tomu, že katétr vnikne do močové trubice, jejíž ústí je na rozhraní pochvy a poševní předsíně, musí být inseminátor opatrný a zavádět katétr ve správném směru. Katétr je opatrně zaveden do pochvy, směrem nahoru dokud neprojde pánevním okrajem, a dále horizontálně. Po ujištění, že je zaveden správně, je veden dál, dokud nedosáhne paracervikální oblasti. Toto místo může být palpačně nahmatáno jako 1-2 cm dlouhá tuhá struktura, která končí děložním krčkem, který je zakulacený, vejcovitého tvaru a mírně pohyblivý (Payan-Carreira et al., 2011). V okamžiku, kdy je pipeta vhodně zavedena, semeno může být vloženo do pochvy následováno 1 až 2ml vzduchu, které ho protlačí dovnitř (Pinto et al., 1998). Payan-Carreira et al. (2011) doporučují, aby byla fena během této procedury držena se zvednutou zádí a hlavou dolů v úhlu 45-60° z důvodu umožnění správné palpce cervixu a ujištění, že nedojde ke zpětnému toku spermatu ven z pochvy. Fena by měla v této pozici setrvat 5-20 minut po inseminaci. Oproti tomu Pinto et al. (1998) tvrdí, že takto dlouhá doba není potřeba a že to má velmi zanedbatelný vliv na velikost vrhu.

Pravděpodobnost zabřeznutí po transvaginální inseminaci je 60 až 95%. Toto velké rozpětí je způsobené různou kvalitou semene, načasováním ovulace a normálností

reprodukčního systému feny. Velikost vrhu je závislá na obdobných faktorech (Pinto et al., 1998).

7.2.2 Transcervikální inseminace (TCI)

TCI je uznávaná technika v reprodukci psů. K tomu, aby mohla být použita, je za potřebí množství znalostí a vysoké počáteční náklady, které mohou být odrazující. Navzdory tomu se TCI stala populární a uznávaná metoda nitroděložní inseminace, která odstraňuje riziko spojené s anestezií a operací a může být provedena za použití jak čerstvého, tak také chlazeného či mraženého semene (Linde-Forsberg, 1991). Většina evropských veterinárních klinik upřednostňuje TCI zejména kvůli welfare fen (Payan-Carreira et al., 2011). Jsou známy 2 typy technik TCI: norská metoda a novozélandská endoskopická metoda.

Nejméně běžná je norská metoda, známá také jako skandinávská, která byla poprvé použita pro nitroděložní inseminaci lišek a později byla adaptována na fenu (Linde-Forsberg, 1991). Skandinávská metoda vyžaduje 2 katétry – vnější plastický a vnitřní kovový. Existují 3 velikosti katétrů – pro malá, střední a velká plemena. Katetrizace by měla být provedena na stojící feně. Aplikace sedativ není vždy nutná, ale většinou se doporučuje pro uvolnění svalů aplikace alfamimetik.

Vnější plastický katétr by měl být zaveden do vagíny tak daleko, jak je to možné. U mnoha fen, zejména příslušnic velkých plemen, vrchol katétru projde až do kraniální úzké části vagíny. Na druhou stranu u malých plemen může být průchod paracervixem velmi obtížný. Je nezbytné nahmatat konec katétru a děložní krček skrz břišní stěnu. Děložní krček je hmatatelný v období estru jako tuhy vejcovitý útvar. Vnitřní kovový katétr je veden skrz vnější plastický katétr. Děložní krček by měl být fixován mezi palcem a ostatními prsty a skloněn do horizontálního úhlu. Kovový katétr je zaveden do děložního čípku (Payan-Carreira et al., 2011). Semeno tak může být dopraveno přímo do dělohy (Linde-Forsberg, 1991).

Tato technika vyžaduje zkušenosti a je obtížně proveditelná u obézních a nervózních fen či příslušnic obřích plemen. Je doporučována pro rutinní inseminaci fen mraženým ejakulátem. Dále je použití této techniky vhodné pokud inseminujeme semenem nižší kvality nebo semenem částečně znehodnoceným kryoprezervací (Payan-Carreira et al., 2011).

Druhá, novozélandská endoskopická metoda, vyžaduje více speciálního vybavení, ale zároveň umožňuje vizualizaci inseminačního procesu (Wilson, 1993). Intrauterinní inseminace feny pod vizuální kontrolou endoskopického vybavení byla poprvé popsána Wilsonem. K této technice se používá neohebný endoskop, dlouhý kolem 29 cm,

a diagnostické externí pouzdro (Payan-Carreira et al., 2011). Doplnkové vybavení představuje zdroj světla a kamera s monitorem (Wilson, 1993). V současné době je k dispozici řada endoskopů různých značek. Nejvhodnější jsou endoskopy o délce 30-35 cm s 30° zaúhlením a průměrem kolem 3 mm.

Procedura probíhá na stojící feně a většinou není nutná aplikace sedativ. U nervózních fen je ale doporučena aplikace malé dávky, která ale nesmí znemožnit feně stát. Děložní katetrizace je prováděna za použití flexibilního katétru, který je vložen do endoskopu. Endoskop je zaveden do vagíny a katétr dále k děložnímu čípku za vizuální kontroly zprostředkované endoskopem (Payan-Carreira et al., 2011). Katétr pokračuje skrz děložní čípek za použití „točící techniky“ tak daleko, dokud to půjde bez použití síly (průměrně 2 až 3 cm) (Wilson, 1993). Výsledky s použitím rozmraženého semene jsou u této techniky poměrně uspokojivé. Momentálně je tato metoda považována za praktickou, moderní a užitečnou a je možné, že se v budoucnu stane rutinní záležitostí v oblasti umělé inseminace (Payan-Carreira et al., 2011).

TCI ovšem vyžaduje četné znalosti a existuje také množství limitujících faktorů, které může být obtížné překonat, jako je délka vagíny a průměr paracervixu, zejména u malých plemen psů (Linde-Forsberg et Forsberg, 1989). To potvrzuje i Payan-Carreira et al. (2011) a dodávají, že problémy nastávají také u obřích plemen. V prvním případě, u malých plemen, může být průměr potřebného vybavení k inseminaci příliš velký, v druhém případě, u obřích plemen, může délka vagíny znemožnit dosažení oblasti děložního čípku. Dalším problémem může být přítomnost krve či hlenu uvnitř vagíny, která může narušit optické schopnosti čočky a zařízení je pak nutné vysunout a vyčistit. Čas potřebný pro katetrizaci je různý, záleží zejména na zkušenostech inseminátora a na anatomické stavbě vagíny. Obvykle se jedná o 1-2 minuty, ale může trvat i déle (Payan-Carreira et al., 2011). Identifikace cervikální kosti může být také obtížná (Linde-Forsberg et Forsberg, 1989).

Velkou výhodou této techniky je vizuální kontrola zavedení katétru a vložení semene. Umožňuje také odběr vzorku děložní sliznice při podezření na neplodnost feny v důsledku nějaké nemoci. Z těchto a mnoha dalších důvodů se tato metoda stává víc a víc populární (Payan-Carreira et al., 2011).

7.3 Invazivní (chirurgická) inseminace

Chirurgická inseminace je navrhována v případě, že používáme zmražené semeno nebo pokud fena má určité anatomické překážky, které znemožňují zavedení katétru či endoskopu (Payan-Carreira et al., 2011). Tato invazivní metoda je pro inseminátora

výhodná v tom, že má přímý přístup k děloze a může tak vidět případné patologické změny, jako jsou endometriální cysty a také tloušťku děložní stěny. V důsledku specifické fyziologie feny je endometrium vystaveno vysokému množství progesteronu, bez ohledu na to, zda je fena březí. Tato skutečnost může vyvolat řadu patologických změn, které mohou vést až k cystické hyperplazii endometria (Verstegen et al., 2008). Změny na endometriu mohou mít vliv na plodnost feny například omezením transportu semene do vejcovodů nebo narušením propojení mezi plodem a placentou (Verstegen et al., 2008). Laparoskopie i laparotomie vyžadují anestezii a zkušenosti s chirurgickými zásahy (Payan-Carreira et al., 2011).

Rozeznáváme 2 typy chirurgické nitroděložní inseminace: konvenční a nitroděložní přístup. Metoda konvenční chirurgické inseminace je momentálně nejběžnější používaná chirurgická technika, jelikož řez je malý, dochází k minimální manipulaci a většina fen se vrací domů několik hodin po operaci. V tomto případě je použita anestezie, fena je dorzálně položena a je proveden 2 až 3cm řez. Tělo dělohy a děložní rohy jsou izolovány a sterilní podkožní katétr je zaveden do děložního lumenu v těle dělohy nebo v základně některého z děložních rohů. Semeno je poté injektováno do dělohy. Břišní řez je poté uzavřen a fena se zotavuje z anestezie (Brittain et al., 1995).

Nastává zde ovšem otázka, zda je tato technika vůbec etická. Jedná se o invazivní proceduru, která není v souladu s nejlepším zájmem zvířete (Payan-Carreira et al., 2011).

7.4 Výhody a nevýhody

Existuje řada důvodů proč k umělé inseminaci přistoupit. Mezi potenciální výhody patří redukce stresu a infekčních onemocnění díky odstoupení od přirozené plemenitby. Dále snížení nákladů na cestování s fenou za potenciálním sexuálním partnerem, celosvětová dosažitelnost semene a umožnění kastrace v raném věku u pracujících psů, přičemž jejich geny zůstávají zachovány. Mezi další výhody patří možnost „rozředit“ ejakulát na více dávek a oplodnit tak více samic, uchování semene, které může být použito až několik let poté, redukce problémů spojených s odmítáním páření jako je předčasná ejakulace či různé psychické a fyzické problémy a mnoho dalších (Payan-Carreira et al., 2011). Pokud se ale jedná o jedince, kteří se nemohou pářit vzhledem k závažným onemocněním nebo vážným problémům s chováním, nastává zde otázka, zda je to etické (England et Millar, 2008). Umělá inseminace by neměla být využívána bez pečlivé rozvahy (Boland, 2004).

Samozřejmě se najdou i určité nevýhody a hrozby spojené s asistovanou reprodukcí. Může vzniknout psychické či fyzické trauma při procesu umělé inseminace, je zde potenciální možnost vzniku dědičných chorob a abnormalit apod (Payan-Carreira et al., 2011). V Norsku,

Švédsku a Velké Británii je z etických důvodů zakázána chirurgická inseminace, protože existuje řada neinvazivních alternativ. V dalších mnoha zemích se již zvažují podobná opatření (England et Millar, 2008).

7.5 Legislativa

Umělá inseminace je ošetřena legislativně a to vyhláškou č. 192/2004 Sb. o ochraně zvířat při chovu, veřejném vystoupení nebo svodu. Konkrétně se jedná o § 6, který říká, že umělou inseminaci může provést pouze osoba odborně způsobilá a nesmí být použita mezi jedinci, kteří se předtím již nereprodukovali přirozeným způsobem.

Zároveň jsou zásady pro postup při umělém oplodnění zapsány v Mezinárodním chovatelském řádu FCI ve článku č. 13 o umělém oplodnění. Ten říká, že, psi by se měli být schopni rozmnožovat přirozenou cestou. Umělá inseminace by neměla být použita u těch, kteří se dosud nerozmnožovali přirozenou cestou. Výjimku může udělat národní kynologická organizace, aby se zlepšilo zdraví plemene, rozšířil se určitý genotyp nebo fena neutrpěla při krytí újmu. Dále u umělé inseminace musí veterinární lékař, který odebral psovi sperma, potvrdit správci plemenné knihy, ve které se budou štěňata zapisovat, že čerstvé nebo zmražené sperma psa pochází od dohodnutého psa. V tomto osvědčení musí být uvedeno místo a doba umělého oplodnění, jméno a číslo zápisu plemenné knihy feny a jméno s adresou majitele feny. Majitel psa, jemuž bylo odebráno semeno, je povinen majiteli feny vystavit osvědčení o krytí, dodatečně k veterinárnímu ošetření. Náklady spojené s odebráním spermatu a provedením inseminaci hradí majitel feny. V neposlední řadě je umělá inseminace upravena Českomoravskou kynologickou unií v Řádu ochrany zvířat při chovu psů, ve článku 8 pojednávajícím o Podmínkách pro chovné psy a feny, který říká, že krytí feny může být nahrazeno umělým oplodněním pouze v případě, že se jedinci předtím již reprodukovali přirozeným způsobem, a že tento proces musí provádět osoba odborně způsobilá.

8 Závěr

Umělá inseminace je soustavně se vyvíjející biotechnologická metoda, jejíž počátky spadají do 70. let minulého století. Rozvoj této metody byl pozvolný vzhledem ke specifické fyziologii feny.

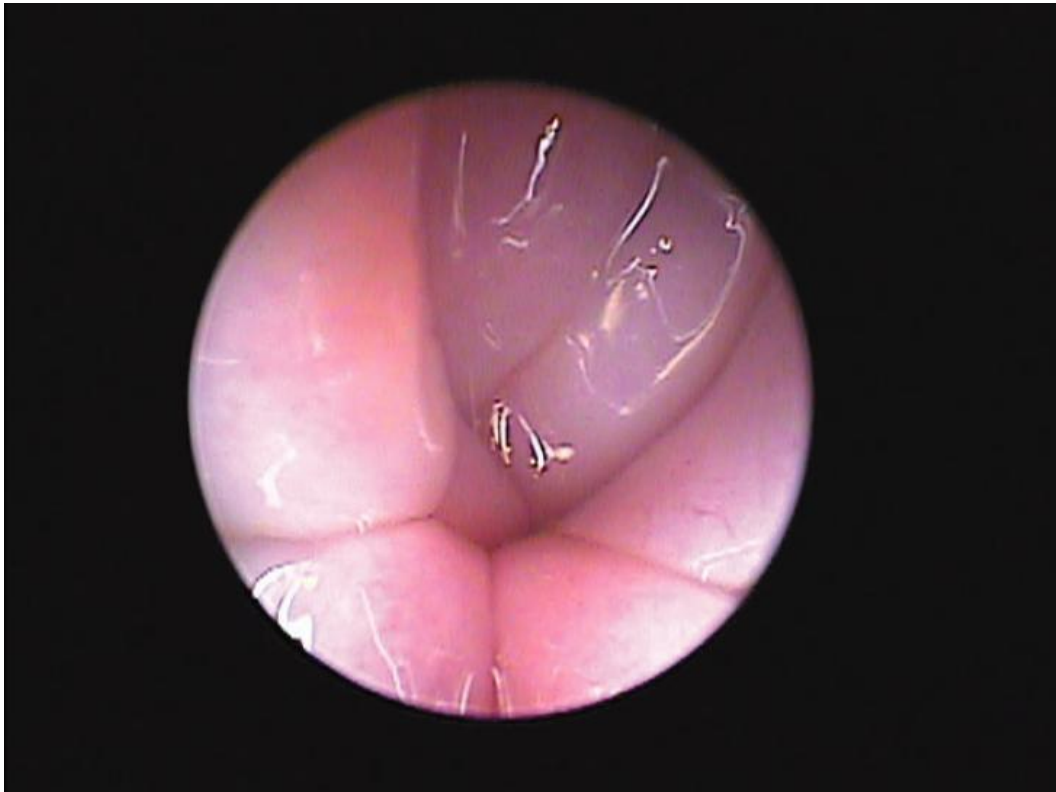
U feny je možné použít umělou inseminaci v době hárání. Vhodná doba pro oplodnění nastává v tzv. fertilizační periodě. K zabřeznutí u feny totiž může dojít až přibližně 2 dny po ovulaci, během kterých oocyt dokončí své meiotické dělení. Jedná se o velké specifikum, jelikož drtivá většina ostatních savců může být oplodněna před, během nebo těsně po ovulaci.

K detekci optimální doby pro inseminace se využívá řada metod – vaginoskopie, vaginální cytologie či progesteronový test, jehož hodnota by měla být 6-10 ng/mL, aby bylo vhodné inseminovat. Pokud je správně stanovena doba inseminace, vybrána optimální metoda, kvalitní inseminační dávka a vše organizuje zkušený chovatel a veterinární lékař, je pravděpodobné, že bude inseminace úspěšná.

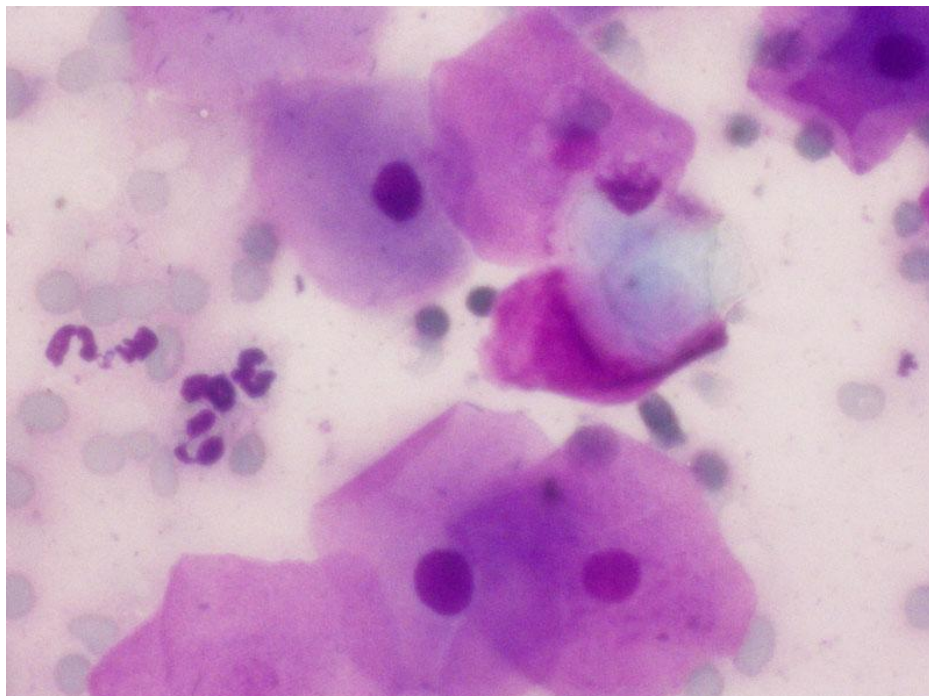
Inseminovat lze dvěma postupy – chirurgickým a neinvazivním. Neinvazivní inseminace je přístup šetrný. Rozeznávají se dvě techniky – transvaginální a transcervikální. Transvaginální inseminace je nejšetrnější a zároveň nejjednodušší metoda, jejíž úspěšnost dosahuje více než 90%. Transcervikální inseminace zahrnuje 2 přístupy – skandinávský a novozélandský. Tyto metody se liší ve vybavení a účinnosti. Skandinávský přístup vyžaduje vnější plastický a vnitřní rigidní katétr, které jsou oba zavedeny k děložnímu krčku. Ten musí být manuálně fixován, což je téměř nemožné u obézních či nervózních fen. Novozélandská metoda vyžaduje endoskop a zdroj světla. Endoskop umožňuje vizuální kontrolu, což je velká výhoda oproti ostatním metodám. Existuje ale také řada limitujících faktorů, které znemožňují použití této techniky, zejména velikost feny. Tato technika je prakticky neuskutečnitelná u miniaturních a obřích plemen vzhledem k délce jejich vagíny. K chirurgickému přístupu by se mělo přistupovat pouze ve velmi výjimečných případech a postupně by se mělo dosáhnout toho, aby byl tento přístup úplně eliminován, jako je tomu v severských zemích. Tato metoda vyžaduje celkovou anestezii a náročný chirurgický zákrok.

Inseminace v chovu psů je regulována státem a také Mezinárodní kynologickou federací. Chovatel a veterinární lékař se musí řídit odpovídajícími zákony a regulacemi, které například zakazují použít umělé oplodnění u jedince, který se dříve nereprodukoval přirozeným způsobem.

9 Obrazová příloha



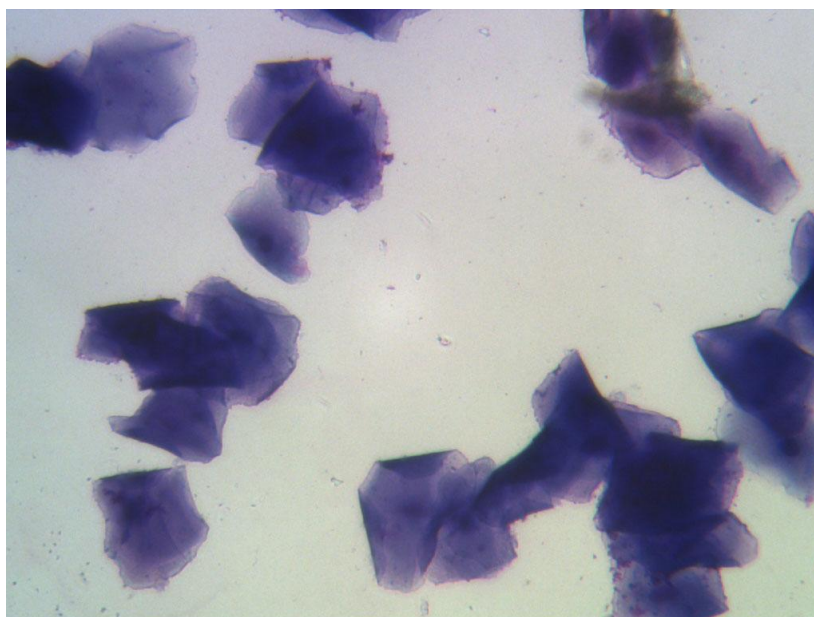
Obrázek 3 - sliznice děložního čípku v raném proestru (W. Schultz in Christensen, 2004)



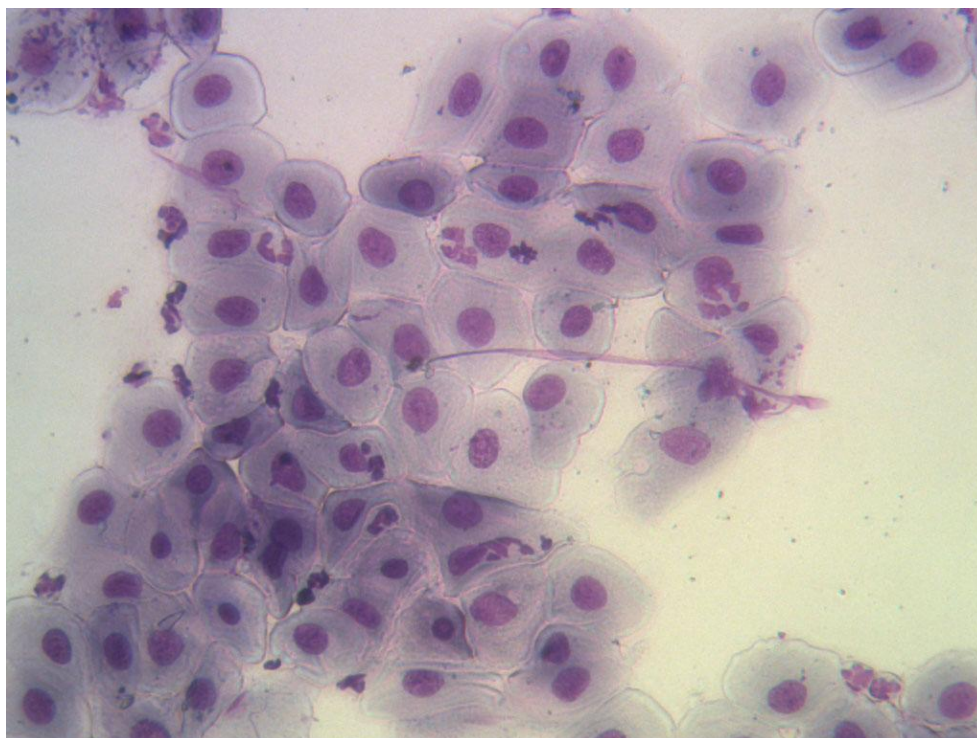
Obrázek 4 - výsledek vaginální cytologie v proestru (Christensen, 2004)



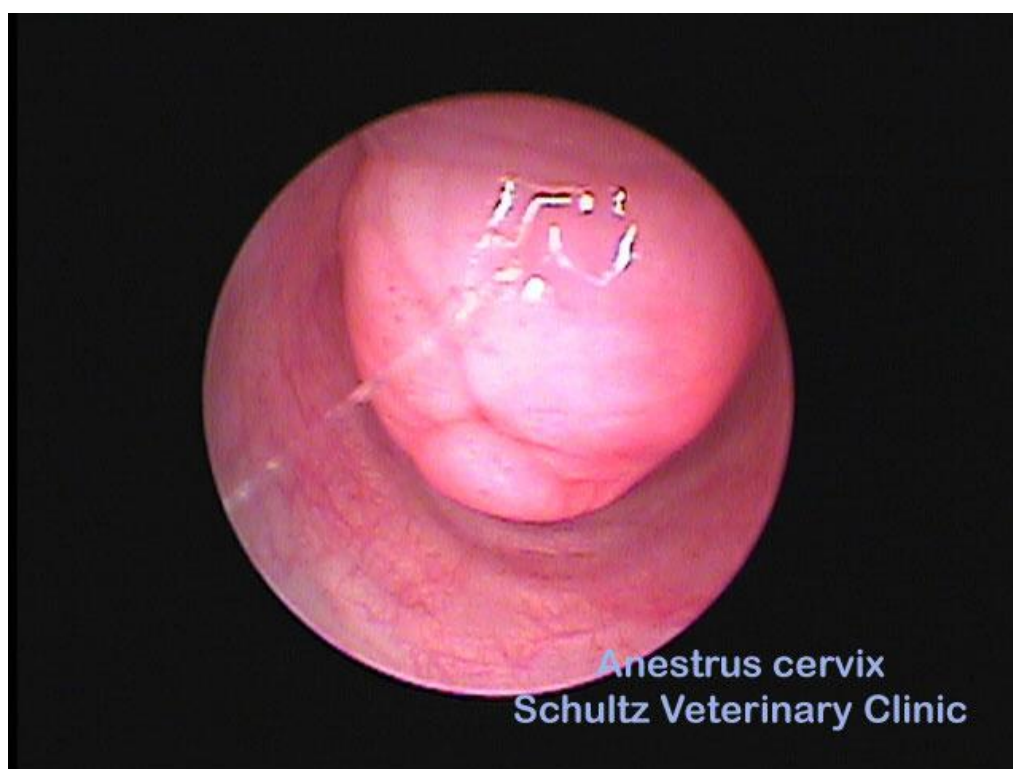
Obrázek 5 - sliznice děložního krčku v estru (W. Schultz in Christensen, 2004)



Obrázek 6 - výsledek vaginální cytologie v estru (Christensen, 2004)



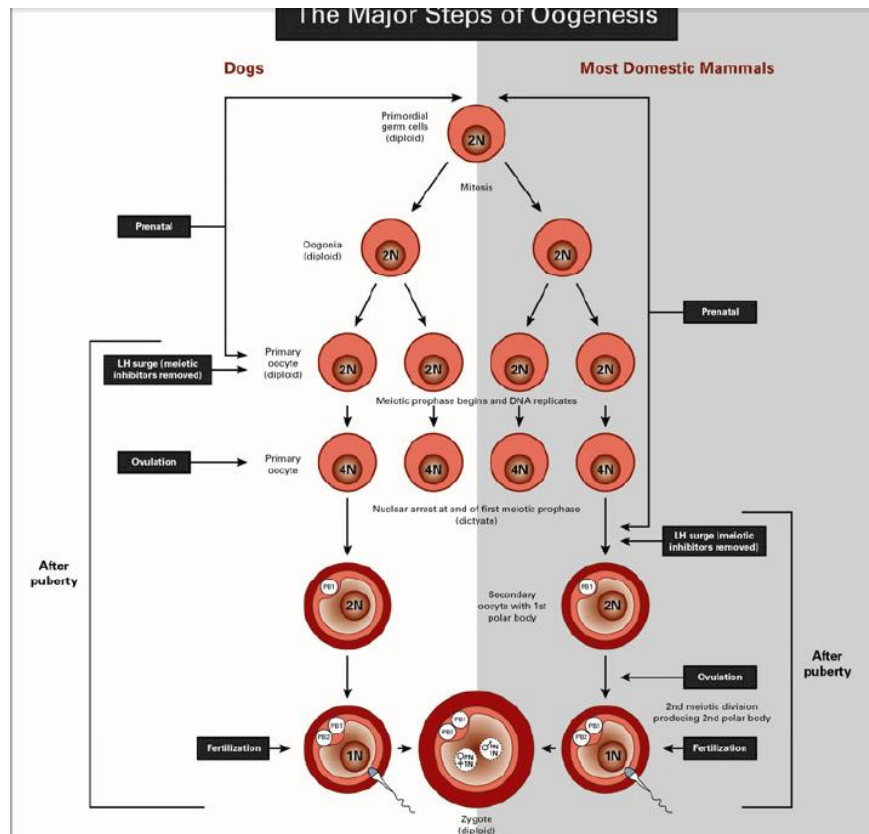
Obrázek 7 - výsledek vaginální cytologie v metestru (Christensen, 2004)



Obrázek 8 - sliznice děložního čípku v anestru (W. Schultz in Christensen, 2004)



Obrázek 9 - výsledek vajíčkové cytologie v diestru (Christensen, 2004)



Obrázek 10 - rozdíly v oogenezi – vlevo fena, vpravo samice většiny domestikovaných savců (Senger, 2003)

10 Seznam použitých zdrojů

Althouse, G. C. Ko, J. C. H. Hopkins, S. M. et al. 1991. Effect of latex and vinyl examination gloves in canine spermatozoa motility. *J Am Vet Med Assoc.* 199. 227 – 229.

Badinand, F. Fontbonne, A. Maurel, M. C. et al. 1993. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J Reprod Fertil Suppl.* 47. 63 – 67.

Beccaglia, M. Luvoni, G. C. 2012. Prediction of Parturition in Dogs and Cats: Accuracy at Different Gestational Ages. *Reproduction in Domestic Animals.* 47 (6). 194 – 196.

Blackmore, D. G. Baillie, L. R. Holt, J. E. Dierkx, L. Aitken, R. J. McLaughlin, E. A. 2004. Biosynthesis of the Canine Zona Pellucida Requires the Integrated Participation of Both Oocytes and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction.* 71. 661 – 668.

Blendinger, K. 2007. Collection and evaluation of the semen in the dog. *Med Vet. Hofheim. 56°Congresso Internazionale Multisala SCIVAC.* 83-84.

Boland, P. 2004. Surgical insemination and other wals. *The 4th Congress of the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction.* Barcelona.

Braw-Tal, R. Yossefi., S. 1997. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 109. 165 - 171.

Brittain et Concannon et Flanders et al., 1995

Christiansen, I. B. J. 2004. *Reproduction in the Dog and Cat.* Bailliere Tindall. 50-68.

Concannon, P. W. Hansel, W. Visek, W. J. 1977. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod.* 17. 604 – 613.

Concannon, P. W. Whaley, S. Lein, D. Wissler, R. 1983. Canine Gestation Length: Variation Related To Time of Mating and Fertile Life of Sperm. *Am J Vet Res.* 44 (10). 1819 – 21.

Concannon, P. W. 1991. *Reproduction in the dog and cat. Reproduction in domestic animals.* Academic Press. Orlando.

Concannon, P.W. 2011. Reproductive Cycles of the Domestic Bitch. *Animal Reproduction Science.* 124 (3-4). 200-210.

Del Campo, C. H. Ginther, O. J. 1974. Arteries and veins of uterus and ovaries in dogs and cats. *Am J Vet Res.* 35. 409 – 415.

Doležel, R. Kudláč, E. a kolektiv. 1997. *Veterinární gynekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita. Brno.* 144. ISBN: 8085114046.

Dunlop, R. H. Williams, D. J. 1996. *Veterinary Medicine: An Illustrated History*. 1 st ed. Mosby. 692. ISBN: 978 – 0801632099.

England, G. C. V. Millar, K. M. 2008. The ethics and role of AI with fresh and frozen semen in the dog. *Reproduction in Domestic Animals*. 43. 165 – 171.

England, G. 2010. *Physiology and Endocrinology of the Female*. In: England, G. von Heimendahl, A. 2010. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. 240. ISBN: 9787905319190.

England, G. von Heimendahl, A. 2010. Determining Breeding Status. In: England, G. von Heimendahl, A. 2010. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. 240. ISBN: 9787905319190.

Evans, H.E. de Lahunta, A. 2013. *Miller's Anatomy of the Dog*. 4th ed. Elsevier Saunders. 850. ISBN: 978143770812-7

Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*. 53. 175 – 186.

Farstad, W. 2010. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science*. 60 – 61. 375 – 387.

de Gier, J., Kooistra, H.S., Djajadiningrat-Laanen, S.C., Dieleman, S.J. Schaefer-Okkens, A. C. 2006. Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology*. 66 (4). 1419 – 1422

Goericke-Pesch, S., Schimdt, B., Failing, K., Wehrend, A. 2010. Changes in the histomorphology of the canine cervix through the oestrous cycle. *Theriogenology* 74 (6). 1075-1081.

Hoffmann, B. Riesenbeck, A. Schams, D. Steinetz, B.G. 1999. Aspects on Hormonal Control of Normal and Induced Parturition in the Dog. 34 (3-4). 219-226.

Holst, P. A., Phemister, R. D. 1971. The prenatal development of the dog: preimplantation events. *Biol Reprod*. 5. 194 – 206

Holst, P. A., Phemister, R. D. 1974. Onset of diestrus in the Beagle bitch: definitiv and significance. *Am J Vet Res*. 35. 401 – 406.

Ireland, J. J. Mihm, M. Austin, E. et al. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine oestrous cycle: key concepts, studies, advancement and terms. *J Dairy Sci*. 83. 1648 – 1658.

Jeffcoate, I. A. Lindsay, F.E. 1989. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.* 39. 277-287.

Jöchle, W. 1997. Prolactin in Canine and Feline Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals.* 32. 183-193.

Johnson, S.D. Root Kustritz, M.V. Olson, P.N.S. 2001. Canine pregnancy. In *Canine and feline theriogenology.* Philadelphia. WB Saunders. 592. ISBN: 0721656072.

Kudláč, E. Elečko, J. a kolektiv. 1987. *Veterinární porodnictví a gynekologie.* SZN. Praha. 572. ISBN: 0705387

Kutzler, M. A. 2012. Canine semen collection and management of male infertility. *Proceedings of the Congreso Latinoamericano de Emergencia y Cuidados Intensivos LAVECCS.*

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. *J Reprod Fertil Suppl.* 39. 299 – 310.

Linde-Forsberg, C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 21. 467-486.

Makloski, C.L. 2012. Clinical techniques of Artificial Insemination in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 42 (3). 439-444.

Mezinárodní chovatelský řád FCI. Dostupné také z <http://www.cmku.cz/soubory/dokumenty/21.pdf>

Najbrt, R. a kolektiv. 1982. *Veterinární anatomie 2.* Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 596. ISBN.

Payan-Carreira, R. Miranda, S. Nizański, W. 2011. Artificial Insemination in Dogs. *Artificial Insemination in Farm Animals. InTech.* 52-74. ISBN: 978-953-307-312-5.

Perry, J. S. 1972. *The ovarian cycle of mammals.* Hafner Publishing Co. New York. ISBN: 0050023438

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

Reece, W.O. 2010. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat.* Grada. 480. ISBN: 978 – 80 – 274 – 3282 – 4.

Rehm, S. Stanislaus, D.J. Williams, A.M. 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80. 233-245.

- Renton, J.P., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J.A., Mullaney, J., Perry B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 93. 221-231.
- Root Kustritz, M. V. 2006. *The Dog Breeder's Guide to Successful Breeding and Health Management*. Elsevier Health Sciences. St. Louis. 512. ISBN: 1 – 4160 – 3139 – 1.
- Root Kustritz, M.V. 2012. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 42 (3). 423-437.
- Roszel, J. F. 1975. Genital cytology of the bitch. *Vet Scope*. 19. 2 – 15.
- Saint-Dizier, M., Renard, J.-P., Chastant-Maillard, S. 2001. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction*. 121. p. 97-105
- Saint-Dizier, M., Renard, J.-P., Chastant-Maillard, S., Salomon, J.F., Petit, C. 2001. In vitro maturation of bitch oocytes: effect of sperm penetration. *Journal of Reproduction and Fertility*. 57 (Suppl.). 147-150.
- Senger, P. L. 2003. The follicular phase. In: *Pathways to pregnancy and partitition*. Pullman, W. A. *Current Conceptions*. 182.
- Smitz. J, Cortvrindt. R. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 123(2). 185 - 202.
- 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. 2001. *Nemoci psa a kočky, II. díl*. Noviko, a.s. Brno. 1022. ISBN: 8090259537
- Tsutsui, T. Higuchi, C. Soeta, M. 2009. Plasma LH, ovulation and conception rates in cats mated once or free times on different days on oestrus. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2). 76 – 78.
- Turmalaj, L. Duro, S. Lika, E. Ceroni, V. 2011. The Hormonal Control of Estrous in Bitches. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10 (18). 2447-2449.
- Verstegen, J. Dhaliwal, G. Verstegen-Onclin, K. 2008. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*. 70 (3). 364 – 74.
- Wildt, D.E. Kinney, G.M. Seager, S.W.J. 1977. Laparoscopy for direct observation of internal organs in the domestic cat and dog. *Amer J Vet Res*. 38. 1429 – 1432.
- Wilson, M. 1993. Non-surgical artificial insemination in bitches using frozen semen. *Journal of Reproduction and fertility*. 47. 307 – 311.
- Zuckerman, S. 1971. *The Ovary*. 2 nd ed. Academic Press. New York.