

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra obecné zootechniky a etologie



Koncentrace progesteronu v krvi fen a určení nejvhodnější doby krytí

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jana Dytrychová

Vedoucí práce: Dr. Ing. Naděžda Šebková

2014

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci **Koncentrace progesteronu v krvi žen a určení nejvhodnější doby krytí** vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne :

.....

Jana Dytrychová

Poděkování

Děkuji vedoucí mé diplomové práce Dr. Ing. Naděždě Šebkové za cenné rady, velkou trpělivost, připomínky a metodické vedení mé práce.

Dále bych ráda poděkovala MVDr. Aloisovi Lázničkovi za jeho drahocenný čas, který mi věnoval a poskytnutí statistických údajů, potřebných pro tuto práci. Poděkování taktéž patří MVDr. Andree Petrikovitsové za poskytnutí literatury. Ráda bych poděkovala také MVDr. Otovi Humlovi z veterinární kliniky Vedilab za poskytnutí statistických údajů k inseminaci. V neposlední řadě děkuji také mé rodině za podporu a vytvoření vhodných podmínek pro psaní mé práce.

Souhrn

Progesteron (P4) je přirozený steroidní hormon, který je sekretován žlutými tělisky na vaječnicích.

Říje se u fen opakuje přibližně v půlročních intervalech, nejčastěji na jaře a na podzim. U malých plemen však můžeme pozorovat i častější říji v odstupu cca čtyř měsíců a naopak u některých velmi přešlechtěných plemen nastupuje říje jen jednou do roka.

Cílem mé práce bylo shrnout dosavadní poznatky v oblasti koncentrace progesteronu a určení nejvhodnější doby krytí.

Dalším cílem je pak srovnání úspěšnosti zabřezávání po přirozeném krytí a inseminací nativním semenem.

Na začátku diplomové práce byly stanoveny dvě hypotézy. První z nich předpokládala, že nejvíce úspěšných krytí fen s následnou březostí je mezi 7 - 14 ng progesteronu / ml. Tato hypotéza byla potvrzena. Druhá hypotéza tvrdila, že feny mají vyšší úspěšnost zabřezávání po přirozeném krytí než po inseminaci nativním spermatem. I tato hypotéza byla potvrzena.

Náš výzkum potvrdil, že nejvhodnější koncentrace progesteronu pro krytí se pohybuje v rozmezí mezi 7 – 14 ng / ml (mé výsledky ukázaly na hodnoty v rozmezí 6,54 – 11,88 ng / ml).

Výsledky našeho výzkumu rovněž ukazují na vyšší úspěšnost zabřezávání fen po přirozeném krytí, než při inseminaci nativním semenem. Střední úspěšnost přirozeného krytí je 79,6 %, což je o 7,8 % více, než střední úspěšnost inseminace (71,8 %).

Úspěšnost zabřezávání z krytí nebo inseminací vedených podle zjištěných koncentrací plazmatického progesteronu uvedenými testy se pohybuje do 90 %.

Ovulace je u fen spontánní, nevyžaduje stimulaci prostřednictvím páření. Kombinace zvyšující se hladiny progesteronu a současný pokles koncentrace estrogenů vede k estrálnímu chování feny a svolnosti ke krytí.

V době gravidity se koncentrace progesteronu stále udržuje a tím je gravidita udržována a nedochází k luteolýze. Pokles progesteronu na méně než 1 až 2 ng / ml vede k zahájení porodu či potratu.

Vyšetření jsou pro stanovení doby úspěšného krytí velmi přesná. Například úspěšnost krytí a inseminací vedených pomocí poševní cytologie a progesteronového testu dosahuje až 95 %.

Klíčová slova : fena, progesteron, koncentrace, ovulace, gravidita.

Summary

The progesterone (P4) is a natural steroid hormone, which is secreted by the corpus luteum on the ovaries.

Oestrus in females is repeated approximately every six months, usually in spring and autumn. For small breeds, we can observe more frequent oestrus at a distance of about four months. Conversely, some very cultivated breeds started oestrus only once a year.

The aim of this work was to summarize the current knowledges on progesterone concentration and determine the best time mating.

Another objective is to compare the success of conception natural mating and insemination native sperm.

At the beginning of the thesis were established two hypothesis. The bitches are most often pregnant after natural mating at a concentration of 7 - 14 ng progesterone / ml (this is the optimum concentration for mating). This hypothesis was confirmed. The second hypothesis argued that bitches after insemination with native sperm has worse results than bitches after natural mating. This hypothesis also was confirmed.

Our research confirmed that the most appropriate concentration of progesterone for coverage ranges between 7 - 14 ng / ml (my results showed the values in the range of 6,54 to 11,88 ng / ml).

Our results also show a higher success rate of pregnancy after natural mating than at insemination native seed. Mean percentage of natural mating is 79,6 %, which is 7,8 % more than median success rate of artificial insemination (71,8 %).

Success conception natural mating or insemination by the concentration of plasma progesterone is about 90 %.

Ovulation is spontaneous in bitch, do not require stimulation through copulation. The combination of increasing levels of progesterone and the current decline in estrogens leads to oestrus behavior of bitches and agree of mating.

During the pregnancy the concentration of progesterone is still maintained and no luteolysis. The decline of progesterone to less than 1 to 2 ng / ml results in the initiation of parturition or abortion.

The investigations in determining the successful mating are very accurate. For example the success rate mating and insemination determined using by the vaginal cytology and progesterone test is up to 95 %.

Key words : bitch, progesteron, concentration, ovulation, pregnancy.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	2
3 Přehled literatury.....	3
3.1 Anatomie pohlavních orgánů feny	3
3.1.1 Histologická struktura poševní stěny a cytologický obraz poševního nátěru.....	3
3.1.1.1 Bazální buňky (BB)	3
3.1.1.2 Parabazální buňky (PB).....	4
3.1.1.3 Intermediární buňky (IB).....	4
3.1.1.4 Superficiální buňky (SB).....	4
3.1.1.5 Další součásti poševního obrazu.....	4
3.1.2 Vaječníky	5
3.1.2.1 Struktura vajíčka	6
3.1.2.2 Generativní funkce vaječníků	6
3.1.3 Vejcovod.....	7
3.1.4 Děloha.....	8
3.1.5 Pochva.....	8
3.1.6 Přezka	9
3.1.7 Mléčná žláza.....	9
3.2 Fyziologie pohlavních orgánů feny	9
3.2.1 Vznik samičího pohlavního ústrojí a jeho funkce	10
3.2.2 Řízení pohlavní aktivity	10
3.2.3 Pohlavní cyklus	11
3.2.3.1 Hormonální profil u fen	13
3.2.3.2 Ovulace	13
3.2.3.3 Plodné období.....	14
3.2.3.4 Luteální fáze	14
3.2.4 Hormony související s reprodukcí a jejich účinky	14
3.2.4.1 Neurotransmitery	15
3.2.4.2 Hypotalamové hormony – neurohormony.....	15
3.2.4.3 Gonadotropní hormony	15
3.2.4.4 Ovariální hormony	15
3.2.4.5 Děložní prostaglandin F ₂ alfa.....	16
3.2.4.6 Ostatní hormony a jejich vztah k reprodukci.....	17
3.2.5 Fáze pohlavního cyklu	17
3.2.5.1 Proestrus	17

3.2.5.2 Estrus.....	18
3.2.5.3 Metestrus (diestrus).....	21
3.2.5.4 Anestrus.....	22
3.3 Stanovení nejvhodnějšího termínu krytí	23
3.3.1 Poševní cytologie a její využití	23
3.3.1.1 Určení vhodné doby připuštění (inseminace)	24
3.3.1.2 Stanovení pravděpodobnosti oplození při průkazu nežádoucího nakrytí	25
3.3.2 Progesteronový test.....	25
3.3.3 Sonografické vyšetření u fen.....	29
3.3.3.1 Sonografická diagnostika březosti u fen	29
3.3.3.2 Sonografická diagnostika patologických stavů v průběhu gravidity	31
3.3.3.3 Význam diagnostiky březosti u fen.....	31
3.3.4 LH test	31
3.3.5 Vaginoskopie.....	32
3.4 Inseminace	32
3.4.1 Historie a vývoj umělé inseminace.....	32
3.4.2 Umělá inseminace v Čechách.....	33
3.4.3 Význam umělé inseminace	34
3.4.4 Umělá inseminace fen.....	34
3.4.4.1 Péče o fenu po inseminaci	38
3.4.5 Odběr semene od psa	38
3.4.6 Vlastnosti ejakulátu psa	40
3.4.7 Frekvence získávání ejakulátu od psa.....	43
3.4.8 Ředění a konzervace semene.....	43
3.4.9 Technika umělé inseminace	44
3.4.9.1 Inseminace čerstvým semenem	45
3.4.9.2 Inseminace chlazeným semenem.....	45
3.4.9.3 Inseminace mraženým semenem	46
3.4.9.4 Vývoz semene psa do zahraničí.....	47
3.4.9.5 Dovoz semene psa do České republiky.....	47
3.5 Nejčastější poruchy a nemoci u fen spojené s reprodukcí	48
3.5.1 Vaginitis	48
3.5.2 Pyometra	48
3.5.3 Endometritis	49
3.5.4 Juvenilní zánět pochvy.....	50
3.5.5 Abnormální cyklus	50

3.5.6 Pseudogavidita	51
3.5.7 Absence mléka	52
3.5.8 Eklampsie.....	53
3.5.9 Mastitida	53
3.5.10 Děložní cysty a tumory	54
3.5.11 Ovariální cysty a tumory.....	54
3.5.12 Folikulární a luteální cysty.....	54
3.5.13 Hypoluteinismus	54
3.6 Kastrace feny	55
3.6.1 Hormonální antikoncepce u fen.....	56
4 Materiál a metodika práce	58
5 Výsledky.....	63
5.1 Inseminace	63
5.2 Progesteron	78
5.3 Srovnání přípravků Receptal, Supergestran a Pregnyl	85
5.4 Srovnání pravděpodobnosti porodu dle typu krytí	90
6 Diskuze.....	93
7 Závěr	97
8 Seznam použité literatury	98
9 Samostatné přílohy.....	111

1 Úvod

V České republice má chov psů velice dlouhou tradici. Úspěšná reprodukce a porody zdravých a životaschopných štěňat jsou cílem každého chovatele. Mnoho plemen však v současné době není schopno přirozené reprodukce ani porodů. V posledních letech klesají také počty zabřezlých fen v důsledku různých infekčních onemocnění, abnormalit nebo i vlivem životního prostředí. Začíná se častěji řešit problém s atypickou říjí. Chovatel velmi často neodhadne správný termín krytí. Proto je čím dál více kladen požadavek na důkladnější laboratorní vyšetření a tím i možnost předcházení problémů spojených s reprodukcí.

Určení nejvhodnější doby krytí prostřednictvím stanovení koncentrace progesteronu v krvi fen a následné úspěšné zabřeznutí feny je v současné době mezi chovateli velmi žádaný cíl. Díky této možnosti se chovatelům snižují ekonomické, zdravotní i chovatelské náklady. Stanovení optimální doby krytí prostřednictvím progesteronového testu je v současné době nejpřesnější a nejspolehlivější metodou v oblasti reprodukce psů.

Krev je při stanovení hladiny progesteronu ve většině případů odebírána ze žíly z hrudní končetiny. Před vlastní ovulací dochází u fen ke zvýšení hladiny progesteronu. Vzestup je vyvolán zvýšením hladiny LH. Díky stanovení koncentrace progesteronu lze nepřímo určit, zda už vzestup hladiny LH začal nebo, kdy k němu již došlo.

Cytologická vyšetření poševní sliznice pak dokážou odhalit nejen fázi pohlavního cyklu, ve které se fena momentálně nachází, ale i různá onemocnění, mezi něž patří i neplodnost jedinců. Jednotlivá vyšetření se tak doplňují.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem mé práce bylo nastudování a shromáždění údajů, týkajících se oblasti reprodukce psů. Pro práci byla vybrána metoda nejpřesnější a nejspolehlivější, tak zvaný progesteronový test, dle něž se stanovením koncentrace progesteronu z krve feny určí nejvhodnější doba krytí.

Dalším cílem je pak srovnání úspěšnosti zabřezávání po přirozeném krytí a po inseminaci nativním spermatem.

Na základě těchto záměrů jsou stanoveny následující vědecké hypotézy:

H₁ : Feny nejvíce zabřezávají po krytí při koncentraci progesteronu 7 - 14 ng / ml (je to optimální koncentrace pro krytí).

H₂ : Feny po inseminaci nativním spermatem vykazují horší výsledky zabřezávání než feny po přirozeném krytí.

3 Přehled literatury

3.1 Anatomie pohlavních orgánů feny

Vnitřní úsek pohlavních cest je ve své kaudální části tvořen silnostěnnými trubicovitými orgány – pochvou a poševní předsíní. Za fyziologických podmínek vynikají oba orgány velmi vysokou elasticitou a to především v době říje a porodu, čímž je zajištěna snadná průchodnost jejich kolabovaného lumenu. Tento úsek je kranálně ohraničen vstupem do děložního krčku (*ostium externum cervicis uteri*) a kaudálně vulvou. Jeho celková délka se pohybuje v závislosti na stáří, paritě a plemenné příslušnosti, tj. na tělesném vzrůstu, mezi 10,5 až 23,5 cm (měřeno u fen s tělesnou hmotností 6,5 kg – 27 kg). Samotná pochva z toho zaujímá okolo 2 / 3 až 3/4 délky a je topograficky uložena u stojící feny na pánevním dně, kde víceméně kopíruje jeho horizontální osu (Láznička, 1992).

V průběhu kaudálních pohlavních cest je většinou patrné jedno zúžení lumina. Místo zúžení se nachází nad obloukem stydkých kostí (*arcus ischiadicus pelvis*), na rozhraní pochvy a poševní předsíně. Na tomto zúžení se podílí jednak mírně dorzokaudálně směřující kostěný podklad pánevního dna, který svou nejkaudálnější částí lehce komprimuje lumen z ventrální strany a dále i cirkulární slizniční řasa, jejíž podkladem jsou vazivové zbytky hymenu (Láznička, 1992).

3.1.1 Histologická struktura poševní stěny a cytologický obraz poševního nátěru

Výstelku děložního čípku, pochvy, poševní předsíně a vulvy fen tvoří rohovatějící vrstevnatý dlaždicovitý epitel (Láznička, 1992).

3.1.1.1 Bazální buňky (BB)

Nejvzdálenější vrstvu od lumina pochvy, *stratum cylindricum seu basale*, tvoří jedna řada kubických až cylindrických buněk, které se prstovitě zakotvují do bazální membrány, oddělující buňky do cévnatého vaziva. Bazální buňky jsou vývojově nejmladší a vynikají vysokou mitotickou aktivitou. Vytváří tzv. regenerační vrstvu poševní sliznice. V poševním nátěru jsou BB sytě bazofilní, kulaté nebo mírně protáhlé (10 – 20 μm). Obvykle mají centrálně uložené velké kulaté jádro (6 – 10 μm) s dobře viditelnými jadérky (Christiansen, 1984).

3.1.1.2 Parabazální buňky (PB)

Druhou vrstvu poševního epitelu, *stratum spinosum profundum*, tvoří několik řad kubických buněk, pro které jsou typické četné intercelulární můstky, často se jeví jako nerovnosti buněčné membrány (Kobilková a Siracký, 1990).

Parabazální buňky jsou typickou součástí poševního obrazu ve fázi tzv. nízkého epitelu, to je v období od metestru do časného proestru. Jejich počet však ani zde není nikdy veliký (Christiansen, 1984).

3.1.1.3 Intermediární buňky (IB)

Střední a nejsilnější vrstvu poševního epitelu, *stratum spinosum superficiale*, tvoří několik řad tvarově a velikostně vysoce variabilních buněk. Mají velký obsah zásobních látek v cytoplazmě, především glykogenu. Intermediární buňky jsou typické pro fáze pohlavního cyklu, ve kterých dochází jednak ke zvyšování poševního epitelu – proestrus nebo k jeho snižování – metestrus (Christiansen, 1984).

3.1.1.4 Superficiální buňky (SB)

Jsou buňkami odumírajícími nebo mrtvými, proto se také spontánně odlučují. Ve vrcholu říje, kdy podléhají plné keratinizaci, jsou v poševním obraze nalézány téměř výhradně acidofilní bezjaderné buňky. Po ovulaci je tento nálezný doplněn bohatým výskytem shluků ze zmenšených bezjaderných acidofilních buněk se zřaseným okrajem, označovaných jako hrudky (Christiansen, 1984).

3.1.1.5 Další součásti poševního obrazu

Od metestru až po časný proestrus se fyziologicky v luminu pochvy zjišťuje zvýšené množství leukocytů, hlavně kulatých neutrofilů (10 – 12 μm), s tmavým, bohatě segmentovaným jádrem. Přibližně od časného estru se toto množství snižuje. Proto ve vrcholu říje nejsou již Leukocyty v poševním nátěru vůbec přítomny. Opět se objevují asi 24 – 40 hodin po ovulaci. Téměř u všech žen jsou v období od proestru do časného metestru hojnou součástí poševního obrazu také erytrocyty. Přesto nejsou považovány pro diagnostiku fází pohlavního cyklu za směrodatné. Prostředí pochvy není sterilní (Holst, 1986).

Při vaginitě jsou občas nacházeny histiocyty a pro jejich velkou tvarovou a velikostní variabilitu je značně ztížena jejich diagnostika. Přítomnost buněk endocervixu, který je vystlán cylindrickým epitelem, bývá dokladem lézí na děložním krčku. Ve folikulární fázi pohlavního cyklu se buňky odlupují v nepravidelných shlucích. Svůj původ v buňkách

děložního krčku má i hlen. Jeho větší množství provází poševní obraz v průběhu celého hárání, ale i mimo něj pokrývá poševní sliznici amorfni mukoidní substance ne zcela jasného původu (Kobilková a Siracký, 1990).

Součástí hlenu je nepravidelně rozptýlený jemný detritus, který vzniká rozpadem deskvamovaných epitelů především činností bakterií. Hlen s bakteriemi a buněčným detritem vytváří „ pozadí stěru „ (Günzel et al., 1985).

Jejich zvýšená přítomnost, mimo období vrcholu estru, způsobuje dojem „ špinavého “ cytologického nátěru (Schutte, 1967).

3.1.2 Vaječníky

Funkčním základem pohlavního ústrojí feny jsou dva vaječníky, ve kterých se vytvářejí vajíčka a pohlavní hormony. Vaječníky se nacházejí v dutině břišní v blízkosti páteře, těsně za ledvinami, asi v oblasti 3. – 4. bederního obrátle. Vaječníky mají vejčitý tvar (délka 1 až 2 cm, průměr 1,5 cm) a jsou zcela ukryty ve vaječnickovém vaku. Zvláštností je, že u většiny fen levý vaječník je těžší než pravý a obsahuje také více preovulačních folikulů. Vaječníky novorozených fen obsahují asi 700 000 vajíček, v dospělosti tento počet klesá na 350 000. Ve věku 5 let jich je jen 33 000 a v 10 letech jen 500. Velikost folikulů v době estru může být až 6 mm (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Představují cílový orgán hypotalamo – hypofyzárního řízení. U samic jsou gonády prezentovány dvěma vaječníky, které zastávají jednak funkci produkce vajíček a dále vytvářejí pohlavní hormony (sexageny). Vaječnickové hormony ovlivňují růst a řídí funkci vývodných pohlavních cest a podmiňují vývoj sekundárních pohlavních znaků. Vaječníky jsou uloženy v kaudální části dutiny břišní a jejich poloha a tvar značně záleží na druhové příslušnosti, věku zvířete a funkčním stavu. Každé ovarium je volně zavěšeno v dutině břišní na závěsném vazů vaječnickovém. Odtud přechází v široké děložní vazy (Kudláč a Elečko, 1987).

Gestageny vznikají ve žlutém tělísku a v pokročilé graviditě i v placentě. Vyvolávají ve sliznici dělohy změny nutné k přijetí oplodněných vajíček, podporují růst mléčných alveol, brání zrání dalších vajíček ve vaječnicku a podmiňují další procesy související s březostí (Dostál a kol., 1997).

3.1.2.1 Struktura vajíčka

Vajíčka domácích zvířat jsou kulovitého nebo mírně vejčitého tvaru. Průměr vajíčka u feny dosahuje 135 μ . Vlastní obal vajíčka tvoří průsvitná blanka - zona pellucida. Ta je od cytoplazmy oddělena žloutkovou blánou (*membrána vitellina*). Hlavní součástí vajíčka je cytoplazma. Z největší části je vyplněna výživným žloutkem, který se skládá z proteinů, lipidů a sacharidů. V cytoplazmě je uloženo jádro. Je měchýřkovitého tvaru, obklopené silnou jadernou membránou a chudé na chromatin. V jádru je uloženo jedno nebo více jadérek. Vajíčka domácích zvířat jsou chudá žloutkem a řadíme je mezi vajíčka oligolecitální (Kudláč a Elečko, 1987).

3.1.2.2 Generativní funkce vaječnicků

Samičí pohlavní buňky, vajíčka, se vyvíjejí ve vaječnicích fen v procesu zvaném oogeneze. U fen neexistuje klimakterium v tom smyslu, jak je známe u žen, a proto je tvorba vajíček závislá mnohem více na zdraví, konstituci a fyziologickém stavu feny než na jejím stáří (Dostál, 1995).

Tvorbu oplození schopných vajíček, lze označit názvem oogeneze. Jde o velmi složitý vývojový proces. Rozlišujeme tři vývojová období: období rozmnožování, růstu a zrání. V období rozmnožování, které probíhá během intrauterinního vývoje jedince dochází k mnohonásobnému mitotickému dělení prvovaječných buněk – oogonií. Počet primárních oocytů v ovariích v době narození jedince samičího pohlaví je velký. U štěněte v jednom ovariu bylo zjištěno dokonce 500 000 primárních oocytů. Primární folikul je tedy charakterizován oocytem a jednou vrstvou folikulárních buněk. U feny se často vyskytuje primární folikul s více oocyty (Kudláč a Elečko, 1987).

Primární oocyty vznikají ze vzrostlých oogonií. Během tohoto růstu se kolem oocytů seskupují epiteliální buňky a vytváří se tak primární folikul (Dostál, 1995).

Období růstu je charakterizováno zvětšováním cytoplazmy oocytů, při němž jádro zpočátku prodělává změny představující profázi prvního meiotického dělení, dále se tvoří vaječná blána (*zona pellucida*) a vytvoří se několikvrstevný obal. Kolem oocytu se folikulární buňky řadí paprskovitě a vytváří se tzv. *corona radiata*, která zůstává kolem vajíčka ještě krátce po jeho uvolnění z vaječnicku. Během dalšího vývoje vzniká Graafův folikul. Buňky obklopující dutinu folikulu vytvářejí vrstvu označovanou jako *membrana granulosa*. V období zrání podléhá oocyt dvěma po sobě následujícím zracím dělením a vzniká z něho zralé, oplození schopné vajíčko (*ovum*). Při prvním zracím dělení se primární oocyt rozdělí na dvě nestejně velké buňky, obě ještě s plným (diploidním) počtem

chromozómů. Do jedné buňky přechází téměř všechna cytoplazma a vytvoří se tak sekundární oocyt nebo oocyt II. řádu. Druhá buňka je podstatně menší a je označována jako první pólóvé tělísko (Kudláč a Elečko, 1987).

Při narození samice jsou ve vaječnicích přítomny tisíce potenciálních vajíček, ale v průběhu života jich dozraje a je oplozeno jen několik desítek. U pohlavně nedospělých samic se v korové vrstvě nacházejí primární nedozrálé folikuly, u pohlavně dospělých samic se tu nachází folikuly v různém stupni zralosti. Dělí se na primární, sekundární a terciární. Každý folikul se skládá z vajíčka a obalu. Primární folikul je primární vaječná buňka obalená jednou vrstvou folikulárních buněk. Sekundární folikul je macedorostoucí primární vaječná buňka obalená několika vrstvami folikulárních buněk s vyvíjející se folikulární dutinou. Terciární folikul má vytvořenu velkou folikulární dutinu a folikulární buňky vytvářejí sekundární obal vajíčka. Zralý terciární folikul se vydouvá na povrch vaječníku (Dostál a kol., 1997).

V cytoplazmě oocytu II. řádu dochází k určitým změnám. Do druhé buňky přechází jen nepatrné množství cytoplazmy. Tato buňka je označována jako první pólóvé tělísko. V průběhu prvního zracího dělení se rychle zvětšuje Graafův folikul. Současně nebo krátce po prvním dělení se oocyt II. řádu, společně s pólóovým tělískem a vrstvou folikulárních buněk, zvanou *corona radiata* oddělí z vejcovodného hrbolku a uvolní se do folikulární tekutiny, s níž se po ovulaci dostává do vejcovodu. V té době začíná druhé zrací dělení (redukční), při němž se oocyt II. řádu opět rozdělí na dvě nestejně velké buňky. Buňka s velkým množstvím cytoplazmy je zralé vajíčko, buňka s nepatrným množstvím cytoplazmy je druhé pólóvé tělísko. Jádro vajíčka má již počet chromozómů redukovaný na polovinu (haploidní). Pólóvá tělíška vznikající při zracím dělení zanikají a označují se také jako abortivní vajíčka (Kudláč a Elečko, 1987).

Druhé zrací dělení probíhá zpravidla až po ovulaci ve vejcovodu a dokončuje se až po vniknutí spermie do oocytu II. řádu. V případě, že nedojde k vniknutí spermie do vajíčka, druhé zrací dělení se nedokončí a vajíčko zajde. V průběhu ovogeneze z jednoho oocytu I. řádu vzniká pouze jediné, oplození schopné vajíčko (Kudláč a Elečko, 1987).

3.1.3 Vejcovod

Ke každému vaječníku je trychtýřovitě přiložen rozšířený vejcovod, který má délku 5 až 10 cm a jeho průměr je 1 – 2 mm (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Vejcovody (*oviductus*) představují spojení mezi vaječníky a dělohou. Jsou to párové, tenké trubicovité útvary, uvnitř vystlané sliznicí z řasinkového cylindrického epitelu s četnými glandulárními buňkami a na povrchu jsou kryty serózou.

Svalová vrstva vejcovodu svými stahy a kmitáním řasinek epitelu posunuje vajíčka do dělohy (Kudláč a Elečko, 1987).

Svým břišním otvorem, který je nálevkovitě rozšířený ústí do pobřišnicové dutiny. Druhým otvorem ústí vejcovod do rohu děložního (Dostál a kol., 1997).

3.1.4 Děloha

Oba vejcovody ústí do děložních rohů, které se spojují do společného těla dělohy. Tělo dosahuje asi $\frac{1}{4}$ délky děložních rohů. Děloha je zakončena děložním krčkem, který směřuje k páteři a ústí do poměrně dlouhé pochvy. Velikost a hmotnost dělohy rostou během dospívání feny. Také se mění v průběhu pohlavního cyklu – největší je v době raného metestru (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Děloha (*uterus*) přijímá oplozená vajíčka a zabezpečuje jejich další vývoj. Je to dutý, svalový orgán, uložený z větší části v dutině břišní, z menší části v dutině pánevní a širokými děložními vazy upevněný ke stropu dutiny břišní a pánevní. Skládá se ze dvou děložních rohů (*cornua uteri*), děložního těla (*corpus uteri*) a děložního krčku (*cervix uteri*). Děložní krček je u zdravých zvířat uzavřen, otvírá se pouze v období říje, při porodu a krátkou dobu po porodu. Děložní stěna se skládá ze tří vrstev. Zevně je seróza, uprostřed svalová vrstva a uvnitř sliznice (Kudláč a Elečko, 1987).

Maximální váhy dosahuje děloha v období ranného diestru a pokud fena nezabřezla, její velikost se rychle zmenší v anestru (Olson et al., 1984).

Vlastní tělo dělohy je asi 2 – 3 cm dlouhé. Krček děložní je velmi krátký (cca 1 cm), tak, že vnitřní i vnější otvor splývají. Před vnitřním pánevním vchodem se děložní krček vnořuje do pochvy, který vyúsťuje ve stydké štěrbině poměrně nízko pod řitním otvorem (Dostál, 1997).

3.1.5 Pochva

Pochva je rozdělena na poševní předsíň a vlastní pochvu. Většina fen má jen málo vyvinutou panenskou blánu. Vnější zakončením pochvy je poševní vchod. Za fyziologických podmínek vynikají oba orgány velmi vysokou elasticitou, a to především v době říje a porodu (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Pochva (*vagina*), poševní předsíň (*vestibulum vaginae*) a vateň (*vulva*) jsou ústrojí kopulační. Vlastní pochva je silnostěnný trubicovitý orgán začínající jako límec na krčku děložním a přecházející v poševní předsíň. Sliznice pochvy je hladká, lesklá, vlhká, bledě růžové barvy. Je pokryta většinou vrstevnatým dlaždicovitým epitelem (Kudláč a Elečko, 1987).

3.1.6 Přežka

Zevní orgán – vateň (přežka) tvoří dva stydké pysky, spojené v dolním konci v ostrý výběžek (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Vateň je tvořena dvěma stydkými pysky, které mezi sebou svírají stydkou štěrbinu. Stydké pysky jsou u fen pokryty pigmentovanou kůží.

Prostor mezi řitním otvorem a zevními pohlavními orgány se nazývá hráz. Fena má tuto část poměrně dlouhou oproti ostatním zvířatům (Kudláč a Elečko, 1987).

3.1.7 Mléčná žláza

Fena obecně má pět párů mléčných žláz, které se nacházejí na spodní straně hrudníku a břicha. I pes – samec má vyvinuty mléčné žlázy, které mají stejnou anatomickou stavbu jako u feny. Existují i různé odchylky od počtu mléčných žláz. V každé mléčné žláze je 7 až 15 žlázových jednotek, tvořených mléčným parenchymem. Každá z nich má samostatný vývod na mléčné bradavce. V mléčné žláze se tvoří během prvních 24 – 48 hodin po porodu mlezivo (kolostrum) a po tomto období normální mléko (Kvapil a Kvapilová, 2007).

3.2 Fyziologie pohlavních orgánů feny

Pohlavní orgány jsou ovlivňovány neurohumorálně tzn. vzájemnou spoluprací nervového systému a žláz s vnitřní sekrecí. Důležitými hormony jsou estrogeny, progesteron, gonadotropiny, oxytocin, prolaktin (Duchková, 2008).

U fen jde jednak o dostatečnou sekreci hormonů podvěskem mozkovým, jednak o dosažení určitého stupně vývoje ovariálních folikulů ve vaječnicích a jejich vnímavost na uvolněné hormony podvěsku mozkového (Kvapil a Kvapilová, 2007).

K přijetí spermií, k oplození a vývoji plodu dochází ve vývodných pohlavních cestách, které jsou reprezentovány vejcovody, dělohou, pochvou a zevními pohlavními orgány (Kudláč a Elečko, 1987).

Tělesná teplota hárající feny se v období vrcholu říje snižuje o více než 1 °C (Procházka, 1994).

3.2.1 Vznik samičího pohlavního ústrojí a jeho funkce

Formování pohlavních orgánů začíná brzo po oplození. Pro vývoj pohlavního ústrojí je rozhodujícím momentem konstelace sex - chromozómů při oplození.

Gonády vznikají z pohlavní řasy (*plica genitalis*) na obou stranách dorzální břišní stěny, kam migrovaly velké primordiální zárodečné buňky ze svého původního místa v entodermu nebo mezodermu (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.2 Řízení pohlavní aktivity

Činnost pohlavního ústrojí je složitý biologický řetěz procesů paralelně probíhajících a v organismu na sebe úzce navazujících, které musí být přiměřené intenzity, navzájem vyrovnané a časově správně uspořádané (Kudláč a Elečko, 1987).

Prostřednictvím exterocepčních orgánů zaznamenává kůra velkého mozku ekologické vlivy a vznikající podráždění jsou vedena do hypotalamu. V předním pohlavním centru jsou podráždění přicházející přes limbický systém CNS spolu s interocepčními informacemi z jednotlivých orgánů shromažďována, uspořádávána a analyzována. Na tomto základě vznikající podráždění přecházejí ve smyslu biologických hodin do kaudálního pohlavního centra impulsy navozující ve specifických jádrech tvorbu neurosekretů, řídících vnitřně sekretorickou činnost adenohipofýzy (Kudláč a Elečko, 1987).

Vlivem FSH-RH přicházejícího do předního laloku prostřednictvím portálního cévního systému za spoluúčasti hormonu štítné žlázy je vyvolána v bazofilních buňkách adenohipofýzy tvorba FSH a vlivem LH - RH v nepatrné míře také tvorba luteinizačního hormonu, které jsou vyplavovány do krevního oběhu. Na ovariích dochází k růstu a zrání jednoho nebo více folikulů a v buňkách *theca interna* folikulu se vytváří hormon 17 beta - estradiol, který vyvolává řadu fyziologických vnitřních a vnějších změn, označovaných souborně pojmem říje (*estrus*) a umožňujících kopulaci. Po dosažení optimálního poměru mezi FSH a LH dochází k ovulaci. Ovulace nastává asi po 30 hodinách od dosažení nejvyšší hladiny LH (vrchol, LH peak). Na místě ovulovaného Graafova folikulu se ihned začíná vytvářet žluté tělísko a jeho luteinové buňky produkují progesteron. Nedojde-li k oplození vajíčka a nevytvářejí - li se v uteru změny vyvolávané vyvíjející se blastocystou (embryem), činnost žlutého tělíska je přerušena prostaglandinem F2 alfa a dochází k jeho regresi (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.3 Pohlavní cyklus

Šedesát pět % populace fen jsou diestrická zvířata. To znamená, že v průběhu roku mají dvě sezóny, ve kterých hárají vždy jen jedenkrát. Přibližně 26 % fen nejčastěji primitivních nebo přírodních plemen hárá jedenkrát do roka a asi jen 9 % fen především malých plemen hárá třikrát, ojediněle čtyřikrát ročně. Interval mezi jednotlivými háráními má individuální charakter a po celé období plodnosti si jej feny víceméně zachovávají konstantní. Většinou se pohybuje v rozmezí 22 až 47 týdnů (v průměru 31 týdnů) (Christiansen, 1984).

U některých malých plemen se hárání dostaví 3 – 4 x ročně, u některých jiných, zejména prošlechtěných plemen pouze 1 x za rok (Naxera, 1991).

Ztráta plodnosti a přechod do postreprodukční periody probíhá vesměs ve stáří 9 – 13 let (Doležel a Kudlác, 1997).

Říje se u fen opakuje přibližně v půlročních intervalech, nejčastěji na jaře a na podzim. U malých plemen však můžeme pozorovat i častější říji v odstupu cca čtyř měsíců a naopak u některých velmi přešlechtěných plemen nastupuje říje jen jednou do roka. Rovněž u nemocných a starých fen může docházet ke snižování frekvencí hárání (Jestřábová, 2004).

První hárání feny nelze očekávat u většiny plemen psů a nejrůznějších kříženců dříve než ve stáří 6 měsíců, ale obvykle proběhne do stáří jednoho roku. Uvádí se, že hodnota koeficientu iritability pro stáří feny při prvním hárání je velmi nízká ($h^2 = 0,08$). První hárání fen je značně ovlivněno podmínkami vnějšího prostředí, jako jsou výživa, ustájení feny, její zdravotní stav a podobně (Dostál, 2007).

Fena, ač není ještě fyzicky dozralá, může při první říji zabřeznout, což není stav žádoucí. Proto je vhodné připustit fenu až při některé z říjí dalších (Skalka, 1997).

Pohlavní dospělost feny, provázená anatomickým a sekretorickým rozvojem pohlavních orgánů feny, se projevuje vnějšími a vnitřními změnami, které se ve svém souboru nazývají říje nebo též hárání feny. Tyto změny jsou podmíněny složitým mechanismem působení hormonů hypofýzy, brzlíku a vaječnicků samých. Gonadotropní hormony hypofýzy vyvolávají u feny rozvoj ovariálního cyklu zpravidla dvakrát do roka; fena se tak řadí mezi diestrická zvířata (Procházka, 1989).

Pohlavní cyklus můžeme definovat jako koordinovaný sled změn na vaječnicích, pohlavních orgánech (děloha a pochva) a v chování, změn, které se objevují u všech savců, tedy i u psů. Zajišťují produkci a oplodnění samičích pohlavních buněk (vajíček) a nitroděložní vývoj plodů. Interval mezi jednotlivými háráními má individuální charakter a po celé období plodnosti si jej feny víceméně zachovávají konstantní. Většinou se pohybuje průměrně v rozmezí 24 týdnů. Meziříjový interval prodlužují feny ve věku nad 6 – 7 let,

po předchozí březosti (asi o 28 dní), feny v polodivokém způsobu chovu, izolované od kontaktu se psy, feny se špatnou tělesnou kondicí a feny celkově nemocné. Po 7. roku života se zvyšuje počet nepravidelných pohlavních cyklů, odúmrti plodů v březosti, spontánních potratů, počet ztížených porodů, frekvence výskytu anomálií u novorozených štěňat, snižuje se velikost vrhů a pravděpodobnost zabřeznutí (Kvapil a Kvapilová, 2007).

V první fázi hárání, proestru, dochází k růstu folikulů a produkci estrogenů. Tento fyziologický děj se odráží na zevních příznacích v podobě častějšího a slabého močení (značkování), častého olizování přesky (čištění), edematózního zduření přesky a především výtoku, který je většinou patrný teprve 3. – 5. den po začátku hárání, kdy dochází k jeho podstatnému zesílení a fena se již nestačí čistit. Do konce prvního týdne je výtok řídký, lakově červený. Poměrně silný výtok přetrvává asi do 9. – 14. Dne. V tuto dobu je fena pro psy nejatraktivnější. Sama začíná být neposlušná, utíká, vyhledává a láká psy (pachem, pohyby, pískáním), avšak krytí zatím stále odmítá (Láznička, 1992).

V druhé fázi hárání, estru, dochází při zrání folikulů k luteinizaci folikulárních buněk a produkci progesteronu, který v určitém poměru s estrogeny vyvolává výraznou změnu v zevních projevech hárání. Fena se stává svolnou ke krytí. V tuto dobu se mění i charakter výtoku – slábne, je hlenovitý a špinavě růžový. Teoreticky s touto změnou výtoku, tj. v první třetině estru (Günzel, a kol., 1985), dochází v průběhu 12 – 72 hodin k asynchronní ovulaci všech, obvykle 4 – 6 Graafových folikulů. Ovulovaná vajíčka jsou jen krátkodobě (24 – 36 hodin) schopna oplození (Wollbab, 1988) teprve po dvou až třídenním sestupu vejcovody, kdy v nich probíhá druhé zrací dělení (Evans and Anderton, 1990).

Proestrus má u fen rozpětí od 3 do 27 dní a estrus 3-21 dní (Tsutsui et al., 1973).

V průběhu pohlavního cyklu dochází na vaječnicích k růstu a zrání folikulů, k jejich ovulaci a ke vzniku a zániku žlutého tělíska. Probíhá ovariální cyklus. Ten lze rozdělit na období růstu a zrání folikulu, ovulaci, vznik a regrese žlutého tělíska (Kudláč a Elečko, 1987).

Bezprostředně po ovulaci vzniká na folikulu ze zřasených buněk granulózy žluté tělísko. Zralé žluté tělísko je kulovité nebo válcovité. Během svého vývoje mění barvu. Produkuje specifický hormon progesteron. Pokud nedojde k oplození, dochází k regresi žlutého tělíska. To způsobuje specifický hormon Prostaglandin F2 alfa. Změny probíhají i na vejcovodech a v děloze, které bývají překrvené. Děložní krček je otevřený a vytéká z něj hlen. Ke konci říje produkce hlenu rychle klesá. Pochva, poševní předsíň a vulva jsou překrvené, elasticke a teplé (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.3.1 Hormonální profil u fen

Nejvyšší koncentrace progesteronu je u fen v období brzkého či středního diestru a postupně se snižuje až k basálním hodnotám 51 až 82 den po LH peaku u fen, které nejsou březí a nebo u fen 24 až 48 hodin před porodem (Mellin et al., 1976).

Hladina progesteronu v průběhu diestru je u fen různá, pohybuje se v rozmezí 10 až 70 ng / ml (Masken, 1972).

Celková produkce CL je nižší u plemen s malými vrhy než u plemen s velkým počtem štěňat ve vrhu. Koncentrace prolaktinu (základní koncentrace < 2 ng / ml) je všeobecně nízká, stoupá na dvojnásobek až třínásobek více v období pozdního diestru. Poté opět klesá za 36 hodin po peaku a znovu stoupá jako reakce na štěňata, sající mléko (Fernandes et al., 1987).

Koncentrace estrogenů v plasmě byly u fen, které nebyly březí v diestru konstantní. Naopak zvýšené byly u březích fen během posledních tří týdnů v diestru. Koncentrace estradiolu byly nižší u březích fen a naopak vyšší i fen, které nebyly březí v počátku a uprostřed diestru (Hadley, 1975).

Koncentrace testosteronu se zvyšuje u fen během proestru a nejvyššího bodu pak dosahuje při vlně LH (Olson et al., 1984).

Hlavním estrogenem je 17 – beta estradiol, který se za březosti vytváří ve značném množství v placentě (Doležel a Kudlác, 1997).

Relaxin dosahuje své nejvyšší koncentrace (4 až 6 ng / ml) dva až tři týdny před porodem. Těsně před porodem se poněkud sníží a pak opět perzistuje 4 – 9 týdnů po porodu. Koncentrace LH stoupá u březích i nebřezích fen během pozdního diestru (Tsutsui and Stewart, 1991).

U březích fen je patrné zvýšení koncentrace prolaktinu v průběhu druhé poloviny březosti. Během laktace, jsou taktéž pozorovány vysoké koncentrace prolaktinu v plazmě (Kooistra and Okkens, 2001).

U fen byl pozorován významný a náhlý pokles koncentrací FSH přibližně v době porodu (den 65) a následně byly zjištěny i nižší koncentrace FSH během laktace ve srovnání s fenami, které nebyly březí (Onclin et al., 2001).

3.2.3.2 Ovulace

Ovulace je u fen spontánní, nevyžaduje stimulaci prostřednictvím páření. Stejně jako u jiných druhů, jsou ovulace stimulovány nárůstem LH, který se vyskytuje několik dní po té, co je dosaženo maximální koncentrace estrogenu. Zdá se, že pokles estrogenu a nárůst

progesteronu stimuluje nástup vlny LH, stejně jako nástup změn v sexuálním chování. Koncentrace progesteronu se zvyšuje několik hodin před nástupem vlny LH. Feny mají běžně mnohočetné ovulace a histologické a laparoskopické vyšetření ukazují, že ačkoliv většina ovulací nastala mezi 48 až 60 hodinou po nástupu vlny LH, některé folikuly ovulují až 96 hodin po nástupu vlny LH. Mezi fenami je tedy značný rozdíl v ovulacích. Některé ovulují 12 dní po nástupu proestru, jiné 5 až 25 den (England and Heimendahl, 2010).

3.2.3.3 Plodné období

Vrcholu fena dosahuje v průměru ve věku 2 let. Tato plodnost je obvykle udržována do věku 6 – 7 let. U starších fen se potom s věkem obvykle počet štěňat ve vrhu snižuje. Průměrný interval mezi jednotlivými říjemi je u fen zhruba 7 měsíců. Je rozdělen na období proestru (10 dní), vlastního estru (10 dní), luteální fáze (zahrnuje březost či nebřezost, 2 měsíce), a anestrus - zhruba 4,5 měsíce. Plodným obdobím je nazýváno období, kdy jsou oocyty schopny oplodnění. U fen toto období začíná 2 dny po ovulaci, maximálně je prodlouženo na 5 dní. Zajímavostí je, že pokud inseminujeme fenu na konci tohoto období, výsledkem je málopočetný vrh (England and Heimendahl, 2010).

3.2.3.4 Luteální fáze

Nárůst progesteronu začíná několik hodin před nebo během předovulační vlny LH a dále roste, až dosáhne hodnoty 10 – 25 ng / ml ke konci estru. Ačkoli je prostaglandin F (PGF) svým účinkem luteolytický, není běžně vylučován v normálním cyklu, kdy fena nezabřezne. V klinické praxi jsou využívány k ukončení březosti inhibitory prolactin (stejně jako cabergoline nebo bromocriptine) a prostaglandin, buď samostatně nebo v kombinaci. Taktéž jsou využívány k léčbě stavů, které mohou nastat v průběhu luteální fáze, např. pyometra. Koncentrace progesteronu ke konci luteální fáze klesá, jako důsledek produkce kortizolu plodem. To vede ke zvýšení hladiny enzymů, které přeměňují progesteron na estradiol. Stoupá koncentrace prostaglandinu F v plasmě (England and Heimendahl, 2010).

3.2.4 Hormony související s reprodukcí a jejich účinky

Hormony dělíme na primární, tj. hormony, které bezprostředně řídí pohlavní funkci. Jsou to hypotalamické neurohormony nebo gonadotropiny uvolňující hormony, hypofyzární a extrahypofyzární gonadotropiny a gonadální a placentární sexogeny. Naproti tomu sekundární

hormony jsou ostatní hormony, které jsou vytvářeny v těle a mají nepřímý vztah k pohlavním funkcím (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.4.1 Neurotransmitery

Jde o látky nehormonální povahy, které se vytvářejí v konečných částech axonu. Patří sem acetylcholin, noradrenalin, dopamin, serotonin a melatonin. Acetylcholin podněcuje sekreci uvolňujících hormonů pro FSH a LH a inhibuje uvolňování LTH. Noradrenalin a dopamin rovněž stimulují produkci obou gonadotropiny uvolňujících hormonů (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.4.2 Hypotalamové hormony – neurohormony

Jsou tvořeny v nervových buňkách a dělíme je na uvolňovací, inhibiční (tzv. liberiny a statiny, které řídí činnost adenohypofýzy GnRH, GnIH) a neurohypofyzární hormony. Mezi neurohypofyzární hormony, označované také jako hormony zadního laloku hypofýzy, patří oxytocin a vazopresin. Skutečným místem jejich tvorby je hypotalamus (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.4.3 Gonadotropní hormony

Gonadotropní aktivita je reprezentována třemi pohlavně nescifickými gonadotropními hormony. Patří sem folikuly stimulující hormon FSH, dále luteinizační hormon LH a nakonec luteotropní hormon LTH, zvaný též prolaktin (Kudláč a Elečko, 1987).

Fyziologickým účinkem FSH u samic je stimulace růstu a zrání folikulů v ovariích a u samců stimulace spermatogeneze v semenotvorných kanálcích varlete. Luteinizační hormon LH navazuje na účinek FSH a přivodí u samice dozrání a ovulaci folikulů. Společně s FSH vyvolává sekreci estrogenů v buňkách téky. Luteotropní hormon LTH je nutný k vyvolání a udržení laktace (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.4.4 Ovariální hormony

Samičí sexuální hormony vytvářené v průběhu pohlavního cyklu v ovariích samic jsou estrogény, progesteron, relaxin a nepatrné míře i androgeny.

Estrogény jsou vytvářeny v buňkách granulózy a *theca interna* zrajícího folikulu a dále v intersticiu vaječníku. Rozeznáváme 3 základní přirozené estrogény: 17 beta – estradiol, estron a estriol. Fyziologickým účinkem estrogenů je stimulace růstu vývodních pohlavních

cest, vytvoření sekundárních pohlavních znaků, růst a vývoj vývodného systému mléčné žlázy. Vyvolávají psychické příznaky říje a podmiňují morfologické funkční změny na vejcovodech, děloze a pochvě během cyklu (Kudláč a Elečko, 1987).

Progesteron představuje hlavní produkt luteální tkáně na vaječnicích. Za březosti je tvořen rovněž placentou. Je to biologicky aktivní steroid, jehož hlavní fyziologickou funkcí u samic je udržení gravidity. Svým účinkem ruší účinky estrogenů. Pohlavní orgány přecházejí do sekreční fáze, děložní krček se uzavírá, produkce cervikálního a vaginálního hlenu ustává, hlen přestává být tekutý a lesklý, výrazně se zahušťuje a nabývá lepkavé konzistence a matného vzhledu. Děložní žlázy naopak progesteron stimuluje k hojně sekreci hustého hlenu, představující první výživu pro embryo, tzv. děložní mléko. Stimuluje vývoj alveolární části mléčné žlázy a sekreci mléka. Pozitivně ovlivňuje formování mateřského pudu. Zlepšuje využití živin a podporuje anaboličné procesy doprovázené zvýšením apetitu a tělesné hmotnosti (Doležel a Kudláč, 1997).

Relaxin se tvoří především ke konci gravidity. Způsobuje uvolnění pánevní symfýzy, křížokyčelního kloubu, úplnou dilataci děložního krčku a podílí se tak na přípravě porodních cest k porodu. Spolu s estrogeny a progesteronem rovněž stimuluje růst mléčné žlázy. Je dalším biologicky aktivním produktem žlutého tělíska, polypeptid o molekulární hmotnosti 10 000 (Doležel a Kudláč, 1997).

3.2.4.5 Děložní prostaglandin F₂ alfa

Prostaglandiny jsou skupinou biologicky aktivních lipidů, zasahujících do průběhu mnoha reprodukčních procesů. Jsou označovány také jako tkáňové nebo místní hormony.

Prostaglandin F₂ alfa je tvořen v endometriu. Jeho nejdůležitější funkcí je schopnost ovlivnit morfologii a funkci žlutého tělíska, konkrétně navodit jeho rychlou regresi a zastavit produkci progesteronu (Kudláč a Elečko, 1987).

Ke konci pohlavního cyklu je žlutým tělískem rovněž v malé míře produkován oxytocin, kterému je přisuzován význam ve stimulaci produkce prostaglandinu F₂ alfa v děložní sliznici způsobující zpětně degeneraci a zánik žlutého tělíska (regrese, luteolýza) (Doležel a Kudláč, 1997).

Mechanismus účinku prostaglandinu F₂ alfa na luteální tkáň není dosud znám. Uvádí se možnost konstriktce utero – ovariálních cév a navození lokální ischémie zapříčínující „ hladovění „ luteální tkáně, dále možnost přímé inhibice tvorby progesteronu, konkurence o vazebná místa pro LH nebo destrukce LH receptorů (Doležel a Kudláč, 1997).

3.2.4.6 Ostatní hormony a jejich vztah k reprodukci

Somatotropní hormon STH kromě obecného účinku na celkový růst ovlivňuje i růst dělohy a nepřímo stimuluje tvorbu estrogenů.

Neméně významné jsou tyreotropní hormon TSH a adrenokortikotropní hormon ACTH, které řídí činnost štítné žlázy a nadledvin a také se podílejí na řízení látkového mechanismu.

Hormony štítné žlázy tyroxin a trijodotyronin ovlivňují látkový metabolismus a splňují požadavky pohlavních orgánů na energetické zdroje, zejména v průběhu březosti (Kudláč a Elečko, 1987).

3.2.5 Fáze pohlavního cyklu

3.2.5.1 Proestrus

Proestrus probíhá po dobu 8 – 13 dnů. Je to vlastně přípravné období na vlastní říji. Je charakterizováno psychickou změnou v chování feny, u které pozorujeme zvýšení jejího pohlavního pudu. V tomto období začínají dozrávat jednotlivé folikuly ve vaječnících. Z vnějších příznaků pozorujeme nápadné zduření přezky, ze které vytéká krvavý výtok, zvláště v okamžiku, kdy fena vstala. Fena v tomto období ještě není ke krytí svolná (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Zevní příznaky barvení v proestru úzce souvisí i se stavem poševní sliznice. Ta je oteklá a překrvená. Otevírat se začíná i děložní krček. V tomto období fena většinou psa nepřijme (Tichá, 2000).

Výsledkem folikulárního vývoje je výrazný vzestup koncentrace 17 beta estradiolu v periferní krvi, která se zvyšuje z 5 – 10 pg / ml na 50 – 120 pg / ml. Maximální sekrece estradiolu probíhá na konci proestru (Doležel a Kudláč, 1997).

Proestrus je charakteristický zvýšením 17 beta estradiolu. V této fázi je koncentrace progesteronu < 1 do 2 ng / ml (Plemister et al., 1973).

V pozdním proestru taktéž u fen stoupá koncentrace testosteronu. Není známo, zda právě zvýšená koncentrace testosteronu přispívá k vlastní říji nebo je jen důsledkem zvýšené biologické syntézy steroidních hormonů – steroidogeneze. Koncentrace LH zůstává v proestru na základních hodnotách. Vyrůstá pouze v ranném proestru a pozdním anestru. Hodnota hormonu FSH se během proestru snižuje. Prolaktin má vliv na ukončení anestru a zahájení proestru, ačkoli jeho koncentrace byla prokázána v celém proestru (De Coster et al., 1983).

Potlačení prolaktinu pomocí agonistů dopaminu (chemická sloučenina, která napodobuje činnost neurotransmiteru (dopaminu) v mozku a potlačuje vylučování hormonů prolaktinu) bromocriptinem v časném anestru může mít za následek předčasný nástup proestru (Haafte et al., 1989).

Je spojen se stimulací folikulárního vývoje FSH a LH a následné sekrece estrogenu z granulóznic buněk folikulu. V průměru roste na každém vaječnicku 2 – 8 folikulů. Ty vyčnívají na okraji vaječnicků zhruba 10 dní před ovulací, v průměru mají přibližně 4 mm. Folikuly průměrně rostou na 6 – 9 mm před předovulační vlnou LH. Folikulární estrogen podporuje zvýšené prokrvení a edém reprodukčního ústrojí, stejně jako zvýšenou aktivitu žláz epitelu. To vede k otoku vnitřního a vnějšího reprodukčního traktu. V tomto období se fena stává atraktivní pro psy, není však svolná k páření, má sklony se toulat a hodně značkuje. Dochází k značné proliferaci epitelových buněk vyvolané estrogenem a v pochvě se mění epitel z kvádrového na dlaždicovitý. Tato změna pravděpodobně chrání vaginu před traumatizací během krytí. Zvýšená koncentrace LH a FSH je rozhodující pro následný růst folikulů. Nicméně zrající folikuly produkují hormon inhibin, který naopak růst FSH brzdí, dále k růstu nedochází a naopak se může koncentrace FSH snižovat. Nicméně FSH hraje velmi důležitou roli při zrání folikulů a vybavuje buňky do následné přeměny ve žluté tělísko po ovulaci (England and Heimendahl, 2010).

Dynamika poševního obrazu během časného proestru je charakterizována pozvolným zvyšováním buněčných elementů, a to především epiteliálních buněk intermediálních, ojediněle parabazálních a superficiálních. Dále je pro něj typický povětšinou stabilně vysoký obsah erytrocytů a naopak pokles leukocytů. Ve fázi pozdního proestru se dále zvětšuje už jen množství superficiálních buněk. Ty postupně získávají vzhled acidofilních až bezjaderných buněk. Výskyt erytrocytů se stejně jako počet leukocytů snižuje a v nátěru mohou být nacházeny už jen ojediněle nebo mohou zcela chybět. Kromě toho v celém předříjovém období dochází i k podstatnému zvýšení počtu laktobacilů (Láznička, 1992).

Maximální koncentrace estrogenů je v období proestru, a to 1 až 2 dny před nástupem vlastního estru, a pak následuje jejich postupný pokles (Feldman et al., 1996).

3.2.5.2 Estrus

Stadium vlastní říje, kdy je fena svolná k páření. Průměrná doba říje je 9 dní, v rozmezí 4 – 24 dní (Bell et al., 1971).

V tomto období folikuly ve vaječnicích dozrávají, praskají a do nálevky vejcovodu se uvolňují ovocyty. Přežka feny je výrazně zduřelá, vytéká z ní krvavý výtok, který však

postupně dostává barvu červeného vína. Někdy se barva tohoto výtoku označuje jako lakově růžová. Tedy zhruba 9. – 13. dnů od počátku hárání. Právě nyní je ta nevhodnější doba pro krytí. Fena je pro krytí svolná a intenzivně také vyhledává psy. Ztrácí v té době svoji přirozenou poslušnost a respekt ke svému pánovi. U některých fen v souladu s odezněním otoku poševní sliznice se zklidňuje i přezka. Sekret u těchto fen bývá v této době bezbarvý. V jednom říjovém cyklu feny se vyvíjí a praská 4 – 6 folikulů, z nichž každý může obsahovat až 3 vajíčka. Toto je důvod, proč počet folikulů na vaječnicích neodpovídá počtu uvolněných vajíček a následně počtu štěňat. Ovulace u feny je déletrvajícím procesem, obvykle se udává, že trvá 12 – 72 hodin. K ovulaci nejčastěji dochází 2 dny před až 7 dní po zahájení estru. Obvykle k ovulaci dochází 1 – 3 dny po projevení prvního zájmu feny o psa. Počátek ovulace je rovněž ovlivněn věkem feny. Mladší feny ovulují dříve (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Koncentrace estradiolu klesá, naopak koncentrace progesteronu stoupá. Pokles koncentrace estradiolu tak ovlivňuje vlnu LH hormonu a vede tím k ovulaci. Přesné určení doby ovulace je těžké stanovit, ale může být odhadnuta na základě měření hladiny progesteronu a LH. Přesný čas nástupu vlny LH je taktéž těžké přesně stanovit, protože může proběhnout během jediného dne a vzorky se neměří denně, ale většinou s odstupem několika dní (Reimers et al., 1978).

V této fázi dochází k ovulaci a tedy i optimálnímu období ke krytí. Poševní sliznice bledne a osychá, je výrazně vyřasená, dalo by se říci, že je přímo „lepivá“. Příroda tak i ze strany feny zabezpečuje svázání. Fena je po všech stránkách připravená k úspěšnému krytí. Je třeba připomenout, že zde mohou být značné rozdíly. Např. feny českého teriéra bývají ke krytí 7. – 8. den, erdel teriérky 17. den a některá původnější plemena (karelský medvěd pes) až okolo 20. dne. Poslední informace uvádějí, že kvalitní ejakulát vydrží ve feně oplození schopný i 5 – 8 dní. Řada fen zvláště malých plemen zcela vynechává nebo má velmi málo výraznou fázi barvení (Tichá, 2000).

Luteinizaci folikulů doprovází mírné zvýšení koncentrace progesteronu v periferní krvi na 2 – 3 ng / ml a pokles koncentrace estradiolu. Dvacet čtyři hodin před ovulací z folikulu začíná balónkovitě prominovat tenká stěna (stigma). V tomto místě při ovulaci dochází k ruptuře. Po ovulaci má místo krvavý charakter. Po ovulaci hladiny progesteronu se dále postupně zvyšují. Hladiny od 5 ng / ml ukazují na proběhlou ovulaci (Doležel a Kudláč, 1997).

Obraz časného estru je provázen stále ještě výskytem velkých intermediárních buněk vedle již velkého množství acidofilních superficiálních buněk s jádrem. V malém počtu mohou být přítomny anukleární buňky, případně i erytrocyty. Leukocyty zde nejsou nalézány.

Ve vrcholu estru mají až 100 % dominanci acidofilní, převážně nukleární superficiální buňky (Christiansen, 1984).

V průběhu estru dosahují folikuly velikosti 9 – 12 mm v průměru. Spolu s nárůstem estrogenu je potlačena sekrece LH a FSH prostřednictvím negativní zpětné vazby estradiolu a inhibinu. Následně klesá koncentrace estrogenu a o den později začíná preovulační vlna LH. V tomto období vlivem estrogenu žena produkuje feromony a vypouští je prostřednictvím pohlavního traktu a moči. Feromony jsou detekovány čichovým nebo vomeronazálním orgánem a stimulují samce k reprodukční aktivitě. Zdá se, že feromony také vedou ke stimulaci centra GnRH (England and Heimendahl, 2010).

Tato fáze, označovaná jako maximální zralost poševního epitelu, souvisí se svolností žen k páření. Je tedy optimální dobou připouštění (inseminace). V době ovulace dosahují indexy povrchových buněk a oezinofilní 90 – 100 %, keratinizační okolo 80 % (Olson and Husted, 1986).

V pozdním estru, přibližně 6 dní po ovulaci (Evans a Anderton, 1990) dochází v poševním obraze k náhlému poklesu počtu superficiálních buněk v průběhu 1 – 2 dní (Hoslt, 1986).

Opět se začínají objevovat epiteliální buňky nižších vrstev a leukocyty. Náhlá změna poševního obrazu probíhá asi 3 dny před koncem tzv. psychického estru (Olson and Husted, 1986).

Leukocyty se nejčastěji objevují již 24 – 40 hodin po ovulaci (Wollrab, 1988).

Celou říjovou fází provází zvýšené množství laktobacilů (Láznička, 1992).

Hodnota progesteronu v době ovulace se pohybuje kolem 5 ng / ml, výtok se mění na slámový, přezka splaskává. Dozrávání vajíček cca 24 až 48 hodin po ovulaci (Přinosilová, 2013).

Tabulka č. 1 : Délka jednotlivých stádií říjového cyklu (Kvapil a Kvapilová, 2007)

Stádium cyklu	Průměrná doba trvání	Fyziologické rozpětí
Proestrus	9 dní	2 – 27 dní
Proestrus	9 dní	3 – 21 dní
Metestrus	90 dní	
Anestrus	135 dní	

3.2.5.3 Metestrus (diestrus)

Je období ukončení říje – hárání. Zevní příznaky se pomalu ztrácejí i výtok postupně ustává. Na místě uvolněných folikulů vznikají tzv. žlutá tělíska, která produkují hormony důležité k udržení březosti (Dostál, 1995).

Nástup diestru je pomocí vaginální cytologie definován úbytkem podílu povrchových buněk a naopak vzrůstem malých a středních parabazálních buněk, které jsou vidět na jednotlivých vaginálních stěrech. Stanovení diestru pomocí cytologie nastává asi 3 dny před koncem vlastní říje, 2 až 5 dní po dozrání oocytů, 5 až 7 dní po ovulaci a 8 až 9 dní po vlně LH (Holst et al., 1974).

Koncentrace progesteronu rychle stoupá na více než 1 až 2 ng / ml před a během ovulační vlny LH a pokračuje ve vzrůstu po celou dobu estru až dosáhne počátečního vrcholu (peak) na 15 až 90 ng / ml za 15 až 30 dní po vlně LH. Po dosažení vrcholu pomalu koncentrace progesteronu klesá po dobu 5 až 6 týdnů. V průběhu diestru je koncentrace progesteronu u březích, nebřezích a kastrovaných fen velmi podobná (Hoffmann et al., 1992).

V době březosti se koncentrace progesteronu stále udržuje a tím je březost udržována a nedochází k luteolýze. Pokles progesteronu na méně než 1 až 2 ng / ml vede k zahájení porodu či potratu (Concannon et al., 1977).

Nástup laktace u fen pak koreluje s poklesem progesteronu a naopak vzestupem prolaktinu. Koncentrace LH stoupá v pozdním diestru jak u březích tak u nebřezích fen. Na rozdíl od velmi podobné koncentrace progesteronu u březích a nebřezích fen je koncentrace relaxinu u těchto dvou skupin různá. U nebřezích fen se v diestru pohybuje pod méně než 0,25 ng / ml. Naopak u březích fen dosahuje > 3,0 ng / ml. Zatímco progesteron je původu ovariálního, relaxin je původu placentárního. Koncentrace testosteronu v průběhu diestru klesá (Tsutsui et al., 1991).

Konec říje má dvě možné varianty dalšího vývoje, tou první je, že po oplození vajíčka vzniká březost – gravidita, při které žluté tělísko přetrvává a oplozená vajíčka se uchycují na sliznici dělohy. Druhou variantou je, že při neoplození nastává diestrus, během kterého dochází ke vstřebání žlutého tělíska, děložní sliznice se uklidňuje a říje přechází do klidového období zvaného anestrus. (Procházka, 1989).

Na počátku této fáze převládají v poševním obrazu stále ještě superficiální buňky. Avšak jejich počet je již snížen o více jak 20 % z původního maxima. Dále poměrně rychle začínají přibývat buňky parabazální a hlavně malé intermediární. Jejich podíl se zvyšuje z počátečních 5 % na více než 10 %, často až na 50 % (Olson and Husted, 1986).

Z parabazálních buněk jsou pro metestrální nátěr typické tzv. pěnové a metestrální buňky (Christiansen, 1984).

V prvních deseti dnech metestru roste počet leukocytů, který poté opětovně klesá a po 20. dni jejich výskyt zcela mizí (Christiansen, 1984).

Progesteron v období diestru dále roste. Období diestru trvá zhruba 60 dnů, jako březost. Ke konci období pozvolný pokles progesteronu (Přinosilová, 2013).

3.2.5.4 Anestrus

Je to období sexuálního klidu. V tomto období dochází k regeneraci vnitřní výstelky dělohy, která je úplná v době od 120. do 150. dne od začátku estru. U fen, které nebyly březí, dochází k regeneraci dělohy asi o 20 dní dříve než u fen březích. Rozdíly v délce anestrus určují frekvenci hárání feny. Délka anestrus se obvykle pohybuje mezi 120 – 150 dny, nicméně krajní hodnoty jsou 65 – 300 dní. Normální meziestrální interval je 5 -10 měsíců (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Anestrus musí trvat minimálně 4 měsíce, aby se zregenerovalo endometrium dělohy. Progesteron je na bazálních hodnotách (Přinosilová, 2013).

V anestrus fena není pro psy přitažlivá a z hlediska reprodukce je organismus v klidu. Vulva je malá. Koncentrace LH stoupá v pozdním anestrus. Stoupá taktéž koncentrace FSH. Anestrus je charakterizován velmi často hodnotou progesteronu, která klesne na nižší hodnotu než je 1 až 2 ng / ml. Koncentrace estrogenu během anestrus je sporná. Koncentrace estradiolu kolísá a znovu stoupá během proestrus. Je zajímavé, že koncentrace LH a FSH je značně vyšší u kastrovaných fen (Olson et al., 1982).

Celou klidovou fází pohlavního cyklu provází typicky velmi malá přítomnost jakýchkoliv buněčných elementů. Ojedinelým nálezem jsou zde jen buňky parabazální, intermediární a leukocyty (Christiansen, 1984).

Pokud fena zabřezla, zahrnuje anestrus laktaci. Poševní stěna je tenká. Zhruba 60 dní před ovulací mohou být na vaječnicích detekovány folikuly. Vysoká hladina estrogenu je zaznamenána v pozdním anestrus, v průměru 10 – 20 dní před nástupem proestrus. Ačkoli je velmi málo informací o pozdním anestrus z hlediska endokrinologie, je zřejmé, že v tomto období hladina LH vzrůstá. Hladina FSH vzrůstá s menší intenzitou (England and Heimendahl, 2010).

3.3 Stanovení nejvhodnějšího termínu krytí

Vyšetření jsou pro stanovení doby úspěšného krytí velmi přesná. Například úspěšnost krytí a inseminací vedených pomocí poševní cytologie a progesteronového testu dosahuje až 95 % (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Tabulka č. 2 : Vhodnost posouzení jednotlivých chovatelských parametrů pro stanovení plodného období u fen (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Parametr	Plodné období
Chování feny: První projevy zájmu o psa První projevy svolnosti ke krytí Dávání ocasu na stranu Stupeň dávání ocasu na stranu	O 3 – 5 dní později O 2 – 3 dny později Žádný vztah Žádný vztah
Klinické nálezy: Objevení se krvavého výtoku Objevení se světlého (slámového) výtoku Stupeň zduření přezky Barva sliznice poševní	O 10 – 14 dní později O 2 – 3 dny později Žádný vztah Žádný vztah

3.3.1 Poševní cytologie a její využití

Spolehlivost poševní cytologie může u fen dosáhnout i více než 70 %. Poševní cytologie zpřesňuje posouzení úrovně hormonální aktivity vaječnicků a reakce pohlavních orgánů na tyto hormony. Princip poševní cytologie spočívá v reakci sliznice pochvy na hormony – estrogény, které jsou v maximální míře vylučovány právě během proestru. Mezi nesporné výhody této metody patří snadné provedení, šetrnost k vyšetřované ženě a možnost několikerého opakování. Nevýhodou této vyšetřovací metody je individuální reakce buněk poševní sliznice na hormony – estrogény a skutečnost, že na základě vyšetření poševní cytologie není možné přesně stanovit dobu ovulace (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Vaginální cytologií lze prokázat výrazné zvýšení výskytu neutrofilů v období diestru (Doležel a Kudláč, 1997).

Anamnesticky závažným důvodem k užití cytologického vyšetření jsou neúspěšná krytí v předcházejících cyklech. Nezřídka se jedná o pokusy krytí v nevhodnou dobu a to z neznalosti chovatele nebo způsobenou odchylkami v dynamice pohlavního cyklu, méně často atypickým sledem pohlavních reflexů.

Běžnou součástí klinického vyšetření je cytologie v situacích, kdy fena odmítá z nejrůznějších příčin krytí v průběhu celého hárání nebo z jiných příčin nedošlo

k přirozenému nakrytí a je tedy nutná odborná pomoc. Poševní cytologie může sloužit jako rychlá orientační kontrola správnosti chovatelem odhadnuté doby připuštění. Vzorek k tomuto účelu je vhodné odebrat a hodnotit před i po provedeném nakrytí. Neméně důležitou otázkou je v chovatelské praxi ekonomika chovu. To znamená, že zpřesnění doby připouštění může podstatně omezit četnost přejíždění velkých vzdáleností ke krycímu psovi nebo délku pobytu u něj (Láznička, 1992).

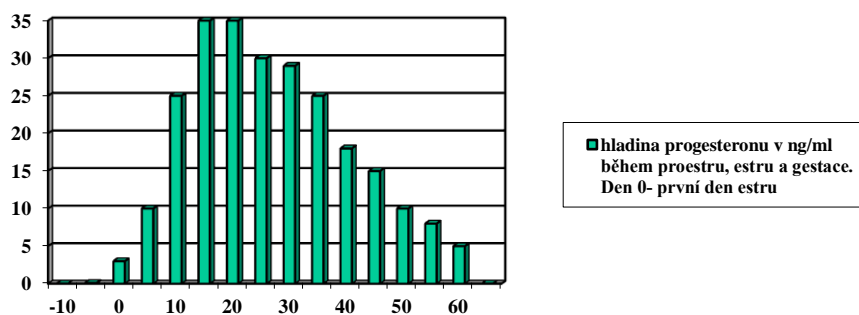
3.3.1.1 Určení vhodné doby připuštění (inseminace)

Cílem je stanovení přesného termínu ovulace vajíček u feny. Vyšetření jsou pro stanovení doby úspěšného krytí velmi přesná. Například úspěšnost krytí a inseminací vedených pomocí poševní cytologie a progesteronového testu dosahuje až 95 % (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Kombinace zvyšující se hladiny progesteronu a současný pokles koncentrace estrogenů vede k estrálnímu chování feny a svolnosti ke krytí. V tomto období začíná vlivem LH tvorba progesteronu, která je během anestru a během téměř celého proestru pod bazální hladinou 0,5 ng / ml. Preovulační vzestup hladiny LH (LH peak) trvá 1 - 2 dny a průměrně za 2-3 dny se dostavuje ovulace (Benneti et al., 2004).

Před zařazením fen do chovu je vhodné alespoň jednou retrospektivně zjistit přesný časový průběh pohlavního cyklu a teprve na jeho základě provést odhad nejhodnější doby připouštění. Tento by pak měl mít platnost pro všechna následující hárání, u nichž se předpokládá časová konstantnost. U mladých zvířat je nutné při stanovení cytologického závěru postupovat opatrně, jelikož mikroskopické změny zde mohou být méně výrazné. Také se nedoporučuje hodnotit první hárání, které není téměř u žádné feny časově a ani hormonálně plnohodnotné (Láznička, 1992).

Graf č. 1 : Hladina progesteronu během cyklu a gestace (BENETTI et al., 2004)



3.3.1.2 Stanovení pravděpodobnosti oplození při průkazu nežádoucího nakrytí

Z hlediska možných komplikací zdravotního stavu a plodnosti po užití abortiv, je žádoucí využít vyšetření obsahu poševního dna bezprostředně nebo do 24 hodin po domnělém nakrytí (Láznička, 1992).

3.3.2 Progesteronový test

Jedná se o metodu, která je nejpřesnější a nejspolehlivější. Pro stanovení přesné doby ovulace lze použít stanovení hladiny progesteronu. Progesteron je hormon, nezbytný pro udržení březosti. Hladina progesteronu se po ovulaci postupně zvyšuje ze své bazální hladiny. Je to jediná metoda, která je schopna s velmi vysokou pravděpodobností potvrdit ovulaci a nejlepší dobu pro krytí feny. V testu se využívá vysoce konstantní dynamiky růstu hladiny progesteronu. Tato dynamika umožnila stanovit několik úrovní progesteronové hladiny, které poukazují na konkrétní procesy, které se odehrávají v pohlavních cestách feny (Tabulka č. 3). Na základě získané hodnoty se stanovují další termíny případného odběru krve. Je – li hladina progesteronu kolem 5 ng / ml, je nejvhodnější doba ke krytí (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Tabulka č. 3 : Úrovně hladiny progesteronu a jim odpovídající změny v pohlavním aparátu feny (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Úroveň	Hladina progesteronu (ng/ml)	Stádium pohlavního cyklu
1	Do 1	Proestrus
2	Okolo 2,5	Časný estrus – do 2 dní proběhne ovulace
3	Okolo 5	Vrchol estru - ovulace
4	5 - 10	Vrchol estru – zrání vajíček
5	10 - 25	Vrchol estru – vajíčka jsou oplozeníschopná
6	Nad 25	Pozdní estrus

Koncentrace progesteronu u fen začíná vzrůstat 2 – 3 dny před ovulací. Koncentrace progesteronu je v době anestrus a z větší části proestrus menší než 1,0 ng / ml. Vzrůstá před vlnou LH a pak dále stoupá v estru na hodnotu 15 až 90 ng / ml od 15 do 30 dní po LH peaku. V době ovulace se hodnota progesteronu pohybuje mezi 4 až 10 ng / ml . Je až 95 % úspěšnost zabřeznutí, pokud dojde k přirozenému krytí feny v období 3 dny před a 4 dny po ovulaci. Šanci na úspěšné zabřeznutí zvýšíme, pokud ještě inseminujeme za další 2 dny po přirozeném krytí nebo za 2 dny po dosažení hodnoty progesteronu 4 až 10 ng / ml. Metody stanovování: RIA a ELISA (Hegstad et al., 1989).

Úspěšnost zabřezávání z krytí nebo inseminací vedených podle zjištěných koncentrací plazmatického progesteronu uvedenými testy se pohybuje do 90 %. Navíc se předpokládá, že takto provedený odhad doby ovulace je přesnější, než je tomu u vaginální cytologie a proto může zvýšit počet mláďat ve vrhu (Arbeiter et al., 1991).

Vaginální cytologie u fen je vhodná pro retrospektivní odhad dne ovulace, ale možnost předpovědi ovulace touto metodou je přinejmenším u určitého procenta případů pochybná (Holst and Phemister, 1975).

Obraz zjišťovaný cytologickým vyšetřením, je především výsledkem působení estrogenů. Samotná estrogenizace ještě ale neznamená, že u feny dojde skutečně k ovulaci (Wright, 1990).

Endokrinologický nález s největší vypovídací hodnotou se zřetelem k předpovědi ovulace je zvýšení koncentrace LH (Olson and Husted, 1986).

K tomuto tzv. peaku LH ($x 7,3 \pm 1,0$ ng / ml) dochází u většiny fen 48 hodin před ovulací a přetrvává přibližně 24 – 40 hodin (Concannon et al., 1977).

Dalším relativně konstantním endokrinologickým nálezem v období před ovulací u feny je vzestup hladiny progesteronu z bazálních hodnot ($x 0,4 \pm 0,1$ ng / ml). Tento vzestup je přímo vyvolán působením peaku LH. Stanovením koncentrace progesteronu lze tedy nepřímo určit, zda již nastal vzestup hladiny LH, a nebo zpětně odhadnout, kdy ke zvýšení hladiny LH došlo. Nejvhodnější doba pro krytí feny je 4 až 5 dní po peaku LH (Wollrab, 1988).

V tomto období se všeobecně uvádí, že koncentrace progesteronu vyšší než 5 ng / ml (16,04 nmol / l) svědčí o proběhlé ovulaci. Stanovení progesteronu z krevní plazmy nebo séra lze provést v klinické praxi rychlými testy na principu enzymoimunoanalýzy – OVUCHECK, TARGET. U soupravy OVUCHECK je určitá nevýhoda v tom, že substrát je nutno připravit pro všech 12 vyšetření najednou a expirace již připraveného substrátu je kratší než uvedených 12 měsíců u zbytku reagensů. U soupravy TARGET se substrát připravuje zvlášť před každým stanovením. Pro stanovení progesteronu těmito typy testů není třeba žádné speciální laboratorní vybavení ani zkušenosti. Výsledek je znám do několika minut. V interpretaci progesteronového testu je také možné provést chyby, neboť u části fen je období, v němž je koncentrace progesteronu v rozmezí od 4 do 10 ng / ml (12,83 – 32,08 nmol / l), poměrně dlouhé (2,5 – 5,5 dne). Při interpretaci výsledků jednorázového vyšetření tedy může dojít k mylnému odhadu doby peaku LH (Wollrab, 1988).

Po vyhodnocení 238 klinických pacientů, kterým byla odebírána krev za účelem zjištění optimálního data krytí, bylo potvrzeno, že znalost říjové koncentrace progesteronu v séru žen umožňuje významné zpřesnění určení data porodu (Vitásek a kol., 2011).

Příznivější je situace při monitorování dynamiky progesteronu v alespoň dvou vzorcích. Logaritmus koncentrace progesteronu je totiž v lineární závislosti na čase a potřebné informace o optimální době pro krytí lze zjistit extrapolací. I při tomto postupu se však vyskytují ojedinělé případy, kdy dynamika progesteronu vykazuje nestandardní průběh (Vacek, 1987).

Tabulka č. 4 : Interpretace nálezu a určení termínu krytí u žen v závislosti na koncentraci progesteronu (Vitásek a kol., 2001).

Progesteron	Fáze pohlavního cyklu	Doporučený termín krytí
pod 2 ng / ml	proestrus	nutné opakované vyšetření za 3 - 5 dní
2 – 3 ng / ml	den LH peaku	opakované vyšetření nebo krytí za 3 - 4 dny
3,1 – 4,5 ng / ml	období po LH peaku	kryt za 2 - 3 dny
4,6 – 8 ng / ml	období po ovulaci	kryt za 1 - 2 dny
8,1 – 16 ng / ml	ukončení fertilního období	kryt ihned

Tabulka č. 5 : Celková úspěšnost zabřezávání žen po krytích termínovaných podle koncentrace progesteronu (Vitásek a kol., 2001).

Rok	Vyšetřených žen	Březi	%	Jalové	%
1998	42	30	71	12	29
1999	78	63	80	15	19
Celkem	120	93	77,5	27	22,5

Tabulka č. 6 : Individuální úspěšnost zabřeznutí fen po krytích termínovaných podle koncentrace progesteronu (vybrané případy) (Vitásek a kol., 2001).

Plemeno	Stáří (rok)	Den hárání	Progesteron (ng/ml)	Krytí za dny	Březost	Poznámka
bulteriér	2,5	18	7,4	ihned	ano	
argentinská doga	3	9	9,3	ihned	ano	
azavak	3	12	18	ihned	ano	umělá inseminace
yorkshire	1,5	10	10,53	ihned	ano	
briard	5,5	13	15,7	ihned	ano	
dobrman	3	15	16,4	ihned	ano	
kern teriér	4	7	11,92	ihned	ano	umělá inseminace
labrador	2	15	6,3	1	ano	
kolie	4	10	5,53	1	ano	
bulteriér	2,5	17	7,4	1	ano	
jezevčík	3	12	5,1	1	ano	umělá inseminace
beagel	4	14	4,5	2	ano	
pudl	3	10	3,8	3	ano	
shi - tzu	4	13	2,8	3	ano	
italský chrtík	7	4	2,9	3	ano	
výmarský ohař	2	10	2,1	4	ano	
buldog	3	11	4,9	1	ne	

erdel teriér	3,5	16	12,9	ihned	ne	zjištěn
(stejná fena)	4,5	13	4,5	2	ne	herpes virus
bulteriér	3	20	5,4	1	ne	
německý ovčák	4	15	4,6	2	ne	agresivní fena
čivava	2	11	5,3	1	ne	aspermatický pes
rotwailer	5	20	4,88	2	ne	opakovaně nezabřezla
výmarský ohař	3	11	3,9	3	ne	obtížné krytí
buldog	1,5	5; 10; 14; 18	0,2; 0,25; 0,4; 0,35	-	-	anovulační cyklus

3.3.3 Sonografické vyšetření u fen

Sonografie je indikována k vyšetření vlastního pohlavního ústrojí, k diagnostice gravidity a ke kontrole životnosti plodů v průběhu ztíženého porodu.

Pro sonografická vyšetření pohlavních orgánů feny je základní vhodná sonda s frekvencí 5 MHz, přičemž u malých plemen psů lze s výhodou používat sondu s vyšší frekvencí 7,5 MHz, zvláště při diagnostice velmi raných stadií gravidity nebo cyklických změn na ovariích (Grygar a Kudláč, 1997).

3.3.3.1 Sonografická diagnostika březosti u fen

První sonograficky zjistitelné symptomy březosti můžeme pozorovat již od 16. -18. dne od prvního krytí feny (den 0). V současné době se jeví jako relativně nejpresnější pro studium gravidity u feny se zřetelem na dobu jejího trvání a zejména možnosti jejího prvního zjištění určení LH peaku. Bylo zjištěno, že gestační váček (choriová dutina) může být viditelný již 17. den po peaku luteinizačního hormonu. V době prvního zjištění je obvykle na několika místech viditelná malá luminizace dělohy anechogenní tekutinou embryonálních váčků. V kontrastu s anechogenní dutinou je pozorovatelná asi 2 – 3 mm silná stěna rohu děložního. Mezi 20. – 25. dnem březosti se stávají příznaky již zřetelnější.

Vzhledem k tomu, že embryonální váčky u feny mají v tomto stadiu většinou citrónovitý tvar, uvidíme je při příčném zobrazení rohu děložního jako okrouhlé a při podélném zobrazení spíše jako oválné struktury růžencovitě dilatující dutinu děložní. Kolem 20. dne měří embryonální váčky asi 1 cm, kolem 25. dne dosahují velikosti 1,5 – 2 cm v průměru. Děložní stěna se stává zřetelnější (Čech, 1974).

Vzhledem k možné relativně velké variabilitě mezi dobou krytí, případně inseminace a oplozením mohou vznikat při určení doby od páření k sonografickému vyšetření značné rozdíly v pokročilosti vývoje konceptu, spočívající zejména v rozdílné skutečné délce gravidity a tím i možnosti jeho sonografického průkazu. To je také příčinou rozdílných údajů o prvním možném zjištění březosti sonograficky. Fyziologicky je možná variabilita mezi dobou krytí a oplozením podmíněna zejména značně nekonstantní dobou nástupu svolnosti k páření vzhledem k ovulaci, dále tím, že při asynchronně probíhající ovulaci (do 12, případně až 72 hodin) uvolněné oocyty I. řádu se přeměňují na fertilní oocyty II. řádu nejdříve za 2 dny a schopnost oplození si udržují asi 2 – 3 dny (Fiala, 1986).

Nezvykle dlouhou fertilizační schopnost si v optimálních podmínkách pohlavního aparátu fen udržují spermie psa (do 4., respektive 7., maximálně snad až do 10. dne po ejakulaci). Vzhledem k uvedeným skutečnostem a na základě dlouhodobých praktických zkušeností jsme toho názoru, že spolehlivé vyšetření feny na březost je možné až od 25. dne po posledním krytí nebo inseminaci (den 0). I když pozitivní průkaz březosti je mnohdy možný již po 20. dni, v případě negativního výsledku do 25. dne od posledního krytí je nezbytné opakované vyšetření. Vzhledem k relativně krátké graviditě u feny může i jeden den znamenat zásadní změnu ve výsledku vyšetření. Zvláště obezřetní musíme být u fen krytých relativně brzy (např. 9. den), u kterých nebylo provedeno stanovení doby vrcholu říje pomocí vaginální cytologie, respektive přesněji progesteronovým testem (stanovení LH peaku). Právě tyto feny mohou za určitých podmínek koncipovat o několik dní později, takže skutečná doba březosti může být kratší, než uvádí majitel (Láznička, 1994).

Od 25. dne lze u embrya, které je dlouhé zhruba 1 cm zjistit srdeční pulzaci a zobrazit membrány žloutkového vajíčka. Od 28. dne již lze rozeznat pohyby embrya. Od 30. dne je možné rozlišit hlavu a trup embrya (Günzel et al., 1983).

Po 35. dnu trvání březosti se rozšíření děložních rohů stává rovnoměrným po celé délce a děloha získává válcovitý vzhled. Kolem 40. dne již lze dobře identifikovat vnitřní orgány plodu (srdce, žaludek, močový měchýř, játra) (Bondestam et al., 1983).

Po 40. dni březosti pak lze detekovat u plodů pokročilou osifikaci kostí. Dobře se zobrazí lebka, žebra, obratle a kosti končetin.

Počet štěňat lze nejlépe odhadnout mezi 25. – 35. dnem březosti. Později se již plody překrývají a splývají (Shille et al., 1985).

Přesný počet štěňat lze dobře spočítat sonograficky pouze u malého vrhu (Bondestam et al., 1984).

3.3.3.2 Sonografická diagnostika patologických stavů v průběhu gravidity

Sonografií můžeme pozorovat odumření jednoho či více embryí, později plodů (Taverne et al., 1985).

U feny je možná resorpce embrya nebo plodu až do 42. dne březosti, potom dochází k mumifikaci, maceraci nebo k abortu. Embryonální odumření u feny je častější během první poloviny březosti. Sonografickými studiemi bylo zjištěno, že spontánní resorpce embrya nebo plodu se před 40. dnem březosti feny vyskytuje od 5 do 13 %.

Při výskytu smrti plodu v posledním trimestru březosti je pravděpodobnější, že březost skončí abortem všech plodů než resorpcí jednoho, respektive více konceptů, jak tomu bývá během první poloviny gestace.

Sonografie nám umožňuje určit polohu plodu vstupujícího do porodních cest, sledovat srdeční činnost plodů (fyziologické hodnoty fetálního pulzu jsou přes 200 pulzů za minutu) a stěžejní postavení má sonografie u fen při diagnostice ukončení porodu (Grygar a Kudláč, 1997).

3.3.3.3 Význam diagnostiky březosti u fen

Diagnostika březosti je důležitá nejen pro majitele fen. U zvířat se sníženou plodností nebo sterilitou by měla být březost zjištěna co nejdříve a potom dále u březích fen opakovaně v intervalu 1 – 2 týdnů. Jen tak lze totiž určit, je-li zvíře schopno zabřeznout nebo došlo - li k resorpci, případně abortu (Grygar a Kudláč, 1997).

3.3.4 LH test

Stanovení období vlny LH je pomocným ukazatelem stanovení ovulace, dozrávání oocytů a oplodnění. Ovulace obvykle nastává 2 až 3 dny po vlně LH a zrání oocytů a oplodnění 4 až 6 dní po LH vlně. Na rozdíl od progesteronu, který stoupá v období estru, vlna LH se zvyšuje pouze 24 hodin (Madej et al., 1989).

3.3.5 Vaginoskopie

Vaginoskopie je jedna ze základních metod monitorování pohlavního cyklu u fen. Principem je optické posouzení poševní sliznice. Poševní sliznice se v průběhu pohlavního cyklu mění. Vzhled sliznice nám potom umožňuje učinit si představu o fázi pohlavního cyklu, poněvadž v důsledku hormonálních změn dochází i k charakteristickým změnám slizničních řas pochvy. Vlastní diagnostická hodnota této metody je ale pro určení fáze maximální plodnosti feny velmi malá. Proto se vaginoskopie používá spíše ke zrakové kontrole místa odběru vzorku pro cytologické vyšetření poševní sliznice

Vyšetření se provádí zavedením spekula nebo endoskopu do pochvy feny a zrakem se posoudí změny na sliznici pochvy (Kvapil a Kvapilová, 2007).

3.4 Inseminace

V některé literatuře se setkáváme s pojmem „ umělá inseminace“. Inseminace není přirozený způsob rozmnožování, a tak již výraz inseminace sám o sobě napovídá, že jde o způsob nepřirozeného (umělého) osemeňování (Dostál, 1995).

Do pohlavního ústrojí samice se vpravuje semeno, ne jenom spermie. Spermie jsou pouze jednou, i když tou nejdůležitější součástí semene. Současně se spermiemi je vpravována do pohlavního ústrojí samice semenná plazma a pokud bylo semeno zředěno a konzervováno, tak jde ještě o součásti ředidla a konzervačních látek (Sova, 1978).

Správně provedená umělá inseminace přináší stejné výsledky jako krytí feny obvyklým způsobem. Následná březost a porod mají stejný charakter a ani životaschopnost štěnat není inseminací nijak snížena. Umělou inseminaci může provést jen veterinární lékař (Allan and Blogg, 1999).

Množství spermií je potřeba menší, čím je jejich deponování blíže místu oplodnění. Objem ID záleží na místě deponování semene (ideálně vagina 2 až 5 ml, děloha maximálně 2 ml, vejcovod 0,02 ml). Inseminační dávka pro intrauterinní inseminaci (minimálně 100 milionů morfologicky normálních a po rozmrazení motilních spermií) pro vaginální umělou inseminaci je minimum 200 milionů normálních a motilních spermií (Přinosilová, 2013).

3.4.1 Historie a vývoj umělé inseminace

První zprávy o umělé inseminaci pocházejí ze 14. století. Z tohoto období se traduje zatím neověřená legenda o úspěchu arabského náčelníka, kterému se podařilo v roce 1332 získat semeno do chomáče chlupů z pochvy kobyly, která byla kryta přirozeně cenným hřebcem. Takto získané sperma vložil do kobyly, která byla v říji (Gamčík et al., 1976).

Cenným přínosem pro objasnění procesu oplodnění byl první světelný mikroskop, který zhotovil v roce 1677 Leeuwenhoek. Jeho žák Ham z Leidenu poprvé pozoroval mikroskopicky spermie, které považoval za původce vzniku nového jedince. Až o dvě století později se ale po dlouhých sporech vysvětlila účast spermií na oplození vajíčka. V tomto období se prosazovala teorie, že plod je semeno, které vyrůstá v pochvě a sperma vnáší do vajíčka jakési semenné zvířátko, které vyvolá vývoj plodu (Gamčík et al., 1976).

V letech 1780 – 1785 se italský fyziolog Lazzaro Spallanzani po pokusech se žabími vajíčky rozhodl vyzkoušet umělou inseminaci u psů. V roce 1784 postupoval tak, že fenu zavřel v izolované místnosti. Když se u ní po 20 dnech objevily příznaky říje, vpravil do její dělohy semeno pomocí upravené stříkačky, které mělo teplotu těla. Po 60 dnech fena vrhla 3 štěňata. Podobala se oběma rodičům. Na základě uvedených pokusů shrnul své poznatky, které byly pro tuto dobu velmi cenné a popsal tak první inseminaci. Na oplození se zúčastňuje i samec, k oplození jsou nutné zcela zralé samčí i samičí pohlavní buňky, sperma lze naředit aniž by ztrácelo schopnost oplození, spermie v ejakulátu jsou příčinou oplození (Gamčík et al., 1976).

I přesto, že to bylo právě u psů, kdy byla použita inseminace nejdříve ze všech druhů zvířat, první štěňata po inseminaci mrazeným semenem popsal až Seager v roce 1969. Nej kvalitnější semeno dávají psi ve stáří přibližně 3 – 6 let, ale jsou i jedinci, kteří dali kvalitní a mrazitelné semeno ve stáří 13 let. Prokázaná plodnost psa po přirozeném krytí ještě není zárukou úspěšné konzervace semene zmrazováním (Dostál, 2007).

Další větší zájem o umělou inseminaci v Evropě a Americe se objevil až koncem 19. století. Zkoušel se inseminovat dobytek, koně a samozřejmě další feny. Z pokusů se vytvořily závěry, že umělou inseminací lze řešit poruchy plodnosti a jeden ejakulát lze použít pro více samic. Snahy o využití umělé inseminace v medicíně při tlumení sterility žen se neuplatnily, protože umělou inseminaci naprosto odsoudila církev a zakázala ji jako nemravnou činnost. Tyto církevní zásahy ovlivnily a zpomalily i další pokusy na zvířatech. Úspěšné výsledky četných pokusů s umělou inseminací hospodářských zvířat dokázaly, že tento způsob rozmnožování lze použít v široké chovatelské praxi (Gamčík et al., 1976).

3.4.2 Umělá inseminace v Čechách

Po skončení II. Světové války se začala rozmáhat inseminace koní, díky které se podařilo zlikvidovat hřebčí nákazu. Zavedením umělé inseminace dobytka se prakticky zlikvidovala trichomonádová nákaza a výskyt některých dalších pohlavních chorob (Gamčík et al., 1976).

3.4.3 Význam umělé inseminace

Umělá inseminace je velmi účinný rozmnožovací postup, který spočívá na vědeckých poznatcích biologie a fyziologie reprodukce. Při umělé inseminaci, která nahrazuje přirozené oplodnění se semeno přenese pomocí speciálně upravených nástrojů do pohlavních orgánů samice na určité místo, které je nejpříznivější pro nastávající proces oplození.

Dle termínu umělá inseminace je možné se mylně domnívat, že jde o cosi umělé, nebiologické a nepřirozené. Ve skutečnosti jde ale jen o umělý přenos semene pomocí vhodně upravených inseminačních pomůcek. Jde o zavedení ejakulátu (nikoli přímo o oplození) s určitým počtem spermií, potřebných k oplození do pohlavního traktu feny, na vhodné místo a ve vhodnou dobu, kde čeká samičí pohlavní buňka – vajíčko na oplození. Umělá inseminace je rozmnožovací postup, který slouží k rozmnožování zvířat v úplné shodě s přirozenými zákony. Má význam po plemenářské i zdravotní stránce. Zvyšuje užitkovost zvířat a dosahuje velkého počtu potomstva a to dokonalým využitím vynikajících plemeníků v krátké době. Pravidelně se na inseminačních stanicích kontroluje zdravotní stav pohlavních orgánů samců. Díky inseminaci se zcela zabrání přenosu pohlavních chorob (Gamčík et al., 1976).

Výhodami používání konzervovaného semene v plemenitbě jsou možnosti uchovat fertilizační schopnost spermií po delší dobu (chlazené vs mrazené semeno), zamrazené semeno lze skladovat neomezeně dlouho a použít i po smrti dárce, snížení rizika transferu pohlavně přenosných nemocí, možnost získat genetický materiál samců z celého světa bez nutnosti přepravy zvířat, deponování semene o zkontrolované kvalitě spermií, možnost získat z jednoho odběru semene více inseminačních dávek, možnost inseminace zvířat, která by se ze zdravotních důvodů nemohla reprodukovat (fyzické či psychické), semeno lze získat i z několik hodin mrtvého zvířete (Přinosilová, 2013).

3.4.4 Umělá inseminace feny

Metoda umělé inseminace je v zásadě použitelná jen v těch případech, kdy jak pes tak i fena jsou plodní. Rozlišujeme inseminaci intravaginální (vpravení semene do vaginy) , intracervikální (vpravení semene do oblasti děložního krčku) a intrauterinní (vpravení semene přímo do dělohy).

Nejčastějším důvodem umělé inseminace pro nemožné uskutečnění přirozeného páření je averze feny vůči vybranému psu. V menším počtu případů fena (zpravidla prvnička) odmítá psy vůbec. Inseminační úkon je vyžadován také při nestejném věku partnerů a při defektech na zevních pohlavních orgánech feny (zúžení vulvy). V posledně jmenovaném případě však uvedená vada může mít za následek komplikace při porodu, a proto je na

uváženou, zda má být fena vůbec zařazena do plemnitby. Je však nutno přesně rozlišit, jde - li o úzkou vulvu nebo o předčasné ztopoření pyje u psa, následkem čehož při normálně vyvinuté vulvě není možné zavedení pyje do pochvy. Důvodem pro odběr semena a umělou inseminaci může být i poranění zadních končetin psa, který pak není schopen normálně krýt, stejně jako při výskytu zlomení kosti pyjové. Konečně může jí u psa o snížení libida následkem častého využívání, nebo při pokusu o krytí v nezvyklém prostředí a mnohdy po dlouhé přepravě psa, popřípadě se vyskytuje snížení libida jako forma subfertility podmíněná geneticky (Gamčík et al., 1976).

Intrauterinní inseminace je metodou volby při použití mraženého ejakulátu, použití této metody při inseminaci chlazeným, či nativním ejakulátem taktéž zvyšuje šance na zabřeznutí (zejména pokud není kvalita ejakulátu dobrá) (Wilson et al., 2003).

Indikací pro využití intrauterinní inseminace je celá řada a mezi nejvýznamnější z nich patří: neschopnost přirozeného krytí (úrazy, ortopedická onemocnění, výrazné velikostní rozdíly psa a feny, poševní striktury, odmítání krytí), vzdálenost (eliminuje se tak nutnost cestovat s fenou na dlouhé vzdálenosti), čas (ejakulát lze uchovat do doby, kdy je krytí vhodné, při mražení i několik let) (Payan-Carreira et al., 2011).

Donedávna byla intrauterinní inseminace prováděna invazivní – chirurgickou cestou (Wilson et al., 2003).

Tento zákrok však vyžaduje celkovou anestezii inseminované feny a provedení laparotomie či laparoskopie, což snižuje možnost reinseminace. Vzhledem k invazivitě zákroku je rovněž diskutabilní jeho etičnost vzhledem k welfare inseminovaných fen (Payan-Carreira et al., 2011).

Až na počátku 70. let 19. století v Norsku Fougner a kol. vyvinul techniku transcervikální intrauterinní inseminace u kožešinových lišek. Jak se později ukázalo, je tato technika použitelná i u fen. Technika je kombinací transabdominální palpce děložního krčku a použití speciálního rigidního katetru (Norský / Skandinávský katetr). Tato skandinávská technika vyžaduje značné zkušenosti a zručnost lékaře a u velkých a obřích plemen, případně obézních, je velmi obtížně proveditelná (Payan-Carreira et al., 2011).

Endoskopicky asistovaná transcervikální inseminace byla vyvinuta jako alternativa k použití Norského / Skandinávského katetru. Nesporným kladem této metody je, že jak veterinář, tak i klient mohou sledovat průběh inseminace a semeno je s určitostí deponováno až za děložní krček. Pro tuto metodu je nevhodnější použití rigidního endoskopu a plastového nespermicidního katetru (Wilson et al., 2001).

Před zamýšlenou intrauterinní inseminací je vhodné (při použití mraženého ejakulátu dokonce nutné) stanovit fázi pohlavního cyklu a určit optimální dobu k jejímu provedení. Nejpresnější a zároveň relativně dostupnou metodou k určení času LH píku, a tím i odhadu času ovulace je stanovení sérového progesteronu. V době LH píku je hodnota sérového progesteronu $2,56 \pm 0,30$ ng / ml a v době ovulace, to znamená 48 hodin po LH píku, $5,44$ ng / ml (Concannon et al., 1977).

Pro další upřesnění času ovulace je možné hormonální vyšetření doplnit o ultrasonografii vaječnicků (Lévy et al., 2007).

Velkou výhodou endoskopicky asistované transcervikální intrauterinní inseminace je její neinvazivnost. Díky tomu je možná opakovaná inseminace feny v průběhu jednoho cyklu, což je vhodné zvláště v případech, kdy se používá mražený ejakulát.

Dále lze u převážné většiny fen tento zákrok provést bez jakékoliv anestezie, či sedace. Určitý neklid při inseminaci byl v ojedinělých případech pozorován u fen malých plemen. Hlavní nevýhodou tohoto postupu je nutnost mít k dispozici velmi drahé vybavení (Payan - Carreira et al., 2011).

Inseminace mraženým semenem ideálně při progesteronu 15 ng / ml (± 2 až 4 ng), což odpovídá konci 2. dne nebo začátkem 3. dne po ovulaci - vzestupu progesteronu k 5 ng / ml. Přežitelnost spermií v pohlavním traktu feny je u nativního semene 2 až 6 dnů, u chlazeného 1 až 3 dny a u mraženého 12 až 24 hodin (Přinosilová, 2013).

Tabulka č. 7 : Úspěšnost endoskopicky asistovaných transcervikálních intrauterinních inseminací u jednotlivých fen, počty narozených štěňat, typ a orientační kvalita ejakulátu a hodnoty sérového progesteronu den před inseminací (P – 1) a v den inseminace (P 0) (Vitásek a kol., 2012).

	Plemeno	P – 1 (ng/ml)	P 0 (ng/ml)	Typ ejakulátu	Kvalita ejakulátu	Gravidita	Počet štěňat
1	Bordeaux. doga	4,4		chlazený	Norma	Ano	3
2	Bordeaux. doga	11,7		chlazený	Norma	Ano	1
3	Anglický buldok	5,7		Chlazený	20 % mot., velmi hustý	Ne	
4	Pudl velký	5,7		Chlazený	50 % mot., zmrzlý	Ne	

5	Boer boer	7,3		Chlazený	Norma	Ano	7
6	Labr. Retr.	5,2		Chlazený	Norma	Ano	4
7	Louisian. LP		21,3	Mražený	20 % mot.	Ano	4
8	Beagle		18,1	Mražený	Norma	Ano	2
9	RR		22,3	Mražený	Norma	Ne	
10	RR		14,2	Mražený	Norma	Ne	
11	Aljaš. malamut		9,1	Mražený	Norma	Ano	5
12	Bordeaux. dog		15,8	Mražený		Ne	
13	Zlatý retriever	4,4		Nativní	Norma	Ano	8
14	Bordeaux. dog	5,6		Nativní	Norma	Ne	
15	Bordeaux. dog	7,1		Nativní	Norma	Ano	7
16	Bordeaux. dog	5,4		Nativní	Norma	Ano	3
17	Bordeaux. dog	5,0		Nativní	Norma	Ano	5
18	Bordeaux. dog	7,7		Nativní	Norma	Ano	5
19	Bordeaux. dog	12,3		Nativní	Norma	Ano	3
20	Černý ruský ter.	19,1		Nativní	Norma	Ano	1
21	WHWT	6,5		Nativní	60 % mrtvých	Ne	
22	Irský vlkodav	4,6		Nativní	60 % mot., řídký	Ne	
23	Bordeaux. dog	5,7		Nativní	Norma	Ano	4
24	Bordeaux. dog	5,9		Nativní	Norma	Ano	3
25	Bordeaux. dog	6,6		Nativní	Norma	Ano	4
26	Irský vlkodav	3,7		Nativní	Norma	Ne	
27	Výmarský ohař	8,0		Nativní	50 % mot., středně hustý	Ne	
28	Novofundl. pes	7,9		Nativní	Norma	Ne	
29	Kavalír K. CH. sp.	5,0		Nativní	Norma	Ne	
30	Labr. Retr.	9,2		Nativní	Norma	Ano	5

31	Anglický mastif	19,0		Nativní	Norma	Ne	
32	Anglický mastif	5,8		Nativní	Norma	Ne	
33	WHWT	4,8		Nativní	Norma	Ano	4
34	Labr. Retr.	Nebyl		Nativní	Norma	Ano	4
35	Labr. Retr.	7,3		Nativní	Norma	Ano	4
36	Aljaš. malamut	7,6		Nativní	Norma	Ano	9
37	Labr. Retr.	9,6		Nativní	Norma	ne	

3.4.4.1 Péče o fenu po inseminaci

U vaginální a transcervikální inseminace se aktivita feny omezuje minimálně 1 až 2 hodiny po inseminaci. U chirurgického typu inseminace se fena nechá 12 hodin před zákrokem vyhladovět, pitný režim beze změny a po inseminaci postupně malé dávky krmiva, omezuje se aktivní pohyb, zejména pak skákání. Samozřejmostí je péče o ránu (Přinosilová, 2013).

3.4.5 Odběr semene od psa

Nejčastějším způsobem odběru spermatu u psů je manuální ejakulace. Odběr se provádí obvykle za přítomnosti feny, která je nejlépe ve fázi estru, v tiché místnosti a na protiskluzové podložce. Pokud není možná přítomnost feny, používá se feromon methyl p – hydroxybenzoate, který se aplikuje v okolí vulvy feny, která není v říji (Goodwin et al., 1979).

Lubrikant by neměl přijít do styku s ejakulátem, protože mnoho běžně užívaných lubrikantů snižuje motilitu spermií (Froman and Amann, 1983).

Ejakulace probíhá ve třech frakcích. První, prespermiová má malý objem (cca 5 ml) a pochází z prostaty. Má funkci čistící. Druhá frakce je spermiová a pochází přímo z ocasu nadvarlete. Objem bývá různý. Běžně se uvádí 1 – 4 ml. Třetí frakce, prostatická, má největší objem a čirou barvu. Sperma má nejvyšší kvalitu, pokud se odebírá ne častěji než jednou za 2 – 5 dní (Alifanov, 1935).

Vyvolání reflexu erekce a ejakulace u psa je relativně snadné, když v blízkosti psa jako stimulator působí hárající se fena. V takovém případě se obecně získá i větší objem ejakulátu. Ejakulát psa je možno získat třemi způsoby: metodou masturbace, dále pomocí umělé pochvy a konečně je ojediněle popisována i metoda stimulace elektrickým proudem – elektroejakulace (Gamčík et al., 1976).

Odběr semena masáží pyje (masturbace) je způsob poměrně spolehlivý a nenáročný na vybavení, neboť kromě sběrače semena nevyžaduje žádných dalších pomůcek. Jako sběrače semena je možno použít širší skleněné nádobky, nebo je možno semeno zachycovat přímo do skleněné stříkačky po vytažení pístu (Gamčík et al., 1976).

Odběr semena pomocí umělé pochvy. Umělá pochva je založena na stejném principu jako umělá pochva pro býka, pouze délka kolísá od 15 do 20 cm. Teplota uvnitř pochvy kolísá od 40 do 42 °C. Tlak uvnitř pochvy se přizpůsobuje poměrům a velikosti pyje psa. Sběrač semena je dvouplášťový, vyhřívaný vodou na 35 – 37 °C. Odběr semena pomocí umělé pochvy se provádí tak, že po vzeskoku psa na fixovanou hárající fenu se zavede pyj do umělé pochvy. Je-li fena agresivní a znemožňuje vzeskok psa, umístí se pes za fenou, aby byl její přítomností stimulován, provede se masáž penisu psa a po vyvolání reflexu erekce se zavede pyj do umělé pochvy. Umělou pochvou se v případě nutnosti může mírně pohybovat. Těsně před ejakulací dochází u psa k intenzivní erekci, vyklenutím beder a koitálním pohybům. Není-li umělá pochva vybavena zařízením na změnu tlaku (pulsátorem), je třeba stěnu umělé pochvy před odběrem vymazat vazelínou, aby nedošlo k povrchovému poranění pyje psa (Gamčík et al., 1976).

Odběr semena stimulací elektrickým proudem (elektroejakulace) se doporučuje jen výjimečně. Při tomto způsobu se postupuje v principu stejně jako u beranů. Při vlastní stimulaci je však nutno u psa provést obluzení, což komplikuje vlastní zákrok (Christensen, 1958).

Semeno se od psa získává masturbací, či pomocí umělé pochvy – vagíny. Při odběru se zachytí do sterilní nádobky, nejlépe vyhřáté na tělesnou teplotu. Spermatem je vhodné inseminovat ihned po odběru a vyšetření semene, protože životaschopnost spermií rychle klesá. Lze jej také úspěšně zmrazit na teplotu tekutého dusíku (-192 ° C) a pak ho skladovat i po mnoho let (Dostál, 1995).

Studie ukázala, že je větší úspěšnost zabřeznutí při aplikaci spermatu do dělohy než do vagíny. Větší úspěšnost mělo semeno zmrazené, ale nejspíš proto, že při jeho použití byl prakticky vždy prováděn progesteronový test a inseminace byla prováděna do dělohy (Linde - Forsberg, 2004).

Cílem je získat pouze spermatickou frakci bez mikroorganismy kontaminované první frakce (která má za účel vypláchnout močové cesty před vstupem semene) a s minimálním podílem prostatické frakce, která snižuje přežitelnost spermií v průběhu konzervace. Kromě masturbační metody je možné aplikovat odběr elektroejakulací, který ale může být spojený s kontaminací získaného semene močí (Johnston et al., 2001).

Tato metoda umožňuje konzervovat gamety různých druhů zvířat a má významné místo v konzervaci semene ohrožených druhů zvířat (Přinosilová, 2012).

Pokud tedy chceme inseminovat psem, který je třeba v Americe nebo v Austrálii, dá se použít chlazené sperma, které má lepší parametry, lepší úspěšnost zabřezávání a finančně vyjde na polovinu oproti mraženému spermatu. V dnešní době se mražené sperma uchovává spíše jako informace pro budoucnost (Láznička, 2011).

3.4.6 Vlastnosti ejakulátu psa

Po odběru je nutno nejdříve semeno vyšetřit, posoudit jeho objem, hustotu spermií a jejich životaschopnost. Normální psí ejakulát má objem kolem 7 ml (2 – 20 ml), koncentrace spermií je 50 - 120 milionů v 1 ml a pH je okolo 6, 4 (Sova, 1978).

Při odběru spermatu se hodnotí jeho objem, barva, pH z třetí frakce (prostatická kapalina), procento progresivního pohybu vpřed za hlavičkou, koncentrace a celkový počet spermií v ejakulátu, procento morfologicky normálních spermií a celkové cytologické a mikrobiální zhodnocení (Johnston, 1991).

Za normální barvu se považuje barva bílá opalescentní. Žlutě zbarvený ejakulát ukazuje na přítomnost močoviny, zelenavé zbarvení zase na zánětlivý proces. Červený nádech ejakulátu ukazuje na přítomnost krve, hnědavý na přítomnost staré krve, obvykle z prostaty (Graham et al., 1980).

Kvalita semene se samozřejmě liší od plemene, věku, případného výskytu pohlavních chorob a v neposlední řadě je také ovlivněna roční dobou. Velmi mladí a velmi staří psi mají nízkou kvalitu spermatu. Ve studiích dalmatinů a rottweilerů byla zaznamenána nejvyšší kvalita spermatu u zdravých jedinců ve věku méně než 6 let. Další studie u beagů ukázala, že kvalita spermatu postupně narůstá s první ejakulací, vyskytující se v průměru od 235 dne věku. Studie ukazují, že nejvyšší kvalita spermatu bývá u psů na jaře (Takeishi et al., 1975).

Ejakulát je složen ze spermií a sekretu přídatných pohlavních žláz, u psa jde o sekret prostaty. Jeho objem je velmi variabilní a silně kolísá podle plemene, věku, velikosti psa, frekvence krytí a stupně vydráždění. Normální množství ejakulátu kolísá od 1 do 40 ml. Barva závisí na hustotě a konzistenci ejakulátu a je v odstínech šedivé až bílé barvy. Koncentrace spermií v ejakulátu zdravého psa je 300×10^6 až 800×10^6 spermií/ml. V celém ejakulátu by mělo potom být 300×10^6 až 32000×10^6 spermií. Obecně platí, že velká plemena psů mají celkové množství spermií v ejakulátu větší než plemena malá (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Spermie se tvoří ve varlatech neustále. V jednom gramu varlete se každý den vytvoří $12 - 17 \times 10^6$ spermií. Frekvence využití psa má přímý vliv na objem ejakulátu i na množství spermií. Tento vliv byl zjišťován u psů, kterým byl ejakulát odebírán uměle. Doporučení frekvence využití psů k plemenitbě je obtížné a velmi záleží na individuálních vlastnostech jednotlivých psů. Zdravý pes se může používat k plemenitbě bez negativního dopadu na kvalitu ejakulátu každých 48 hodin, denně 3 dny s dvoudenním odpočinkem nebo 2x denně se dvěma dny odpočinku. Bylo zjištěno, že k poklesu koncentrace spermií v ejakulátu dochází v pozdním létě a na podzim a naopak vyšší koncentrace jsou zjišťovány na jaře a v časném létě. Tyto změny jsou pravděpodobně vyvolány změnou délky světelného dne a okolní teplotou. V žádném období se však nesnižuje počet spermií pod 200×10^6 spermií v 1 ml ejakulátu a u zdravého psa tyto výkyvy nemají negativní vliv na jeho plodnost. Velikost a hmotnost tkáně varlat přímo souvisí s denní produkcí spermií (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Semeno je ejakulováno ve třech frakcích. První frakci tvoří čirý sekret pH 6,4 pocházející z uretrálních žlázek. Je ejakulována po dobu 30 – 50 sekund. Druhá frakce je bílá, pH kolem 6,1 a její objem kolísá od 0,5 do 4 ml. Je bohatá na spermie a její vylučování trvá asi 1 až 1,5 minuty. Třetí frakce obsahuje převážně sekret prostaty a pH se pohybuje kolem 7,2. Její objem kolísá od 3 do 50 ml a je vylučována 5 – 30 minut. Také tato frakce je vodnatá, mírně opaleskující a obsahuje zpravidla menší množství spermií. Celkový objem ejakulátu a tedy i jeho kvalita se různí podle metody odběru s dále je ovlivňována velikostí psa, frekvencí odběru, stářím psa a podobně (Kozumplík, 1962).

Normální objem se pohybuje v rozmezí od 1,0 do 80,0 ml. Objem neukazuje na kvalitu spermatu (Dubiel, 1976).

Objem celého ejakulátu kolísá od 2 do 50 ml i více. Barva celého ejakulátu je šedobílá až bílá a to v závislosti na koncentraci spermií. pH ejakulátu kolísá nejčastěji mezi 6,7 – 6,8. Koncentrace není ukazatelem kvality ejakulátu. Výjimku tvoří pouze případ, kdy v ejakulátu spermie nejsou vůbec přítomny. Koncentrace spermií je závislá na množství prostatické tekutiny a mohou se pohybovat v rozmezí od 4 do 400 milionů spermií na mililitr. Za normální množství spermií v ejakulátu je považováno 300 milionů až 2 biliony spermií (Johnston et al., 1991).

Počet spermií v ejakulátu se nižší u velmi mladých nebo naopak starých psů (Wildt et al., 1982).

Konzistence ejakulátu je nejčastěji vodnatá, pach typicky psí nebo nevýrazný. Koncentrace spermií se pohybuje mezi 5000 až 500 000 v 1mm^3 . Obecně se zjišťuje vyšší

koncentrace spermií, ale menší objem ejakulátu při odběru masturbací. V celém ejakulátu se nachází 50 miliónů až 2 miliardy spermií. Počet morfologicky změněných spermií u plodného psa nemá přesáhnout hranici 30 % a progresivní pohyb musí vykazovat nejméně 70 % spermií (Gamčík et al., 1976).

Množství morfologicky normálních spermií v ejakulátu je 80 % a více. Morfologické abnormality spermií zahrnují primární (v důsledku spermatogeneze) a sekundární defekt (v důsledku špatné manipulace např. při odběru). Dále pak zahrnuje menší (nesouvisející s plodností) a nevýznamné defekty (které ale negativně korelují s plodností) (Oettle, 1988).

Příčiny morfologických abnormalit spermií zahrnují různé infekce pohlavního traktu, horečku, testikulární trauma (Soley and Oettle, 1986).

Spermatogenní cyklus trvá u psů zhruba 62 dní (Hori et al., 1998).

Většina autorů považuje progresivní pohyb spermií za významný ukazatel pro odhad fertilizační schopnosti semene. Z hlediska funkčního, je pohyb spermií nutnou podmínkou jejich průniku do vaječné buňky.

Byl stanoven soubor faktorů ovlivňujících endogenně a exogenně motilitu spermií. Z endogenních faktorů se uvádí na prvním místě věk donora, doba pobytu spermií v nadvarleti, doba mezi a po ejakulaci, zrání spermií – morfologické, fyziologické a biochemické, pohyb bičíku, vazebné proteiny a další. Z exogenních faktorů se uvádí viskozita, teplota, pH prostředí, semenná plazma, vaginální prostředí, cervikální sekret, uterinní prostředí a další. V ejakulátu je pohyb spermií nahodilý, neorientovaný. Aktivita bičíku orientuje pohyb spermie za hlavičkou (Věžník, 2004).

Za normální se považuje progresivní pohyb spermií v ejakulátu 70 % a více. Spermie jsou rezistentní vůči chladnému prostředí, není tedy třeba je zahřívát, k posouzení stačí pokojová teplota (Barlett, 1962).

Hodnota pH třetí (prostatické) frakce dosahuje průměrně 6,5. Pohybuje se v rozmezí 6,3 až 6,7 (Makler et al., 1984).

Fyzikální a chemická analýza zahrnuje rozbor minerálního složení a prostatické tekutiny (Branam et al., 1984).

V psím spermatu byla prokázána antibakteriální aktivita. Jako přirozený antibakteriální faktor je znám zinek. Bylo ale dokázáno, že u psů po kastraci není prostata tak snadno kolonizována bakteriemi jako u psů nekastrovaných (Fair et al., 1973).

Tabulka č. 8 : Fyziologické parametry nativního ejakulátu a parametry inseminační dávky, (Johnston et al., 2001), (Thomassen et al., 2006).

	Nativní ejakulát spermatická frakce	Chlazený ejakulát	Mražený ejakulát
Celkový počet spermií (10 ⁶)	300 - 8000	Min. 150 motilních	Min. 100 – 150 motilních
Motilita (% spermií s progresivním pohybem)	> 70	> 70	≥ 50
Morfologie (% normálních spermií)	> 80	> 80	> 80

3.4.7 Frekvence získávání ejakulátu od psa

K snížení kvality ejakulátu dochází jak při nadměrném využívání, tak i po dlouhé přestávce mezi odběry semena. Aby nedošlo k uvedeným poruchám, je nutno při připouštění nebo odběru semena dodržovat určité zásady.

Při dlouhodobém plánu odběru semena je nutno upravit jeho frekvenci jen na jeden odběr za 48 hodin. V případě nutnosti je možno získávat semeno jednou denně po 3 dny za sebou, avšak potom má následovat nejméně dvoudenní odpočinek. Dodržuje-li se uvedený způsob odběru semena, nedochází k snížení jeho kvality. Také po déletrvajícím pohlavním abstinenci dochází k sekundárním změnám na spermiích uložených v nadvarletech, což se však upraví opakovaným odběrem ejakulátu (Gamčík et al., 1976).

3.4.8 Ředění a konzervace semene

Uchování vitality a schopnosti oplození spermií v neředěném ejakulátu po delší dobu není možné. Při pokojové teplotě dochází už po 8 hodinách k zastavení pohybu spermií. Přechovává-li se jen druhá frakce ejakulátu v neředěném stavu, prodlužuje se přežitelnost spermií na 24 hodin.

Podstatně lepších výsledků bylo dosaženo po přidání různých ředidel k frakci bohaté na spermie. Za velmi dobré ředící medium se považuje žloutek a citrát. Uchovává-li se ředěná druhá frakce (ředění 1 : 1) při teplotě kolem 4 °C, je možno zjistit 50 % motilitu ještě po 96 hodinách. Schopnost oplození ředěného semena, uchovávaného při 4 °C se nesnižuje ani po transportu na větší vzdálenosti (Harrop, 1954).

Byly provedeny také úspěšné pokusy se zmrazováním druhé frakce ejakulátu. Jako ředící medium bylo použito žloutku a citrátu. Semeno se ředí v poměru 4 : 1 a uloží se na jednu hodinu při 4 °C. K zředěnému semenu se pak přidá objemově stejné množství žloutkocitrátového ředidla s obsahem 20 % glycerínu. Po opatrném smíchání se naředěný ejakulát uchová po dvě hodiny při 4 °C. Konečné ředění je tedy 1 : 8. Takto ředěný ejakulát se zmrazuje pomalým postupem ve zkumavkách až na - 79 °C. Po jednom roce uskladnění byl zjištěn u 45 % spermií progresivní pohyb (Maule, 1962).

Psí ejakulát může být v chladničce zchlazen na 4 °C a slouží tak k užití po několik málo dní a nebo může být zmrazen a udržován neomezeně v kapalném dusíku (Edwards et al., 1997).

Principem konzervace semene je snížení metabolismu spermií a navození anabiózy, stavu podobnému tomu, při němž jsou spermie uchovány v nadvarleti. Cílem je prodloužení životaschopnosti a fertilizační schopnosti spermií (Přinosilová, 2013).

3.4.9 Technika umělé inseminace

Zdárný výsledek inseminace záleží na době, ve které se tento úkon provádí. Za nejvhodnější dobu pro inseminaci se u většiny fen považuje 9. až 13. den od objevení prvních příznaků hárání (Kozumplík, 1970).

Při inseminaci se používá celoskleněné stříkačky a pryžového katetru nebo lépe pipety z plastické hmoty, která se napojí na stříkačku. Před inseminacním úkonem se fena postaví tak, aby byla zádí výše. Vulva se očistí vatou a katetr se zavede pokud možno až do krčku děložního. Katetr nebo pipeta se zavádí nejdříve poševní předsíní směrem dorzokraniálním a po proniknutí do pochvy pak vodorovně. Pokud nelze zavést katetr až přes krček děložní, je vždy účelné, aby k deponování semena došlo alespoň na začátku děložního krčku. Po zavedení katetru se vytlačí semeno pomalým stiskem pístu ze stříkačky, stříkačka se oddělí od katetru, natáhne se 2 – 3 ml vzduchu a jím se vytlačí ještě zbytek semena z katetru. Následně se katetr vytáhne a fena se drží pozvednuta za zadní končetiny ještě 5 – 10 minut. V této době je vhodné feně zavést do pochvy jeden nebo dva prsty, čímž se imituje svázání, ke kterému dochází při normálním páření. Během tohoto úkonu dochází k přilnutí poševní stěny na prsty a její pulsaci a současně dochází k děložním kontrakcím. Nasávací činnost dělohy tak urychluje přechod spermií přes krček do dělohy (Kozumplík, 1970).

Uvádí se, že při koncentraci spermií nad 150 000 v 1 mm³ stačí pro fenu každé velikosti 1 ml semena. V tomto případě je účelné, zředí-li se semeno alespoň v poměru 1 : 3, aby se zvětšil objem inseminacní dávky.

Výsledky inseminace fen neředěným semenem, tj. bezprostředně po získání ejakulátu, jsou velmi dobré a po první inseminaci se dosahuje březosti 70 – 80 % (Kozumplík, 1970).

3.4.9.1 Inseminace čerstvým semenem

Inseminace se provádí obvykle u zvířat, která nejsou schopna normální kopulace, jako je tomu například u anglických buldoků, jejichž anatomie jim velmi často překáží v přirozeném rozmnožování. Dalším důvodem inseminace může být jakákoli anomálie vaginy. Aby byla inseminace úspěšná, musí splňovat tři faktory: normální kvalitu semene, správné načasování inseminace a správná deponace semene. Protože je poměrně složitá synchronizace estru u fen, obvykle se provádí inseminace čerstvým semenem v celé dávce tj. 250 až 2500 x 10⁶ spermií. Minimální inseminační dávka pro úspěšné zabřeznutí a normální velikost vrhu je větší než 150 x 10⁶ pohyblivých spermií. Celkový objem inseminační dávky i s prostatickou tekutinou by pak měl být větší než 2 – 4 ml. Motilita normálního spermatu by měla být 80 % po 96 hodinách při teplotě 4 °C a 35 % po 120 hodinách (Farstad, 1984).

3.4.9.2 Inseminace chlazeným semenem

V roce 1954 Harrop převážel chlazené psí semeno v tepelně zpracovaném pasteurizovaném mléce. Vzorek držel 5 dní při teplotě 4 °C a poté inseminoval fenu chrta, která porodila 2 štěňata po 64. denní březosti. Následně transportoval chlazené sperma z Anglie do New Yorku a z Anglie na Nový Zéland. V obou destinacích proběhla inseminace úspěšně. Předpokladem úspěšné inseminace chlazeným spermatem jsou: normální kvalita semene, správné načasování inseminace a správná deponace semene. Taktéž je však velmi důležitá manipulace s inseminační dávkou a přísné dodržování podmínek skladování. Úspěšnost zabřeznutí závisí na správném načasování doby provedení vlastní inseminace, na kvalitě semene, místě deponování, na manipulaci s inseminační dávkou, na teplotě a přesném dodržování postupu (Nishiyama et al., 1999).

Výhodou chlazeného semene je menší poškození spermií než při použití kryokonzervace (fertilizační schopnost a délka přežití se blíží hodnotám čerstvého semene), levnější transport a výroba dávek, umožňuje v nouzi použití vaginální inseminace, i když transcervikální je upřednostňována (Přinosilová, 2013).

Nevýhodou je naopak nutný rychlý přesun semene při konstantní teplotě 5°C až 10 °C (nejlépe během 24 hodin, maximálně 40 hodin), načasování výroby inseminační dávky záleží na monitoringu pohlavní aktivity feny (progesteronový test). Semeno nelze skladovat

dlouhodobě, inseminaci je nejvhodnější provést do 5. dne od vytvoření dávky (Přinosilová, 2013).

3.4.9.3 Inseminace mraženým semenem

Inseminace mraženým spermatem se nepoužívá u psů tak běžně, jako u koní či skotu. Pes, který je k inseminaci využíván, musí mít výborný zdravotní stav a výbornou kvalitu ejakulátu a taktéž fena musí být ve výborné zdravotní kondici bez předchozích problémů se zabřeznutím. V AKC přijali první registrace pro vrhy vytvořené pomocí zmrazeného spermatu v roce 1981. Od 1. ledna 1999 AKC požaduje identifikaci pomocí DNA od každého psa, jehož mražené sperma se využívá. Stěry k určení DNA provádí majitel psa sám, pomocí speciálních tamponů, kterými vytírá psovi tlamu, především pak oblast tváří (Edwards et al., 1997).

Semeno je po odběru uchováváno v peletách, skleněných ampulích nebo ve speciálních brčkách (Concannon et al., 1989).

Opakovaným zmrazováním a rozmrazováním se výrazně snižuje životnost spermií (Olar, 1984).

Bylo popsáno mnoho metod mražení psího spermatu, zahrnující také metodu ponoření přímo do tekutého dusíku a techniky s použitím methanolu jako mrazícího média (Kim et al., 1995).

První evidované štěně, které se narodilo z inseminace mraženým spermatem je registrováno Americkým kennel klubem v roce 1981. Šlo o plemeno Irský setr a ve vrhu se narodilo jediné štěně ve státě Colorado. Stanovit správný čas inseminace je vzhledem ke krátké životnosti spermií po rozmražení inseminační dávky velmi složité. Inseminovat fenu mraženým spermatem se doporučuje 3 až 4 dny po ovulaci vzhledem k tomu, že životnost spermií v pohlavním traktu feny je podstatně kratší než životnost čerstvého spermatu (Smith, 1984).

Lékaři zjistili, že došlo k 100 % zabřeznutí při použití intrauterinní inseminace semenem mraženým s přísadkou 6 % glycerolu a rozmraženým v 70 °C po dobu 8 sekund. Nejmenší možný počet spermií byl 5×10^7 . Při výskytu 5×10^6 došlo k zabřeznutí jenom 80 % fen po umělé inseminaci. Po intratubální inseminaci semenem o obsahu 4×10^6 došlo k zabřeznutí pouze u 20 % fen (Kim et al., 2007).

Výhodou inseminace mraženým semenem je časově neomezená možnost skladování inseminační dávky a semeno je možné použít kdykoli, i dlouho po smrti dárce. Nevýhodou je naopak dražší vyhotovení inseminační dávky, dražší transport a výroba dávek, nižší úspěšnost

zabřezávání fen. Mražené semeno navíc vyžaduje intrauterinní inseminaci (Přinosilová, 2013).

3.4.9.4 Vývoz semene psa do zahraničí

Podmínky dovozu semene si stanovuje každá země sama. Státy EU nemají většinou specifické podmínky pro dovoz z ČR, stejně tak USA. Austrálie naopak má jedny z nejpřísnějších podmínek dovozu. Je třeba počítat s tím, že vyřízení všech potřebných věcí v případě mraženého semene zabere dost času a nenechávat vše na poslední chvíli (hárání feny). Je - li požadováno serologické vyšetření na brucelózu, pes musí být otestován v krátké době před či po odběru semene. Potřebné dokumenty spojené s transportem semene zařídí veterinář vyhotovující ID – veterinární certifikát, protokol o kvalitě semene, zdravotní certifikát – vzteklina, doklad o novosti či dezinfekci kontejneru. Druhy kontejnerů na transport mraženého semene: jednorázový výdrž 4 dny. VOYAGER 2I výdrž 8 dnů a VOYAGER 5I výdrž 23 dnů. Poskytované kontejnery na tekutý dusík musí být " Dry shipper, non hazardous, not restricted acc. to IATA special Provision A152 ". Pro transport chlazeného semene se používá neoporový box s výdrží zhruba 40 hodin (dle teploty vnějšího prostředí). Spolupráce se zkušenou transportní firmou je výhodou, zvláště při transportu mraženého semene (Přinosilová, 2013).

3.4.9.5 Dovoz semene psa do České republiky

Je potřeba splnit požadavky Státní veterinární správy ČR pro import semene ze zahraničí. Při dovozu semene ze třetích zemí je nutné min. 15 dní přede dnem předpokládaného dovozu podat na SVS ČR (epodatelna@svscr.cz) žádost o vydání dovozního povolení obsahující informace plemeno psa dárce, Zda se jedná o chlazené nebo zmrazené sperma, počet dávek spermatu, místo odeslání případně i místo odběru spermatu, místo určení v České republice, Jméno a adresa žadatele včetně případné korespondenční adresu (Přinosilová, 2013).

Tabulka č. 9 : Srovnání úspěšnosti 2041 intravaginálních a intrauterinních inseminací (Vitásek a kol., 2012)

Druh semene	Březost (%)		Počet štěňat (ks)	
	inseminace do pochvy	inseminace do dělohy	inseminace do pochvy	inseminace do dělohy
nativní	47,8	65,2	5,8 ± 2,8	6,5 ± 2,5
chlazené	45,1	65,6	5,8 ± 3,0	6,4 ± 3,2
mražené	34,6	52,0	4,7 ± 2,6	5,0 ± 3,2

3.5 Nejčastější poruchy a nemoci u fen spojené s reprodukcí

3.5.1 Vaginitis

Jedná se o velmi časté onemocnění u fen. Záněty pochvy se vyskytují u fen všech věkových kategorií a plemen. Největší výskyt byl zjištěn u plemen knírač, boxer, šarpej a mastin, a to mezi 5 měsícem a 3 roky stáří.

Z infekčních agens se nejčastěji uplatňují bakterie, méně pak kvasinky, plísňe a viry. Z neinfekčních agens se setkáváme například s retencí plynu nebo moči.

V cytologickém obrazu se objevují jaderné a cytoplazmatické degenerace buněk s přítomností většího množství hlenu, detritu, neutrofilů, lymfocytů a podobně (Doležel a Kudláč, 1997).

3.5.2 Pyometra

Pyometra je v obecné charakteristice kumulace hnisu v děloze. Předpokládá se, že hlavním vyvolávacím faktorem pyometry je hormonální inbalance (hormony zprostředkovaná metestrální porucha), kdy estrogenní stimulace dělohy v době říje vyvolá neadekvátní proliferaci endometria a hyperplázii děložních žlázek a tyto následně v luteální fázi nadměrně tvoří sekret, který se společně s krevními elementy a deskvanovaným epitelem hromadí v děloze v podobě hnisu (Láznička, 1992).

Pyometra je poměrně častým onemocněním, nejčastěji postižené jsou feny starší čtyř let a feny, které nikdy nerodily. Přesná příčina onemocnění není doposud známá. V počáteční fázi onemocnění se zdá být důležitá stimulace dělohy vnitřními a vnějšími gestageny v průběhu prodlouženého hárání. Děloha feny je vlivem progesteronu vnímavá k bakteriím. Hlavními klinickými příznaky jsou hnisavý výtok z vagíny (v případě pyometry otevřené) a zvýšený příjem tekutin a močení. Při diagnostice je upřednostňováno rentgenologické

vyšetření a ultrasonografie. Těmito vyšetřeními lze totiž vyloučit březost v délce do 40 dnů, která by mohla pyometru limitovat na RTG snímku. K léčbě se nejčastěji používají prostaglandiny a širokospektrální antibiotika. Protože je riziko opětovného vzniku onemocnění poměrně velké doporučuje se chirurgická léčba – odstranění dělohy a vaječníků u starších fen a u fen nepoužívaných v chovu (Arnold et al., 2007).

Předchozí březost se prokázala jako statisticky významný faktor pro prevenci pyometry u některých plemen. Rizikové faktory pro vznik pyometry jsou: pseudogravida, věk při první říji a prvním porodu, předchozí infekce močových cest a nádory mléčné žlázy (Hangman et al., 2011).

Pyometra je běžný po estrální syndrom u fen. Klasická léčba se skládá z odstranění dělohy a vaječníků. Tato metoda nabízí efektivní alternativní léčbu pyometry s možností dalšího chovu feny. Jedná se o chirurgickou drenáž a výplach dělohy transcervikálním katetrem pomocí 5 % Povidon-jódu ve fyziologickém roztoku. Tato léčba proběhla u osmi fen, všechny úspěšně zabřezly a porodily bez komplikací po tomto ošetření (De Cramer, 2011).

Jako predisponovaná plemena jsou uváděna bernský salašnický pes, rotvajler, kolie, kavalír king Charles špatněl a zlatý retrívr. Děloha feny je pod vlivem progesteronu vnímavá k bakteriální infekci tím, jak progesteron stimuluje růst žláz sliznice dělohy a jejich vylučovací aktivitu, spolu s uzavřením krčku děložního a otláčením děložních stahů. Nejčastěji zjištěnou bakterií je *Escherichia coli*, a to v 90 % případů (Susi et al., 2007).

Poševní obraz otevřené formy pyometry je charakterizován vedle velkého množství leukocytů, erytrocytů a hlenu s tkáňovým detritem, též svinutými hypertrofickými buňkami především střední vrstvy poševní sliznice a endometria.

Cytologický nálezn uzavřené formy pyometry je pouze odrazem probíhající luteální fáze pohlavního cyklu, a proto není diagnostiky směrodatný (Láznička, 1992).

Pyometra se vyskytuje převážně u starších multiparních fen. Příznaky jsou poměrně výrazné a typické. Cenný je anamnestický údaj, že se jedná o starší multiparní zvíře, u něhož v průměru před dvěma měsíci proběhla říje zpravidla abnormálně dlouhá (Kudláč, 1972).

3.5.3 Endometritis

Jedná se o onemocnění dělohy, které je onemocněním převážně fen určených k chovu, které způsobuje neplodnost. V onemocnění hraje roli také případná přidružená bakteriální infekce. Během estru se v děloze vyskytuje u fen mnoho bakterií. Jde především o tyto

bakterie : *Streptococcus spp.* , *E. coli*, *Pasteurella multocida*, *staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.* a další (Watts and Wright, 1995).

3.5.4 Juvenilní zánět pochvy

Jde o onemocnění mladých fen. Vyskytuje se od druhého až třetího měsíce. U feny se objeví hnisavý výtok z přezky, jinak je fena naprosto v pořádku bez dalších příznaků. Výtok většinou sám vymizí po prvním hárání. Je-li však nadměrný nebo dráždivý, mohou jej zmírnit výplachy pochvy mírnými dezinfekčními prostředky, ale vždy po poradě s veterinárním lékařem (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Objevuje se u fen ve stáří od 8 týdnů výše. Objevuje se hlenovitý až mukopurulentní výtok z vulvy. Zvířata jsou většinou v dobrém zdravotním stavu. Ve více než 80 % dochází ke spontánnímu vymizení po prvním estru (England and Heimendahl, 2010).

Hnisavé vulvitidy a vaginitidy jako zánětlivé onemocnění pohlavního ústrojí se mohou vyskytnout zvláště u mladých fen jako jeden ze symptomů psinky psů. Samostatně pak mohou vzniknout vzácně jako důsledek poranění a infekce při koitu (Kudláč, 1972).

3.5.5 Abnormální cyklus

Problémy s plodností u fen jsou často způsobeny abnormálním estrálním cyklem nebo hormonální nerovnováhou, která může nebo nemusí souviset přímo s reprodukcí. Termín tichá říje se používá u feny, která je v estru, ale nevykazuje žádné změny chování nebo tělesné změny. K tomu může dojít, když má fena malý nebo žádný poševní výtok, stále se čistí nebo měla jen krátký kontakt se psy. K tiché říji dochází nejčastěji u mladých fen, k determinaci gravidity je nutné provést vaginální cytologii (Case, 2005).

Neříjivost fen je charakterizována nedostavením se říje po dlouhou dobu a přichází hlavně u mladých, dospívajících fen ve věku 18 – 24 měsíců nebo i u starších, která již jednou, nebo vícekrát projevila normální pohlavní cyklus. Příčinou anestru je zpravidla nedostatečná produkce gonadotropních hormonů, jmenovitě FSH. Ovaria anestrických fen zůstávají abnormálně malá, hladká a tužší konzistence a nelze na nich zjistit rostoucí folikuly ani žlutá tělíska (Kudláč, 1972).

Některé feny vykazují velmi krátké estrální cykly. V průměru se považuje 5 měsíců za minimální délku kompletního a normálního estrálního cyklu. Feny, které mají estrální cyklus každé 3 – 4 měsíce jsou často neplodné. Předpokládá se, že je to z důvodu neschopnosti endometria zcela zregenerovat. Druhý extrém je cyklus, který je delší než 15 měsíců. Obvyklou příčinou tohoto problému je hypothyreóza (Case, 2005).

Zkrácená a nevýrazná říje je charakterizována zkrácením délky říje, nedostavením některého z hlavních příznaků říje, zpravidla svolnosti k páření nebo ovulace a nezabřeznutím feny. Příčinou této poruchy plodnosti je nedostatečná funkce adenohipofýzy, zpravidla ve smyslu porušené rovnováhy mezi produkcí FSH a LH, hlavně v neprospěch LH (Kudláč, 1972).

Za určitou hranici mezi proestrem a estrem (u prodlouženého proestru) je považován LH peak. Protože však LH peak je velmi obtížné zachytit, využívá se stanovení koncentrace progesteronu. Jeho hladina se v době LH peaku pohybuje mezi 1,5 – 2,5 ng / ml (Doležel a Kudláč, 1997).

Poslední poruchou říjového cyklu je přetrvávající říje. Přetrvávající říje je způsobena přítomností nadměrné koncentrace estrogenu. To může být důsledkem nádorů, cyst nebo nadměrným podáváním estrogenních látek (Case, 2005).

Při prodloužené říji její příznaky přetrvávají déle než tři týdny. Příčinou tohoto stavu je nedostatečná produkce luteinizačního hormonu v předním laloku hypofýzy. U fen se dostaví charakteristické příznaky proestru jak na zevním pohlavním ústrojí, tak i v chování. Vlastní estrus je abnormálně prodloužen a fena je po relativně dlouhou dobu svolná k páření se psem. Na ovariiích folikuly vůbec nedozrají a neovulují, ale dochází často k jejich cystózní degeneraci a v důsledku přetrvávající tvorby estrogenů se může vyvinout onemocnění tzv. glandulárně cystická hyperplazie endometria, která později může přejít v pyometru.

U většiny druhů zvířat platí, že s pokračujícím stářím se zvyšuje embryonální mortalita. Vlastní příčinou je stárnutí dělohy a její snižující se schopnost zabezpečit normální vývoj placenty. Prokázáný je i přímý vztah vysoké laktace k vyššímu výskytu embryonální mortality (Kudláč, 1972).

3.5.6 Pseudogavidita

Pseudogavidita u fen je zcela normální jev. Vztahuje se k fázi diestru pohlavního cyklu feny. Setkáváme se z různými formami falešné březosti od skryté, ve které jsou příznaky sotva znatelné až k těžké klinické pseudogaviditě. Nastává 6 - 8 týdnů po estru. Fena projevuje příznaky březosti včetně hnízdění, agresivity, zduření mléčné žlázy i kontrakcí. Tyto příznaky jsou v přehnané míře oproti projevům březí feny. Přesná etiologie falešné březosti není známa. Je spojována s rychlým poklesem progesteronu a následným vzestupem prolaktinu (Giesenberg, 2004).

Řešením je zrušení pelišku, odebrání hraček a omezený přísun krmiva včetně vody, případně studené obklady. Odšťikování mléka je nežádoucí, neboť se vemínko provokuje ke zvýšené produkci mléka (Skalka, 1997).

Fyziologicky se pseudogravidita vyskytuje u všech nebřezích fen, které mohly či nemusely být kryty. Klinická nebo zjevná falešná březost je patrná pouze u fen, které jsou přecitlivělé na prolaktin (Sathiamoorthy et al., 2007).

Byly zkoumány účinky homeopatie na pseudograviditu fen. Do studie bylo zahrnuto třicet fen s klinickými projevy falešné březosti. Patnáct z nich bylo léčeno homeopatiky Thuja D30, které obsahují výtažky ze Zeravu západního (*Thuja occidentalis*). Zbytku fen bylo podáváno placebo. Kompletní zlepšení fyzické i psychické kondice bylo pozorováno u všech zvířat s aktivní léčbou. Žádné vedlejší účinky ve skupině léčené homeopatiky nebyly pozorovány. Závěrem lze říci, že homeopatikum Thuja D30 lze efektivně a bezpečně využít jako alternativu k běžné farmakologické léčbě pseudogravidity fen (Ozyurtlu and Alacam, 2005).

Je takový stav, kdy je příliš dlouhá luteální fáze u fen, které nejsou březí. Je zaznamenána zvětšená mléčná žláza, která projevuje velmi často známky laktace. Koncentrace prolaktinu je stejná, jako u březích fen. Feny bývají anorektické, nervózní, agresivní, pečují o věci kolem se zvýšeným zájmem, někdy se objevují stahy a falešný porod. K ukončení pseudogravidity se v praxi používají inhibitory, jako cabergoline nebo bromocriptine (England and Heimendahl, 2010).

Když pseudogravidita není typickou funkční poruchou plodnosti, představuje abnormální stav u nebřezích fen, který je bezprostředně spojený s pohlavním cyklem a plodnost může nepřímo negativně ovlivnit zdravotními komplikacemi na mléčných žlázách a vytvářením predispozice pro vznik pyometry. Objevuje se u nebřezích fen během diestru a projevuje se především psychickými změnami v chování feny, které imitují březost a porod. Vrozená predispozice k pseudograviditě je u fen daná obdobným průběhem luteální fáze u březích i nebřezích zvířat (Doležel a Kudláč, 1997).

3.5.7 Absence mléka

Fena normálně porodí, o štěňata jeví zájem, ale nemá mléko. Spuštění mléka zajišťuje hormon, který současně vyvolává porod – oxytocin. Někdy však dojde ke špatné synchronizaci obou procesů a produkce mléka se opozdí za porodem až o řadu hodin. Stav se dá napravit injekčním podáním oxytocinu, případně překlenutím období bez mléka umělým napájením (Skalka, 1997).

3.5.8 Eklampsie

Eklampsie (poporodní odvápnění) je akutní onemocnění fen v době laktace, které je provázené křečemi, které mohou vést k úhynu, pokud není fena ošetřena. Eklampsie postihují feny zejména první 4 týdny po porodu, většinou v době vrcholu laktace. V menší míře se však onemocnění může vyskytnout v době březosti. Hlavní příčinou mléčné horečky je pokles vápníku v krvi feny, ke kterému dojde z důvodu jeho větších potřeb v období laktace. Počáteční příznaky jsou charakterizovány vyčerpaností feny, neklidem, nervozitou a nezájmem o štěňata. K dalším příznakům patří i tření hlavy o zem, žíznivost, slintání a zrychlené dýchání. Ošetření by mělo být provedeno co nejdříve po zjištění klinických příznaků. Léčba spočívá v okamžitém injekční aplikaci kalcia do žíly veterinárním lékařem. Po této aplikaci se následně podává vápník ve formě tablet. Doplnujícím opatřením je nedovolit feně, aby po dobu 12 hodin nekojila svá štěňata. Nicméně stejně u asi 20 % fen se přes všechna tato opatření znovu projeví klinické příznaky. Je - li to možné, doporučuje se štěňata plně odstavit (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Eklampsie je jedním ze tří hlavních příčin onemocnění a úmrtnosti fen – matek na celém světě. Během posledních padesáti let došlo k výraznému snížení míry eklampsie v rozvojových zemích. Tyto rozdíly jsou především v důsledku všeobecného přístupu k časné a správné prenatální péči. Eklampsie je spojena se značnými komplikacemi a to jak akutními tak chronickými (Ghulmiyyah and Sibai, 2011).

3.5.9 Mastitida

Je zánět mléčné žlázy. Postižená partie vemínka se stane tuhou, bolestivou a výrazně teplejší než ostatní části. Postupně se zhoršuje i celkový zdravotní stav feny. Příčinou je obvykle snížený nebo úplně zastavený odtok mléka. Důvodem může být zanesení infekce, zranění nebo anatomická překážka. Okamžitým pokusem o řešení může být opatrná masáž, odstříkání zadržného mléka a studený obklad. Nezabere-li toto opatření, doporučuje se návštěva veterinárního lékaře, který většinou nasadí léčbu antibiotiky. Postižení celé mléčné žlázy je naštěstí výjimečné (Skalka, 1997).

Ve studii se u fen hodnotily klinické projevy a bakteriologické nálezy ve vzorcích mléka. Nejvyšší počet mastitid se projevil v období po porodu (50 %), dále v souvislosti s pseudograviditou (27 %) či ve stádiu pokročilé březosti (23 %). Než začneme mastitidu léčit antibiotiky, měli bychom vzít v úvahu vedlejší účinky na fenu a štěňata (Jung et al., 2002).

3.5.10 Děložní cysty a tumory

Cysty se většinou objevují u starších fen a tvoří se hlavně v důsledku rychlé involuce myometria po porodu. Nejčastějším typem nádoru děložního těla je leiomyom (Schlafer, 2003).

3.5.11 Ovariální cysty a tumory

U fen se vyskytují ovariální tumory zřídka a většinou nejsou hormonálně aktivní (Johnston et al., 2001).

Na rozdíl od tumorů se vyskytují poměrně často a je velmi mnoho typů. Jsou to kapalinou vyplněné struktury, které jsou podstatně větší než klasické folikuly (Lévy et al., 2007).

3.5.12 Folikulární a luteální cysty

Jsou přítomny v období proestru nebo před vlastní ovulací v různých velikostech. Léčba spočívá v hormonální aplikaci, avšak je zde riziko vzniku pyometry. U fen, které nejsou určeny k chovu se doporučuje kastrace (Johnston et al., 2001).

Vyskytují se u méně než 10 % fen. Při ultrasonografickém vyšetření jsou velmi podobné folikulárním cystám, ale mají silnější stěnu. Vylučují progesteron a vyvolávají tím velmi dlouhé období anestru (Schlafer et al., 2003).

3.5.13 Hypoluteinismus

Hypoluteinismus je termín popisující nedostatečnou činnost žlutých tělísek během gravidity. Progesteron se zde netvoří v dostatečném množství a gravidita je ukončena resorpcí nebo abortem plodu.

Nutnou podmínkou pro vznik a udržení gravidity u feny je produkce progesteronu v celém průběhu gravidity. Vlastní tvorba progesteronu je složitý proces, na kterém se podílí řada na sobě hierarchicky uspořádaných a závislých struktur v tzv. hypotalamo – hypofyzární – ovariálním systému. V případě, že dojde k porušení některé části tohoto řetězce, produkce progesteronu se zastaví, dojde k poklesu jeho koncentrace v krvi a následnému ukončení gravidity.

Pro tvorbu progesteronu je nutná sekrece hypotalamického GnRH (gonadotropin releasing hormone), který stimuluje sekreci hypofyzárního hormonu LH (luteinizačního hormonu). Luteinizační hormon způsobuje na vaječnicích dozrání folikulů, jejich ovulaci a je nezbytný pro činnost vznikajících žlutých tělísek uvolňujících progesteron. Dalším důležitým

hypofyzárním hormonem, který stimuluje tvorbu progesteronu, je prolaktin, jehož sekrece je nezbytná pro udržení gravidity, který se uvolňuje od 24. – 28. dne po ovulaci (Michle, 1987).

Syntéza progesteronu probíhá v buňkách membrány granulky a *theky interny* folikulární stěny již od pozdního proestru. v dalším období se pak u feny tvoří pouze v luteálních buňkách žlutého tělíska (Sokolowski, 1971).

Pokud nedojde k páření, stav se obvykle zevně nijak neprojevuje. Jedním z rozpoznatelných příznaků může být zkrácení meziříjového intervalu. Stav je někdy označován za příčinu tzv. syndromu krátkého anestru. Po krytí tato funkční porucha vaječníků nevyklučuje zabřeznutí zvířete, ale projevuje se obvykle až v průběhu gravidity absorpcí konceptu nebo abortem (England, 1998).

Setkáváme se s poruchou implantace, placentace a funkce placenty, také sekrece děložních žlázek je nedostatečná pro potřeby výživy raného embrya (Concannon, 1986).

Při hypoluteinismu se může jednat o permanentně nízkou hladinu progesteronu nebo předčasný pokles normální koncentrace progesteronu. Proto je vlastní diagnostika založená na opakovaném stanovení koncentrace progesteronu v periferní krvi. Sledujeme hladiny v postestrálním období v intervalu jednoho týdne a vodítkem je prudce se snižující koncentrace progesteronu a nebo jeho výrazně nízké hodnoty pohybující se v rozmezí 2 – 5 ng / ml (Concannon et al., 1977).

Bylo zjištěno, že abort začíná u fen pouze tehdy, když progesteron poklesne pod 2 ng / ml, a to nejméně na 24 hodin (Feldman a kol., 1993).

Pokud koncentrace progesteronu pod 1 ng / ml přetrvává déle než dva dny, pak to poukazuje na úspěšné ukončení gravidity (Concannon et al., 1977).

Incidence hypoluteinismu ani plemenná predispozice u fen stále není známá. Větší výskyt byl popsán u fen plemene rotwailer a německý ovčák (Zabel et al., 2006).

Popisují se dva typy hypoluteinismu. S ovulací, kdy hodnoty progesteronu krátkodobě vystoupí na 5 až 10 ng / ml, ale brzy klesají pod 5 ng / ml. Druhým typem je hypoluteinismus bez ovulace, kdy jsou hodnoty progesteronu během hárání i v metestru (diestru) na bazální hodnotě kolem 1 ng / ml, max. 2,5 ng / ml (Doležel a Kudláč, 1997).

3.6 Kastrace feny

Kastrace feny můžeme dělit do dvou skupin. Do první patří přání majitele, důvody jsou, sterilizace a zabránění nežádoucí březosti, zabránění nechtěného chování spojeného s říjí a ochrana před některými typy nádorů na mléčné žláze. Druhou skupinu tvoří léčebné indikace

jako jsou, pyometra, nádory vaječníků a dělohy, stabilizace feny s diabetem a zabránění příznaků spojených s pseudograviditou. Nedoporučuje se kastrace před dosažením pohlavní dospělosti, která bývá ohraničena prvním háráním. Dalším kritériem, pro stanovení termínu kastrace je procento zabránění výskytu nádorů na mléčné žláze. Čím více říjových cyklů fena prodělá, tím je větší riziko vývoje nádorů na mléčné žláze. Uvádí se, že provede - li se kastrace před druhým háráním, je pravděpodobnost výskytu nádorů 8 %, ale u fen kastrováných před třetím háráním již 26 % (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Je náročnější než u psa. Fena při zákroku leží v poloze na zádech. Po chirurgické přípravě místa rány je proveden řez na břicho v oblasti mezi pupkem sponou kostí pánevních. Řezem se otevře dutina břišní a vyjme se děloha s vaječníky. Po jejich odstranění je uzavřena sešitím dutina břišní a potom i kůže. Po probuzení z narkózy, které závisí na použitých anestetikách se musí feně zabránit v olizování rány, které by mohlo vést k vytrhnutí stehů. K tomuto se používá límec, který musí fena nosit až do odstranění stehů. Odstranění stehů se zpravidla provádí desátý den od operace (Kvapil a Kvapilová, 2007).

Tabulka č. 10 : Vliv použité metody zabraňující hárání na výskyt nádorů mléčných žláz (Košař, 2004).

nekastrované	Hormonálně ošetřené	Kastrované před 1. háráním	Kastrované po 1. hárání	Kastrované později
39 %	72 %	0,8 %	8 %	26 %

Jak z uvedené tabulky vyplývá, má hormonální přerušování hárání velmi negativní vliv, neboť výrazně zvyšuje riziko vzniku nádorů mléčných žláz.

3.6.1 Hormonální antikoncepce u fen

Kupodivu i v dnešní době, kdy už jsou nežádoucí účinky antikoncepce pomocí steroidních hormonů u fen a koček dobře známé, se bohužel velmi často setkáváme s pacienty, kteří jsou díky aplikacím těchto přípravků zbytečně vystavováni riziku vážných zdravotních komplikací (Bonavet, 2013).

Medikamentózní potlačení říje se nejčastěji provádí aplikací steroidních hormonů. Ty pak ovlivňují celou řadu orgánových systémů a hrají roli při vzniku mnoha onemocnění.

Typickým příkladem komplikace spojené s těmito praktikami je hnisavý zánět dělohy – pyometra. K dalším problémům souvisejícím s antikoncepcí patří stimulace laktace a vznik nádorů mléčné žlázy. Zanedbatelné není ani zvýšené riziko vzniku cukrovky či prohloubení

jaterních onemocnění. Pokud necháváte ošetřovat Vaši fenu nebo kočku těmito antikoncepčními preparáty opakovaně, výrazně tím zvyšujete riziko možných zdravotních komplikací. Opakované aplikace steroidní hormonální antikoncepce fenám a kočkám považujeme z odborného i morálního hlediska přinejmenším za problematické (Bonavet, 2013).

Pro úplnost je potřeba ještě zmínit relativně novou možnost medikamentózní antikoncepce u fen a koček, a tou je aplikace podkožního implantátu s deslorelinem, nesteroidním agonistou GnRH. Jedná se o šetrnou formu antikoncepce, která je sice zatím registrovaná jen pro psy-samce, nicméně v praxi se již začíná používat i u samic. Tato forma antikoncepce nachází uplatnění především při snaze o dočasné potlačení plodnosti. Nevýhodou je dosti variabilní efekt a délka fungování implantátu, vyšší cena a nutnost opakovaných aplikací (Bonavet, 2013).

4 Materiál a metodika práce

Data ke zpracování byla získávána na soukromé veterinární klinice MVDr. Aloise Lázničky v Poříčí nad Sázavou a ve veterinární laboratoři Vedilab v Plzni.

První část statistické analýzy je zaměřena na zkoumání úspěšnosti inseminace nativním spermatem. Do statistiky bylo zahrnuto celkem 130 čistokrevných fen různých plemen a různého stáří od dvaceti měsíců do osmi let. Důvodem inseminace byla většinou neschopnost přirozeně krýt či odmítání psa fenou nebo naopak.

Popis dat

Data obsahují celkem 130 pozorování. U jednotlivých pozorování sledujeme 18 veličin, na které se budu dále odkazovat jejich čísly:

- (1) Datum I. inseminace
- (2) Datum II. inseminace (pokud byla provedena)
- (3) Plemeno
- (4) Důvod inseminace
- (5) Stáří feny
- (6) Stáří psa
- (7) Informace, zda byla fena kryta dříve v minulosti (ano / ne)
- (8) Informace, zda měla fena štěňata dříve v minulosti (ano / ne)
- (9) Informace, zda pes kryl dříve v minulosti (ano / ne)
- (10) Informace, zda měl pes štěňata dříve v minulosti (ano / ne)
- (11) Počet štěňat feny v minulosti (pokud byla)
- (12) Motilita spermatu (slovně hodnocena)
- (13) Informace, zda bylo provedeno komplexní vyšetření spermatu (ano / ne)
- (14) Informace, zda byla měřena hladina progesteronu (ano / ne)
- (15) Informace, zda byla provedena cytologie (ano / ne)
- (16) Informace, zda fena po inseminaci zabřezla (ano / ne)
- (17) Informace, zda fena porodila (ano / ne)
- (18) Informace o celkovém počtu štěňat (někdy v závorce uveden počet mrtvých štěňat)

Z povahy experimentu je zřejmé, že proměnné (1) – (15) můžeme považovat za vysvětlující, proměnné (16) – (18) za vysvětlované. Data vykazují neúplnost vysvětlovaných proměnných – ze 130 celkových případů bylo u 102 případů změřeno, zda

feny zabřezly, z nich máme pouze u 65 případů informaci o tom, zda fena porodila, a u 51 z těchto 65 případů víme, kolik porodila štěňat. Vyplývá to ze skutečnosti, že inseminace je prováděna ambulantně a majitelé často přestali s fenou po inseminaci chodit na kontroly.

Čištění a transformace proměnných

- V případě, že libovolná hodnota libovolné proměnné nebyla vyplněna nebo byl údaj nesmyslný, považovali jsme ji nadále za chybějící hodnotu.
- Jestliže byla hodnota (1) větší než hodnota (2), prohodili jsme obě hodnoty.
- Zavedli jsme proměnnou „inseminace_dvakrat“ s hodnotami 0 a 1, indikující, zda proběhla druhá inseminace (dále (19)).
- Zavedli jsem proměnnou „prodleva_dny“, vyplněnou pouze v případě vyplnění údaje (2), udávající prodlevu mezi oběma inseminacemi ve dnech (dále (20)).
- U proměnné (3) bylo často stejné plemeno uvedeno pod různými názvy (např. „ labradorský retrívr “ a na jiném místě „ labrador retriever “), proto jsme museli názvy plemen sjednotit.
- U proměnné (4) neměly slovní popisy jednotnou formu a bylo třeba je kategorizovat. Užili jsme kategorie (sestupně dle četnosti): „ technické problémy “, „ nezájem feny “, „ nezájem psa “, „ úzká vagína “, „ stárí psa “, „ prevence “, „ jiné “.
- Proměnné (5) a (6) byly uvedeny v různých jednotkách a v různých přesnostech. Uvedli jsme věk v rocích, v případě přesnějšího údaje i pomocí desetinného čísla.
- S proměnnými (7) – (10), (16) - (17) pracujeme ve formátu jedniček a nul, jednička odpovídá „ Ano “ a nula odpovídá „ Ne “.
- Proměnná (11) měla pouze několik vyplněných hodnot, navíc nebylo zjevné, jak je použít pro analýzu. Proto byla z analýzy vyřazena.
- Hodnoty proměnné (12) jsme rozdělili dle hodnocení do tří kategorií – 0, 1, 2. Nula odpovídá špatnému hodnocení, jednička průměrnému, dvojka dobrému.
- Proměnné (13) a (14) jsme v analýze nevyužili.
- Proměnnou (17) uvádíme pouze v případě, že máme ověřeno, že fena zabřezla, jinak necháváme chybějící hodnotu.
- Proměnnou (18) jsme uvedli číselně, bez slovních poznámek.
- Uvažovali jsme nad zavedením proměnné „ uvedený počet mrtvě narozených štěňat “, nakonec ji však nezahrnujeme, jelikož není zřejmé, zda byla mrtvá štěňata reportována ve všech případech. Nadále tedy pracujeme s původními proměnnými (1) - (10) ,

(12), (15) – (18), z nichž u většiny jsme museli upravit formát hodnot, a s novými proměnnými (19) – (20).

Programové prostředí

Analýzy provádíme za použití programů Microsoft Excel 2003, Statistica 12, Trial verze a R 3.0.1. Proměnné nazveme tak, aby bylo zjevné, kterou veličinu udávají.

V druhé části statistické analýzy bylo sledováno celkem 196 čistokrevných fen různých plemen a různého stáří v reprodukčním věku od jednoho roku do devíti let, u kterých byly v průběhu pohlavního cyklu v rozmezí od druhého dne hárání do dvacátého druhého dne jednorázově stanovovány koncentrace progesteronu v krevním séru. Na základě zjištěných hladin byla potom stanovena nejvhodnější doba pro krytí. Dále byla sledována a porovnávána gravidita, eventuelně četnost vrhů nebo jalovost.

K hodnocení těchto znaků bylo využito tabulek četností a popisných charakteristik souboru.

Popis dat

Data obsahují celkem 196 pozorování. Jedná se o případy fen, kterým byl změřen progesteron v průběhu pohlavního cyklu a poté byly kryty. Následně sledujeme úspěšnost zabřeznutí a počet štěňat. Po transformaci dat pracujeme s následujícími veličinami:

- (1) Plemeno
- (2) Věk v letech
- (3) Den hárání - (počítáno od prvního dne viditelného krvavého výtoku z pochvy feny)
- (4) Progesteron – Hladina progesteronu v krvi v den návštěvy veterináře, jednotka ng / ml
- (5) Krytí dvakrát – Binární proměnná, jestliže bylo provedeno dvojí krytí, má hodnotu 1.
- (6) Den krytí 1 – Pořadí dne 1. krytí, počítáno ode dne měření progesteronu
- (7) Den krytí 2 – Pořadí dne 2. krytí, počítáno ode dne měření progesteronu
- (8) Porod 0 - 1 – Binární proměnná indikující, zda proběhl porod
- (9) Počet štěňat

V experimentu považujeme proměnné (1) – (7) za vysvětlující, proměnné (8) – (9) za vysvětlované. Zejména nás bude zajímat následující:

- Závislost úspěšnosti zabřeznutí (měřené proměnnou porod, odhlížíme zde od potratů) na výši progesteronu

- Závislost počtu štěňat na výši progesteronu

Budeme se zabývat taktéž závislostí obou vysvětlovaných proměnných na dalších faktorech.

Programové prostředí

Analýzy provádíme za použití programů Microsoft Excel 2003, Statistica 12, Trial verze a R 3.0.1.

V třetí části statistické analýzy se zaměříme na zkoumání indukce ovulace na základě účinků přípravků, syntetických analogů přirozeného gonadotropin releasing hormonu (GnRH), který mimo jiné zlepšuje procento zabřezávání u všech druhů zvířat. Byla srovnána aplikace tří přípravků u fen - Receptalu, Supergestranu a Pregnylu. U každého z těchto přípravků byla zkoumána skupina čistokrevných fen, různých plemen a velikostních rázů, různého reprodukčního věku. Důvodem aplikace těchto přípravků byla především prevence, neplodnost, málopočetné vrhy, atypické hárání nebo resorpce či potraty.

Popis dat

Data obsahují celkem 198 pozorování. Jedná se o případy fen, kterým byl změřen progesteron v den návštěvy veterináře, byl jim aplikován přípravek na zvýšení hladiny progesteronu (Receptal, Supergestran nebo Pregnyl), načež jim byl po dvou dnech změřen progesteron znovu. V případě nižších naměřených hodnot progesteronu v den aplikace přípravku se aplikace opakovala za dva dny, při současném opakovaném měření hladiny progesteronu. Následně byla převážná většina fen kryta, některé byly i překrývány. Sledujeme úspěšnost zabřeznutí a počet štěňat. Po transformaci dat pracujeme s následujícími veličinami:

- (1) Plemeno
- (2) Věk v letech
- (3) Den hárání – Počet dní před návštěvou ordinace, kdy majitel zjistil krvavý výtok feny
- (4) Přípravek – Jeden z trojice Receptal, Supergestran, Pregnyl
- (5) Progesteron původně – Hladina progesteronu v krvi v den návštěvy v ng / ml
- (6) Progesteron za 2 dny – Hladina progesteronu v krvi dva dny poté v ng / ml
- (7) Abs. rozdíl – rozdíl (5) a (4)
- (8) Opakovaná aplikace – Binární proměnná, jestliže byla provedena aplikace ještě jednou, má hodnotu 1.
- (9) Krytí – Binární proměnná, má hodnotu 1, pokud došlo ke krytí (jednomu či dvěma)

- (10) Opakované krytí – Binární proměnná, má hodnotu 1, pokud došlo ke dvěma krytím
- (11) Den 1 – Pořadí dne 1. krytí, počítáno ode dne měření progesteronu
- (12) Den 2 – Pořadí dne 2. krytí, počítáno ode dne měření progesteronu
- (13) Porod – Binární proměnná indikující, zda proběhl porod
- (14) Počet štěňat

V 1. části experimentu považujeme proměnné (1) – (5) za vysvětlující, proměnnou (7) za vysvětlovanou. Bude nás zajímat:

- Velikost a signifikace vlivu aplikace jednotlivých prostředků na změnu hladiny progesteronu

Ve 2. části experimentu se zaměříme na vliv proměnných (1) – (12) na proměnné (13) a (14).

Programové prostředí

Analýzy provádíme za použití programů Microsoft Excel 2003, Statistica 12, Trial verze a R 3.0.1.

Všechny analýzy byly realizovány s daty získanými prostřednictvím mnou uskutečněného sběru dat.

5 Výsledky

5.1 Inseminace

Hodnoty jednotlivých proměnných

Nejprve se pokusíme popisnou statistikou charakterizovat data.

Tabulka č. 11 : Přehled hodnot číselně udávaných proměnných. Jednotlivé statistiky jsou spočteny pouze z nechybějících hodnot.

proměnná	Deskriptivní statistika						
	Platných	Průměr	Median	Minimum	Maximum	Sm. Odchylka	Normalita
datum_1	129	11/26/200	09/06/200	01/27/200	08/02/201	664	na
datum_2	47	04/20/200	03/27/200	01/29/200	03/22/201	565	na
prodlevadny	47	4,38	2,00	1,00	59,00	11,6530	0,000
vek_fena_roky	122	3,88	4,00	1,50	8,00	1,3930	0,000
vek_pes_roky	121	4,75	4,82	1,00	14,50	2,4060	0,000
kvalita_spermatu	109	0,73	0,00	0,00	2,00	0,9390	na
stenat_celkem	51	5,47	5,00	1,00	12,00	2,8450	0,060

Sloupce po řadě udávají počet platných hodnot, průměr, medián, minimum, maximum a velikost směrodatné odchylky hodnot dané proměnné. Sloupec „Normalita“ udává p - hodnotu pro Shapiro - Wilkův test ověřující, zda hodnoty mohou pocházet z normálního rozdělení. Je-li p - hodnota menší než 0,05 ; můžeme platnost hypotézy o normalitě zamítnout na běžně používané hladině 5 %. Vidíme, že věk fen i psů nemá normální rozdělení, normalitu na hladině 5 % těsně nezamítáme pouze u počtu štěňat. Tato informace může být užitečná pro další analýzy. Jak vidno, dvakrát bylo inseminováno pouze 47 fen.

Tabulka č. 12 : Přehled hodnot proměnných typu (0 / 1).

Proměnná	Deskriptivní statistika					
	Platných	Procento1	Sm. odchylka	Počet 0	Počet 1	95% Interval
inseminace_dvakrát0-1	130	36,2%	0,482	83	47	<0,279 - 0,444
kryti_drive_fena_0-1	126	44,4%	0,499	70	56	na
stenata_drive_fena_0-1	122	31,1%	0,465	84	38	na
kryti_drive_pes_0-1	126	69,0%	0,464	39	87	na
stenata_drive_pes_0-1	126	65,1%	0,479	44	82	na
zabreznuti_0-1	102	79,4%	0,406	21	81	<0,716 - 0,873
porod_0-1	57	98,2%	0,132	1	56	<0,948 - 1>

Sloupce po řadě udávají počet platných hodnot, procentuelní zastoupení hodnot „ano“ mezi platnými, směrodatnou odchylku, počet hodnot „ne“, počet hodnot „ano“. Zde připomeňme, že hodnoty proměnné „porod_0 - 1“ pro feny, které nezabřezly, jsou neplatné. Proto se procento v posledním řádku týká pouze fen, které zabřezly.

Poslední sloupec jsme doplnili manuálně a udává 95 % pravděpodobnostní interval pro hodnotu parametru „p“ alternativního rozdělení, tedy parametru, udávající pravděpodobnost, že jednotlivý pokus bude mít hodnotu 1. Vycházíme ze vzorce (1):

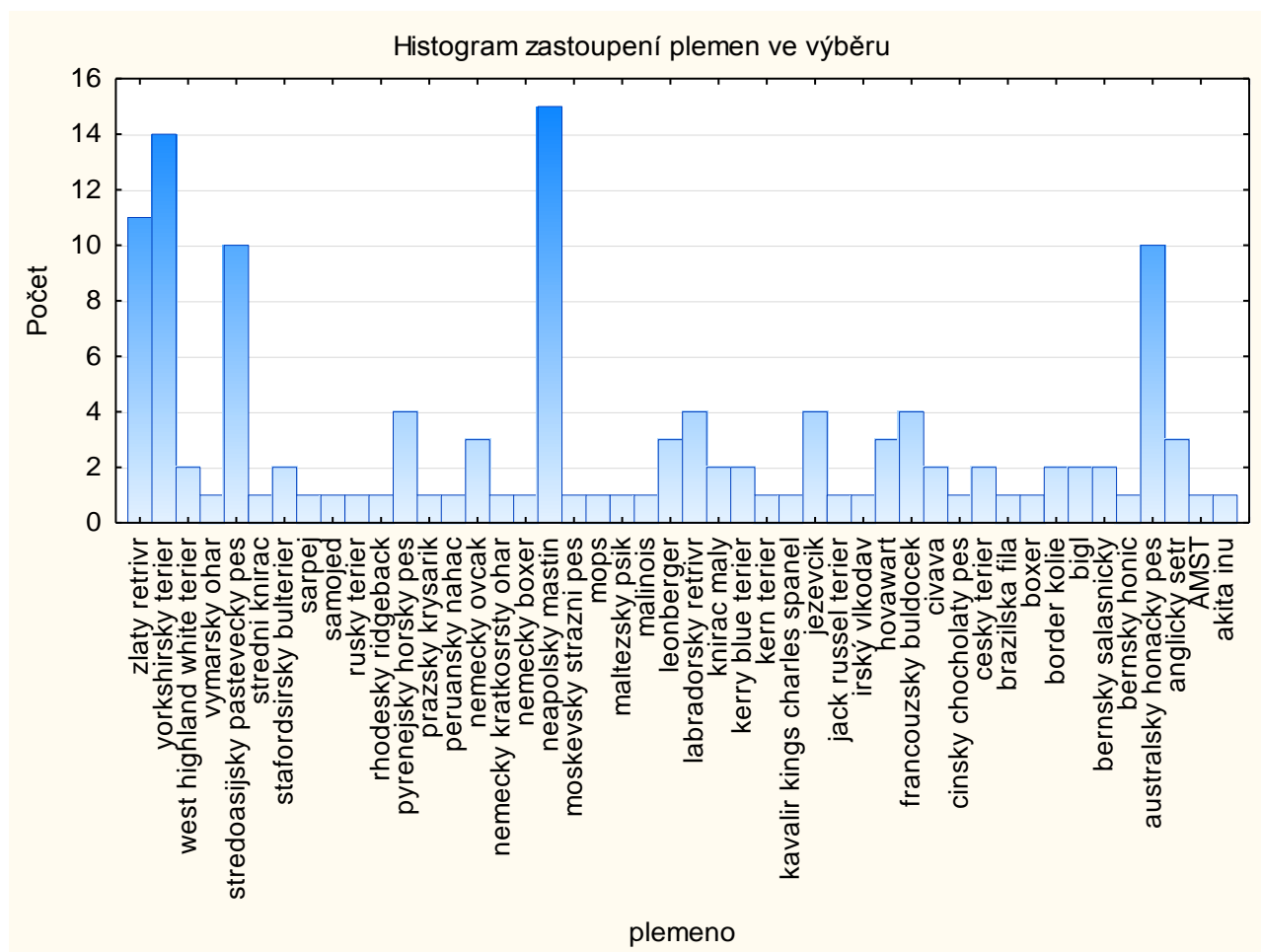
$$P\left(\bar{X} - u_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{\bar{X} - (1 - \bar{X})}{n}} < p < \bar{X} + u_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{\bar{X} - (1 - \bar{X})}{n}}\right) = 1 - \alpha \quad (1)$$

kde p je hledaná hodnota parametru, n je počet pozorování, u_A je A - kvantil normálního rozdělení a volíme standardní $\alpha = 0.05$. Platí $u_{0.975} = 1,96$. Odtud pro příslušné průměry a četnosti dostáváme intervaly uvedené v tabulce. Intervalový odhad jsme prováděli jen u vysvětlovaných proměnných a u proměnné „inseminace_dvakrat_0 - 1“, kterou taktéž nepovažujeme za záležitost volby.

Tabulka č. 13 : Přehled důvodů pro inseminaci a jejich četností.

Kategorie	Důvod	
	Počet	Percent
technicke problemy	56	43,1
nezajem feny	31	23,8
nezajem psa	15	11,5
uzka vagina	8	6,2
stari psa	8	6,2
prevence	6	4,6
jine	5	3,8
Missing	1	0,8

Graf č. 2 : Přehled plemen, u kterých byla inseminace prováděna.



V sadě dat je přítomno 46 různých plemen.

Testy hypotéz

I. Závislost pravděpodobnosti zabřeznutí na různých faktorech

Naším prvním úkolem je testovat závislost zabřeznutí feny na vysvětlujících proměnných, vysvětlovaná proměnná je tedy „zabreznuti_0 - 1“. Zajímá nás, zda se signifikantně (statisticky významně) liší pravděpodobnosti zabřeznutí v podsouborech celkového souboru pozorování, rozdělených dle hodnot vysvětlovaných veličin. Vysvětlovaná proměnná „zabreznuti_0 - 1“ je binární (hodnoty jsou 0 a 1).

V této práci využijeme metodu chí - kvadrát testů homogenity rozdělení, naším nástrojem budou kontingenční tabulky. Označme Z proměnnou „zabreznuti_0 - 1“ a

uvažujeme libovolnou ordinální nebo kategoriální vysvětlující proměnnou (faktor), označíme jej F. Sestavíme následující test:

Nulová hypotéza: Pro každou hodnotu F existuje stejná pravděpodobnost zabřeznutí, tedy pravděpodobnost, že $Z = 1$.

Alternativa: Pro alespoň jednu dvojici hodnot F existují různé pravděpodobnosti, že $Z = 1$.

Při platnosti nulové hypotézy pravděpodobnost zabřeznutí nezávisí na hodnotě F, tedy počet fen, pro které $Z = 1$, má pro každou hodnotu f faktoru F binomické rozdělení se stejným parametrem p. Test shody středních hodnot více binomických rozdělení se nazývá test homogenity. Dle (Anděl, 2003), je tento test ekvivalentní s Pearsonovým chí – kvadrát testem nezávislosti v kontingenčních tabulkách. Ten provedeme.

Nulová hypotéza : Proměnné F a Z jsou na sobě nezávislé.

Alternativa : Existuje závislost mezi F a Z.

Sestavíme kontingenční tabulku obou proměnných. V buňkách této tabulky budeme mít pozorované četnosti jednotlivých kombinací hodnot obou proměnných. Následně je sestavena další tabulka, udávající teoretické četnosti, tedy takové četnosti, které bychom očekávali při splnění nulové hypotézy. Je-li splněna nulová hypotéza, neměly by se pozorované četnosti příliš lišit od teoretických:

Sestavení kontingenční tabulky, určení teoretických četností a výpočet p – hodnoty testu provedeme v programu Excel. Poznamenejme, že závěry, které vychází z tabulek, ve kterých je alespoň jedna teoretická četnost menší než 5, platí pouze přibližně (Anděl, 2003).

1. Nezávislost počtu provedení inseminace a úspěšnosti zabřeznutí.

Tabulka č. 14 : Úspěšnost zabřeznutí vzhledem k nutnosti inseminaci provést vícekrát – pozorované četnosti.

	zabreznuti_0 - 1		
inseminace_dvakrat_0 - 1	0	1	Součet
0	14	49	63
1	7	32	39
Součet	21	81	102

Tabulka č. 15 : Úspěšnost zabřeznutí vzhledem k nutnosti inseminaci provést vícekrát – teoretické četnosti.

	zabreznuti_0 - 1		
inseminace_dvakrat_0 - 1	0	1	Součet
0	12,97	50,03	63
1	8,03	30,97	39
Součet	21	81	102

Jak vidno, teoretické četnosti se příliš neliší od pozorovaných. To potvrzuje i výsledek testu – testová statistika má hodnotu 0,269 ; což je běžná hodnota, které nabývá veličina s chí - kvadrát rozdělením s jedním stupněm volnosti. Proto nepřekvapí, že p - hodnota testu je rovna 0,604 ; což je více než 0,05 ; proto nezavrhujeme hypotézu o nezávislosti počtu provedení inseminace a úspěšnosti zabřeznutí.

Dále budeme uvádět pouze tabulku pozorovaných četností a p - hodnotu testu. V případě, že v tabulce teoretických četností bude hodnota menší než 5, uvedeme tento fakt.

2. Závislost důvodu provedení inseminace a úspěšnosti zabřeznutí.

Tabulka č. 16 : Úspěšnost zabřeznutí vzhledem k důvodu inseminace – pozorované četnosti.

	zabreznuti_0 - 1		
duvod	0	1	Součet
nezajem feny	4	18	22
nezajem psa	3	8	11
prevence	1	5	6
stari psa	4	3	7
technicke problemy	7	36	43
uzka vagina	2	6	8
Součet	21	76	97

Tabulka teoretických četností obsahuje pole s hodnotami menšími než 5. Proto test platí jen přibližně. P - hodnota testu je 0,231 ; nulovou hypotézu nezamítáme. Z tabulky jsme (pro malý počet pozorování) vyřadili skupinu „jiné důvody“.

3. Nezávislost plemene a úspěšnosti zabřeznutí.

Tabulka č. 17 : Úspěšnost zabřeznutí dle plemene – pozorované četnosti.

plemeno	zabreznuti_0 - 1		Součet
	0	1	
neapolsky mastin	3	11	14
yorkshirsky terier	0	13	13
australsky honacky pes	0	10	10
zlaty retrivr	0	8	8
stredoasijsky pastevecky pes	4	2	6
Součet	7	44	51

Z tabulky jsme vyřadili plemena s méně než 5 výskyty. Tabulka teoretických četností obsahuje pole s hodnotami menšími než 5. Proto test platí jen přibližně. Velmi nízká p - hodnota 0,001 však zaručuje, že nezávislost zamítáme i tak s velkou jistotou.

Zajímavá je otázka, pro která plemena platí výrazně odlišná pravděpodobnost zabřeznutí, než je celkový průměr. To zjistíme z porovnání tabulky pozorovaných četností s tabulkou teoretických četností:

Tabulka č. 18 : Úspěšnost zabřeznutí dle plemene – teoretické četnosti.

plemeno	zabreznuti_0 - 1		Součet
	0	1	
neapolsky mastin	1,9	12,1	14
yorkshirsky terier	1,8	11,2	13
australsky honacky pes	1,1	6,9	10
zlaty retrivr	1,4	8,6	8
stredoasijsky pastevecký pes	0,8	5,2	6
Součet	7	44	51

Vidíme, že se výrazně liší hodnoty v obou tabulkách pouze u středoasijského pasteveckého psa. Skutečně, kdybychom jej vyřadili, dostáváme p - hodnotu 0,07 se závěrem, že u ostatních plemen se pravděpodobnost zabřeznutí signifikantně neliší. Můžeme tedy učinit závěr, že středoasijský pastevecký pes má signifikantně nižší pravděpodobnost zabřeznutí, než ostatní plemena.

4. Nezávislost předchozího krytí feny a úspěšnosti zabřeznutí

Tabulka č. 19 : Úspěšnost zabřeznutí dle předchozího krytí feny

kryti_drive_fena_0 - 1	zabreznuti_0 - 1		Součet
	0	1	
0	13	45	58
1	8	32	40
Součet	21	77	98

p - hodnota testu je 0,775 ; nulovou hypotézu nezamítáme. Úspěšné zabřeznutí feny nemá vliv na to, zda před tím byla či nebyla úspěšně kryta.

5. Nezávislost předchozího krytí psa a úspěšnosti zabřeznutí

Tabulka č. 20 : Úspěšnost zabřeznutí feny dle předchozího krytí psa

	zabreznuti_0 - 1		
kryti_drive_pes_0 - 1	0	1	Součet
0	8	26	34
1	13	53	66
Součet	21	79	100

p - hodnota testu je 0,656 ; nulovou hypotézu nezamítáme. Úspěšné zabřeznutí feny nemá vliv na to, zda byla či nebyla kryta psem, který již kryl.

6. Nezávislost faktu, zda fena měla štěňata, a úspěšnosti zabřeznutí

Tabulka č. 21 : Úspěšnost zabřeznutí feny pokud měla již v minulosti štěňata

	zabreznuti_0 - 1		
stenata_drive_fena_0 - 1	0	1	Součet
0	16	51	67
1	5	23	28
Součet	21	74	95

p - hodnota testu je 0,519 ; nulovou hypotézu nezamítáme. Úspěšné zabřeznutí feny nemá vliv na to, zda v minulosti již měla nějaké vrhy štěňat.

7. Nezávislost faktu, zda pes měl štěňata, a úspěšnosti zabřeznutí

Tabulka č. 22 : Úspěšnost zabřeznutí feny po psovi, který měl již v minulosti štěňata

	zabreznuti_0 - 1		
stenata_drive_pes_0 - 1	0	1	Součet
0	8	28	36
1	13	51	64
Součet	21	79	100

p - hodnota testu je 0,822 ; nulovou hypotézu nezamítáme. Úspěšné zabřeznutí feny nemá vliv na to, zda byla kryta psem, který již měl v minulosti štěňata.

8. Nezávislost kvality spermatu a zabřeznutí

Tabulka č. 23 : Úspěšnost zabřeznutí feny, která byla oplodněna ejakulátem různé kvality

	zabreznuti_0 - 1		
kvalita_spermatu_0 - 1- 2	0	1	Součet
0	8	39	47
1	2	2	4
2	8	25	33
Součet	18	66	84

Tabulka teoretických četností obsahuje pole s hodnotami menšími než 5. Proto test platí jen přibližně. P-hodnota je 0,268 ; hypotézu nezamítáme.

9. Nezávislost věku feny a zabřeznutí

Feny jsme rozdělili dle věku do tří skupin:

- Skupina 0 – feny mladší než 3 roky
- Skupina 1 – feny od 3 let (včetně), mladší 5 let
- Skupina 2 – feny staré alespoň 5 let

Tabulka č. 24 : Úspěšnost zabřeznutí na věku feny

Věk feny - skupina	zabreznuti_0 - 1		
	0	1	Součet
0	3	17	20
1	12	40	52
2	6	18	24
Součet	21	75	96

Tabulka teoretických četností obsahuje pole s hodnotami menšími než 5. Proto test platí jen přibližně. P - hodnota 0,692.

10. Nezávislost věku psa a zabřeznutí

Psy jsme rozdělili dle věku do tří skupin:

- Skupina 0 – psy mladší než 3 roky
- Skupina 1 – psy od 3 let (včetně), mladší 5 let
- Skupina 2 – psy staré alespoň 5 let

Tabulka č. 25 : Úspěšnost zabřeznutí feny na věku psa

Věk psa - skupina	zabreznuti_0 - 1		
	0	1	Součet
0	5	21	26
1	7	18	25
2	9	36	45
Součet	21	75	96

Tabulka teoretických četností obsahuje pole s hodnotami menšími než 5. Proto test platí jen přibližně. P - hodnota 0,688.

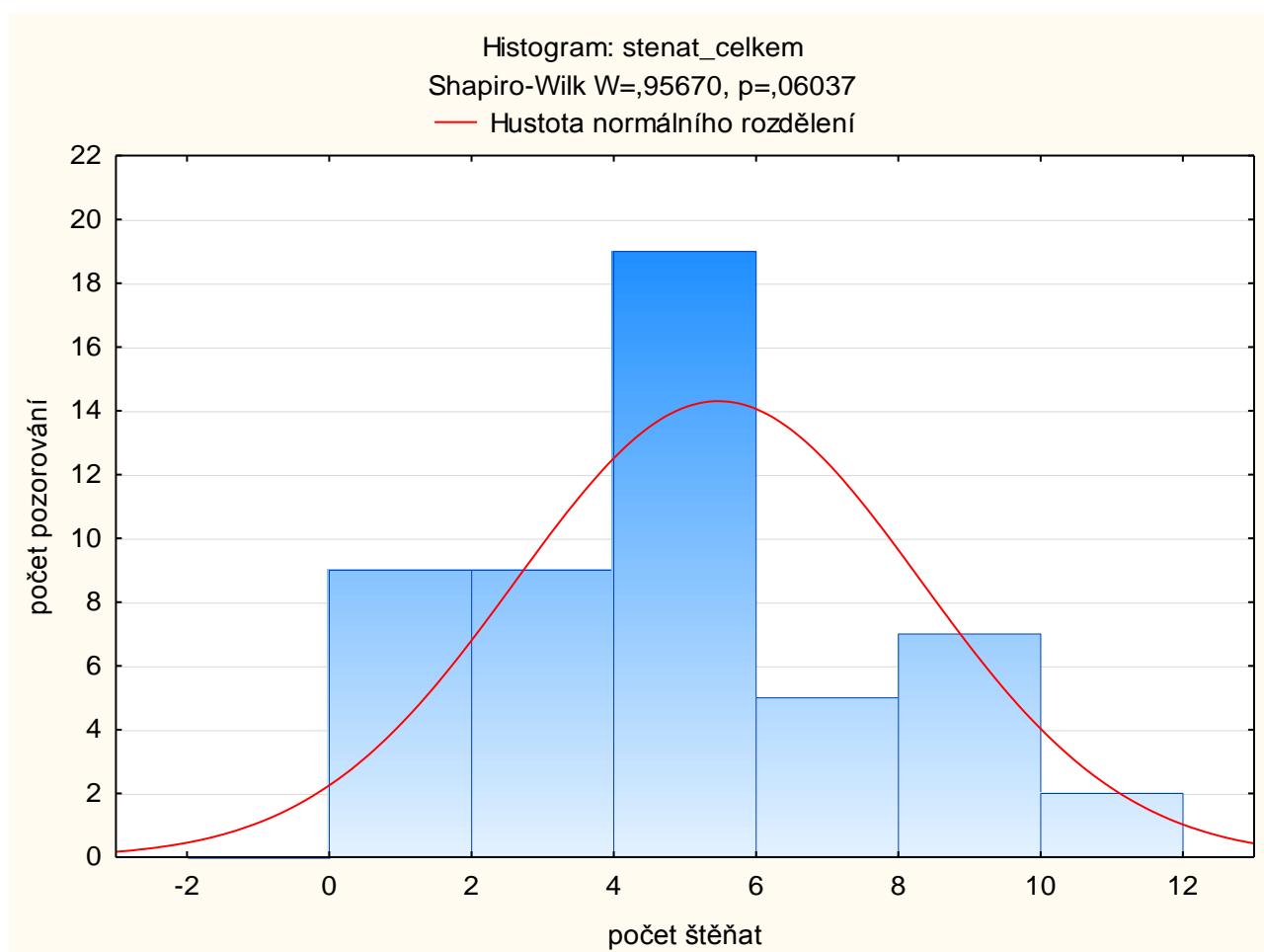
II. Závislost pravděpodobnosti porodu na různých faktorech

Vzhledem k tomu, že porod proběhl u všech fen, které zabřezly, s jednou výjimkou, jejíž statistickou významnost nelze určit na souboru 130 pozorování, odkážeme se v této části na závěry, týkající se pravděpodobnosti zabřeznutí, dle jednotlivých faktorů.

III. Počet štěňat v závislosti na různých faktorech

Vraťme se k Tabulce č. 11 – zde jsme nezamítli normalitu rozdělení počtu štěňat na hladině 5 %. To lze ilustrovat histogramem v Grafu č. 3 :

Graf č. 3 : Histogram počtu štěňat a jeho srovnání s hustotou normálního rozdělení



Jelikož normalita nebyla zamítnuta, můžeme vliv změny jednotlivých faktorů na počet štěňat měřit pomocí analýzy rozptylu (ANOVA).

Očekáváme, že faktory, na kterých může záviset počet štěňat, jsou zejména věk psa a feny, a taktéž fakt, zda pes či fena měli již v minulosti štěňata. Test je sestaven následovně:

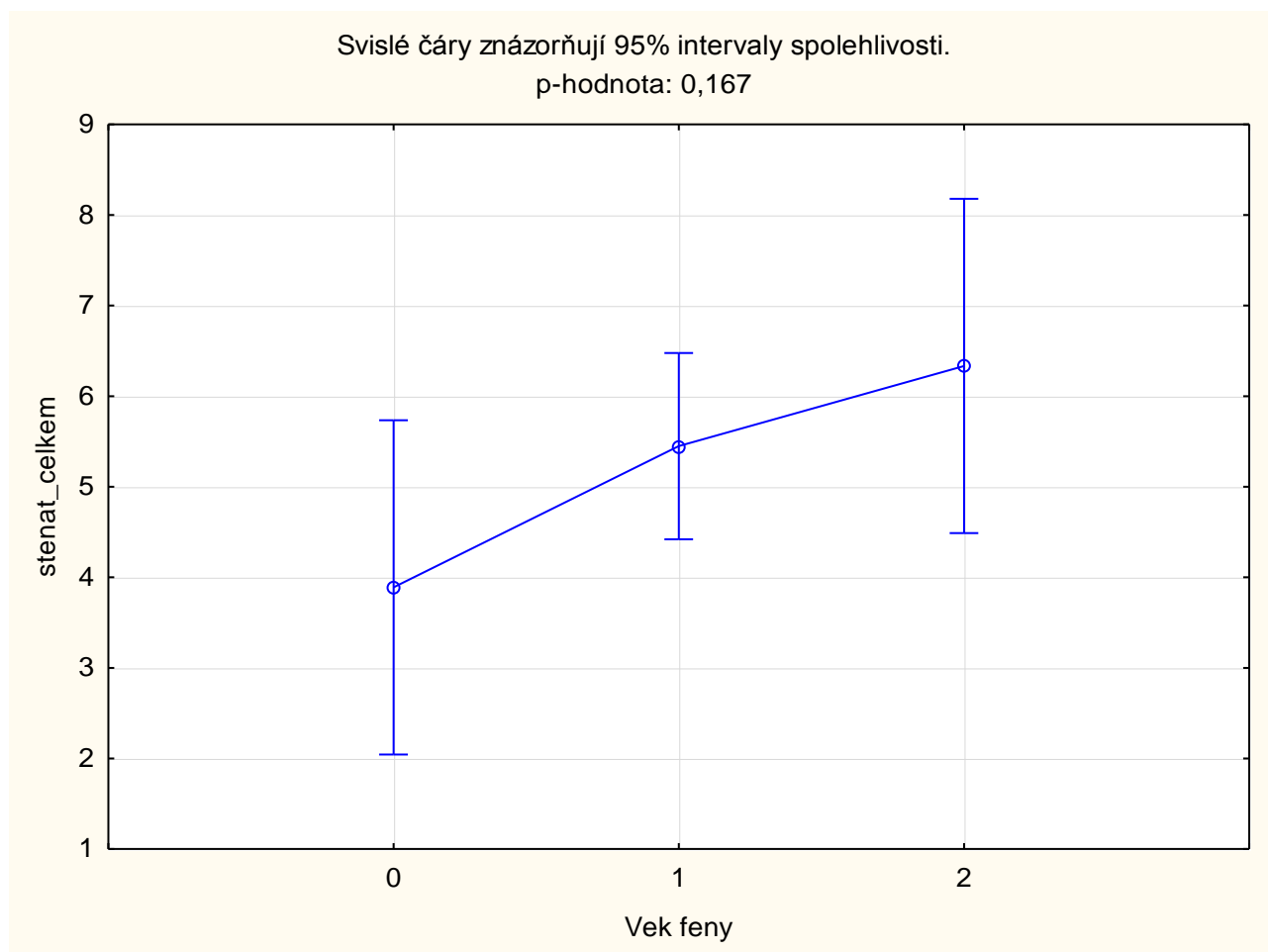
Nulová hypotéza : Očekávaný počet štěňat nezávisí na hodnotě faktoru F

Alternativní hypotéza : Očekávaný počet štěňat závisí na hodnotě faktoru F

Testy jsou provedeny v programu Statistica, ten udělal většinu práce za nás. Proto neuvádíme podrobnosti metody ANOVA.

1. Nezávislost počtu štěňat na věku feny

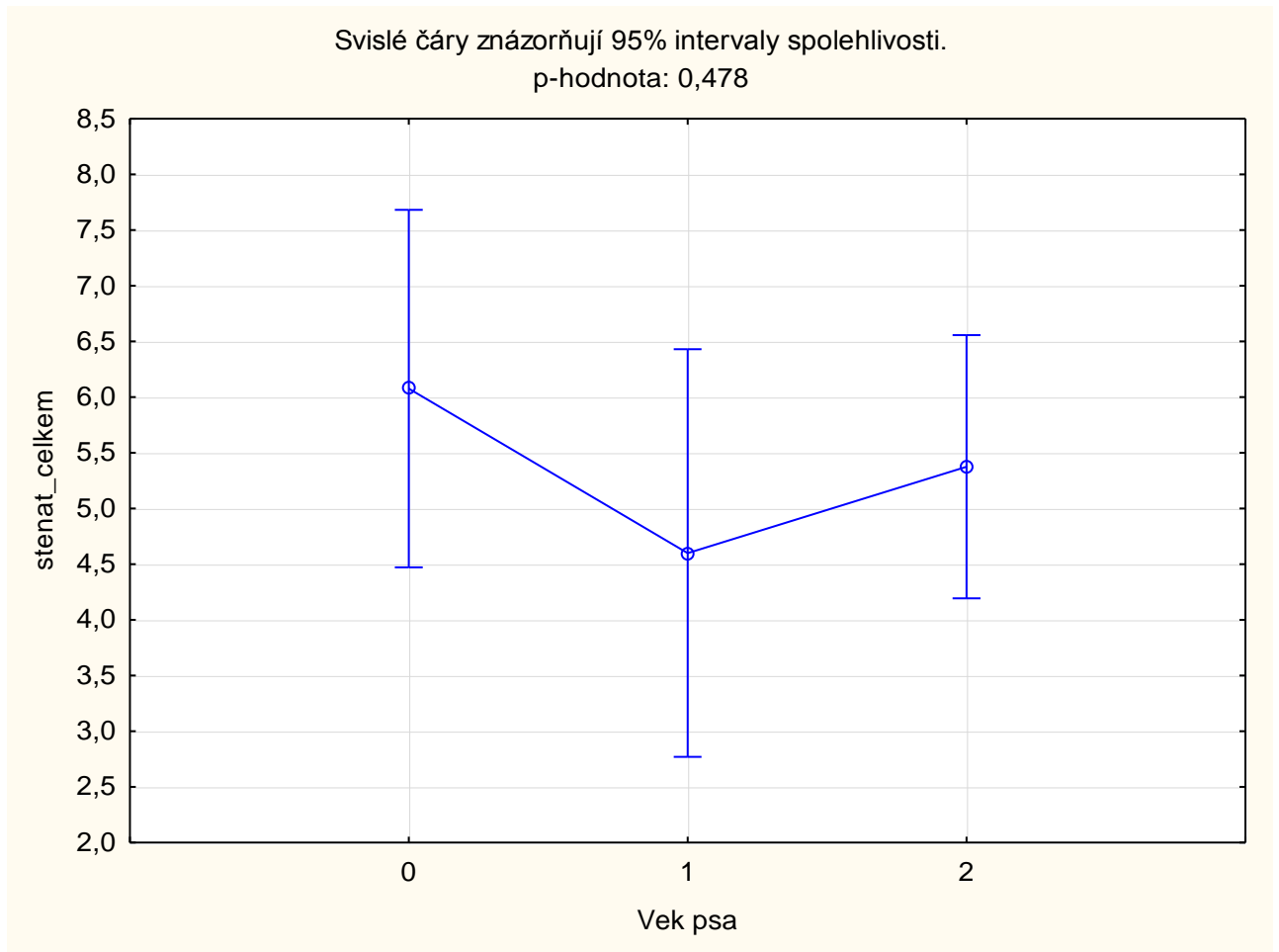
Graf č. 4 : Závislost počtu štěňat na věku feny, metodou ANOVA.



P - hodnota testu je 0,167. Závislost nezamítáme. Svislé čáry v grafu udávají 95 % konfidenční intervaly pro počet štěňat v jednotlivých věkových skupinách fen.

2. Nezávislost počtu štěňat na věku otce

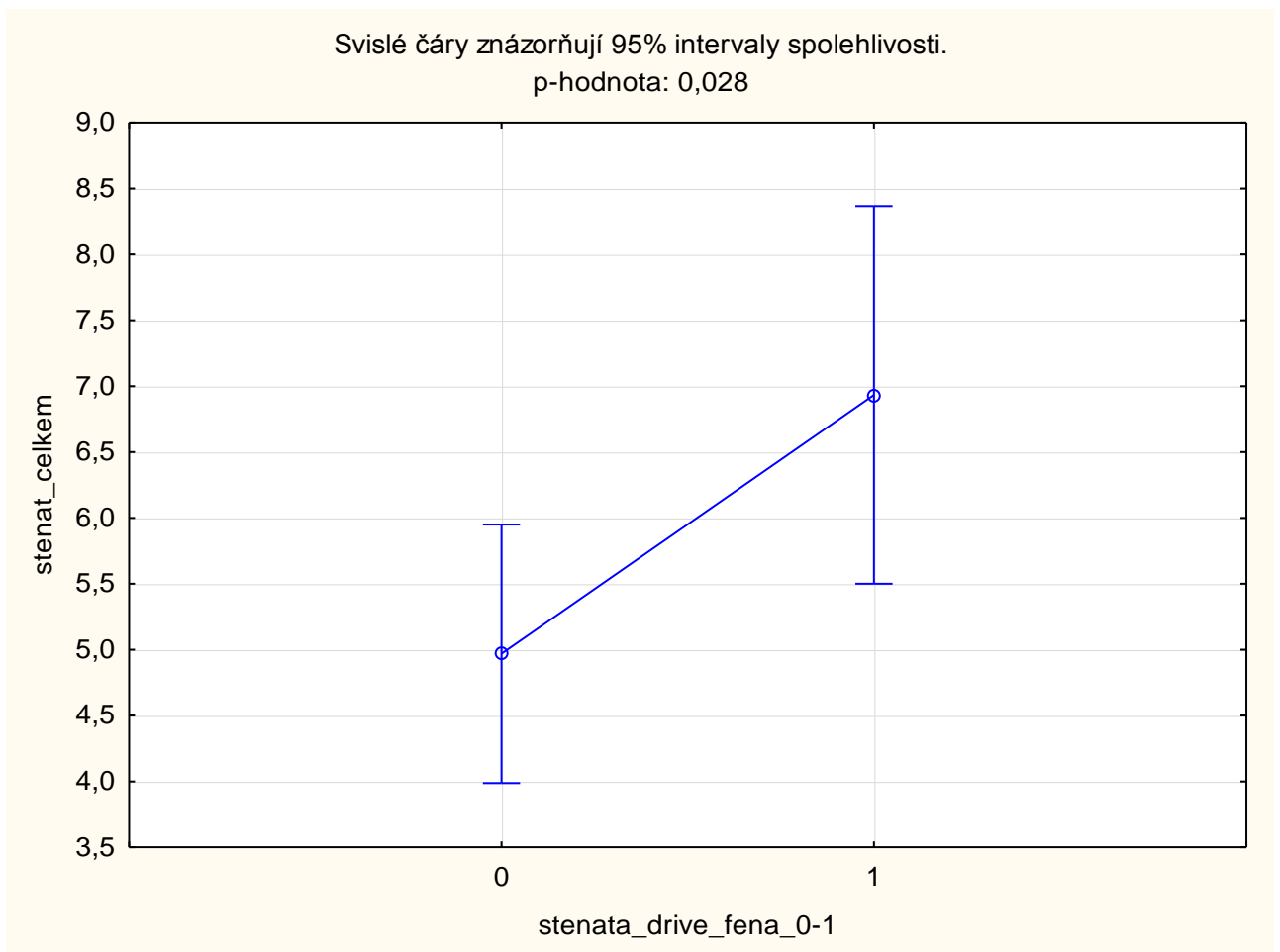
Graf č. 5 : Nezávislost počtu štěňat na věku psa



P - hodnota testu je 0,478. Nezávislost nezamítáme. Počet štěňat ve vrhu nezávisí na věku psa.

3. Nezávislost počtu štěňat na tom, zda měla fena štěňata v minulosti

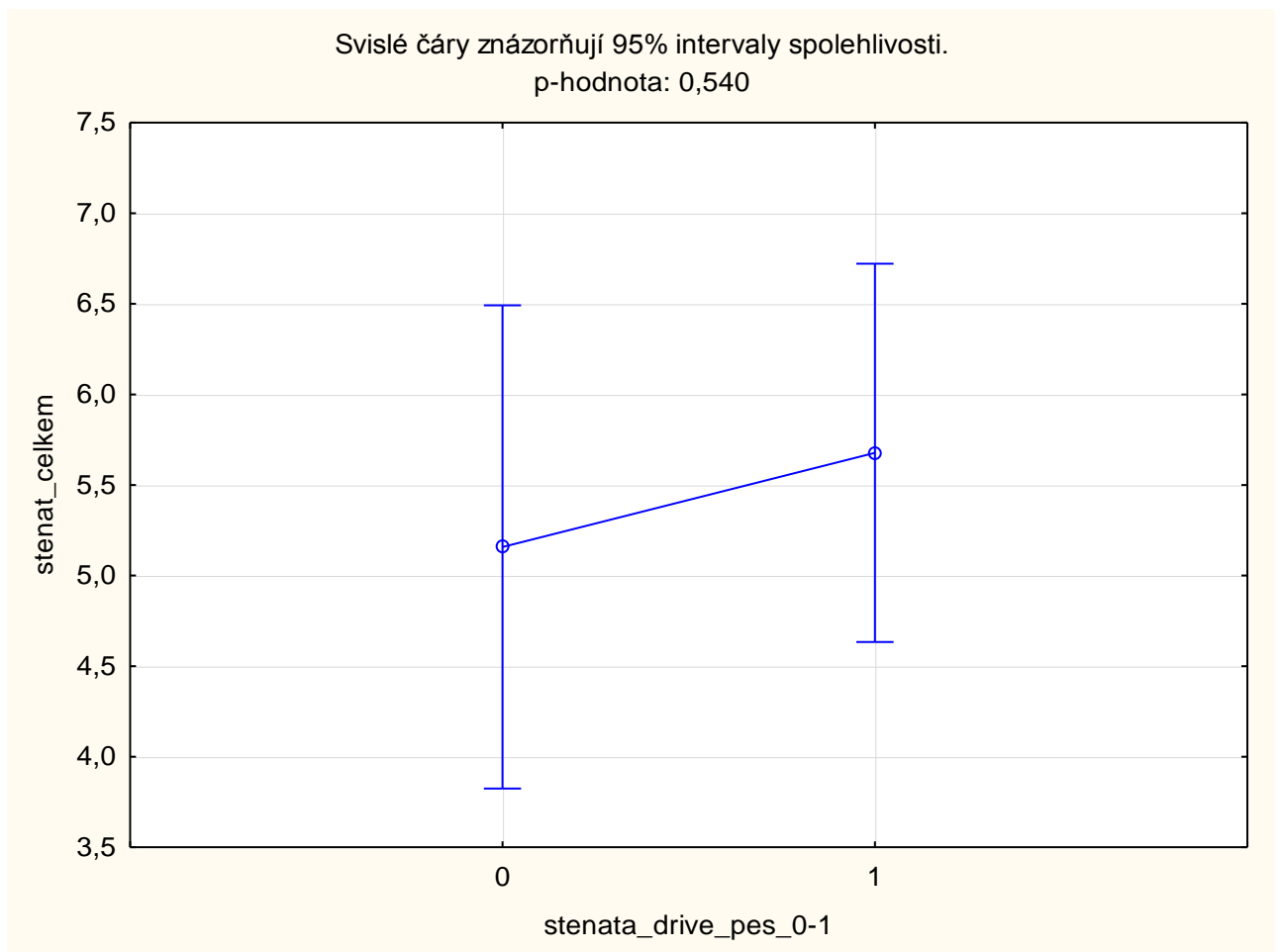
Graf č. 6 : Nezávislost počtu štěňat na existenci předchozího vrhu feny



P - hodnota je rovna 0,028 ; proto zde nezávislost již nezamítáme. Jak vidno, u prvorodiček je menší očekávaný počet štěňat než u fen, které již štěňata měly. P - hodnota je menší než 0,05. Velikost vrhu tedy závisí na tom, zda fena již měla v minulosti nějaká štěňata.

4. Nezávislost počtu štěňat na tom, zda měl pes - otec štěňata v minulosti

Graf č. 7 : Nezávislost počtu štěňat psa na existenci předchozího vrhu, v němž by byl otcem



Platí $p = 0,540$; proto v tomto případě nezávislost nezamítáme. Velikost vrhu nezávisí na tom, zda byl otec štěňat již v minulosti otcem.

5.2 Progesteron

Hodnoty jednotlivých proměnných

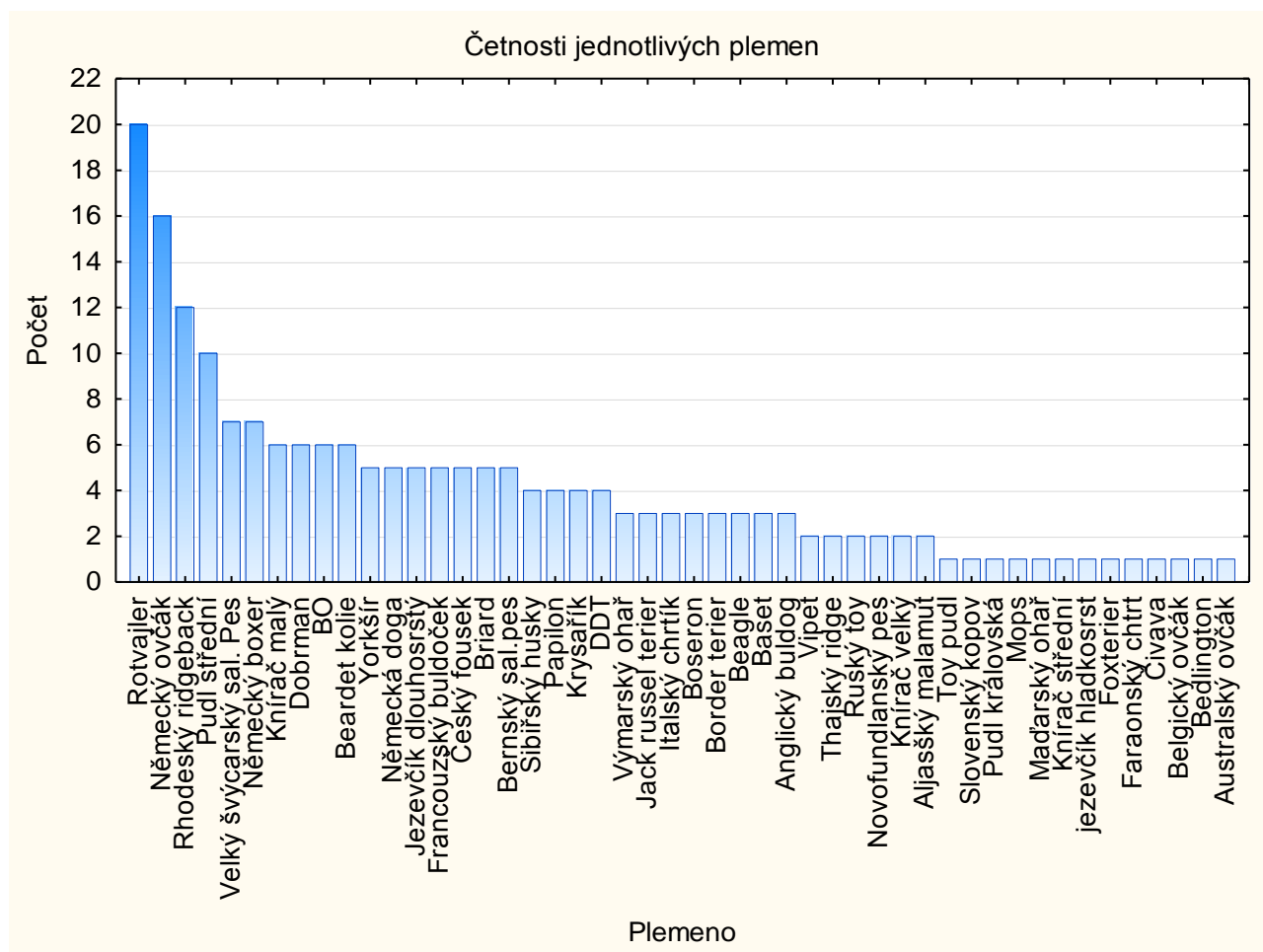
Nejprve se pokusíme popisnou statistikou charakterizovat data.

Tabulka č. 26 : Přehled hodnot číselně udávaných proměnných. Jednotlivé statistiky jsou spočteny pouze z nechybějících hodnot.

	Deskriptivní statistika								
	Platný h	Průměr	Celkem "ano"	95% int. sp olehlivosti	Median	Minimu m	Maximu m	Sm.Odc hylka	Normalita
Vek	196	5,15	na	na	5,0	1,0	9,0	2,05	0,000
Den harani	196	10,40	na	na	10,0	2,0	22,0	3,63	0,003
Progesteron	196	6,70	na	<6,09-7,31>	6,1	0,1	20,1	4,30	0,000
Krytí dvakrát	196	0,53	103	,455-0,596	1,0	0,0	1,0	0,50	0,000
Den krytí 1	196	12,17	na	na	12,0	2,0	24,0	3,77	0,102
Den krytí 2	103	12,95	na	na	13,0	6,0	21,0	3,29	0,183
Porod_0-1	196	0,80	156	,739-0,853	1,0	0,0	1,0	0,40	0,000
Pocet stenat	196	3,87	na	<3,43-4,32>	4,0	0,0	11,0	3,17	0,000

Sloupce po řadě udávají počet platných hodnot, průměr, počet potvrzení (u binárních proměnných), 95 % konfidenční interval pro průměr, medián, minimum, maximum a velikost směrodatné odchylky hodnot dané proměnné. Sloupec „ Normalita “ udává p - hodnotu pro Shapiro - Wilkův test ověřující, zda hodnoty mohou pocházet z normálního rozdělení. Je - li p - hodnota menší než 0,05 ; můžeme platnost hypotézy o normalitě zamítnout na běžně používané hladině 5 %. Vidíme, že normální rozdělení připouštíme pouze u dne krytí. Dvakrát bylo kryto 103 fen.

Graf č. 8 : Přehled hodnot proměnné Plemeno.



V sadě dat je přítomno 48 různých plemen.

Tabulka č. 27 : Tabulka Pearsonových korelačních koeficientů

Variable	Zvýrazněné hodnoty jsou významné na hladině 0,05						
	Vek	Den harani	Progesteron	Den kryti 1	Den kryti 2	Porod_0 1	Pocet stenat
Vek	1,00	-0,06	0,16	-0,13	-0,16	-0,12	-0,18
Den harani	-0,06	1,00	0,19	0,84	0,82	0,04	0,10
Progesteron	0,16	0,19	1,00	-0,17	-0,21	-0,07	-0,06
Den kryti 1	-0,13	0,84	-0,17	1,00	0,99	0,01	0,15
Den kryti 2	-0,16	0,82	-0,21	0,99	1,00	0,02	0,14
Porod_0-1	-0,12	0,04	-0,07	0,01	0,02	1,00	0,57
Pocet stenat	-0,18	0,10	-0,06	0,15	0,14	0,57	1,00

Z tabulky je (bohužel pro další analýzy) vidno, že silně korelované jsou pouze časové proměnné, což je nezajímavé a fakt, že proběhl porod, s počtem štěňat, což je očekávané. Údaje v tabulce nicméně slouží pouze pro orientační představu.

Testy hypotéz

1. Závislost proměnné porod na výši progesteronu.

Jedná se o binární proměnnou a zajímá nás její závislost na proměnné spojité. V programu R modelujeme tuto závislost logistickou regresí. Dostáváme následující výstup:

```
Call:
glm(formula = porod ~ progesteron, family = binomial(link = logit))

Deviance Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.9006   0.6026   0.6530   0.6900   0.8479

Coefficients:
            Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept)  1.63533    0.34052   4.802 1.57e-06 ***
progesteron -0.03967    0.04075  -0.974   0.33
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)

    Null deviance: 198.36  on 195  degrees of freedom
Residual deviance: 197.41  on 194  degrees of freedom
AIC: 201.41
```

Jelikož u proměnné „ progesteron “ figuruje jako regresor hodnota blízká nule (-0,03967) a jelikož p - hodnota její signifikace (p - hodnota = 0,33) výrazně překračuje hodnotu 0,05 ; nezamítáme hypotézu, že zabřeznutí nezávisí na výši progesteronu.

K podobným závěrům dojdeme, rozdělíme - li si hodnoty výše progesteronu do dvou skupin dle hodnoty 6 ng / ml, která je blízká mediánu a testujeme - li závislost klasickým chí - kvadrát testem :

Tabulka č. 28 : Závislost úspěšnosti zabřeznutí na výši progesteronu

	Porod_0 - 1		Součet
	0	1	
Progesteron \geq 6 ng / ml	17	75	92
Progesteron < 6 ng / ml	23	81	104
Součet	40	156	196

p-hodnota 0,528 ; nezamítáme nezávislost.

Výsledky získané oběma postupy (závislost nebyla prokázána) jsou v souladu s výší korelačního koeficientu mezi oběma proměnnými - 0,07 ; což je číslo blízké nule. Viz Tabulka č. 27.

Jak se ukáže, tento test byl příliš hrubý. Rozdělíme-li si feny nyní do čtyř skupin, dle výše hladin progesteronu, místo dvou, budou závěry jiné. Pro následné závěry bude vhodné, budou-li skupiny podobně četné. Dle tohoto požadavku volíme prahové hodnoty pro zařazení fen do skupin.

Výše progesteronu není závislá na schopnosti zabřeznutí. Jde ale o fakt, že hodnota progesteronu stále stoupá a jde o naměřenou hodnotu v den, kdy obvykle ještě nedochází ke krytí.

Tabulka č. 29 : Závislost úspěšnosti zabřeznutí na výši progesteronu, čtyři skupiny, pozorované četnosti

Počet z plemeno	porod		Celkový součet
	0	1	
pásma progesteronu			
0 - (0 ng / ml – 4 ng / ml)	13	37	50
1 - (4 ng / ml – 6,05 ng / ml)	4	44	48
2 - (6,05 ng / ml – 9,8 ng / ml)	8	42	50
3 - Více než 9,8 ng / ml	15	33	48
Celkový součet	40	156	196

Zde je hypotéza nezávislosti již jednoznačně vyvrácena – na p - hodnotě 0,0251. Pravděpodobnost zabřeznutí tedy závisí na výši progesteronu v době měření. Abychom zjistili, která pozorování vedou k zamítnutí hypotézy, sestavme tabulku teoretických četností

a červeně znázorníme pole, kde je teoretická četnost menší než pozorovaná (k jevům, popsaným v těchto polích, docházelo častěji, než by v případě nezávislosti mělo).

Tabulka č. 30 : Závislost úspěšnosti zabřeznutí na výši progesteronu, čtyři skupiny, teoretické četnosti

pásmo progesteronu	0	1	Celkový součet
0	10,204	39,79591837	50
1	9,7959	38,20408163	48
2	10,204	39,79591837	50
3	9,7959	38,20408163	48
Celkový součet	40	156	196

Vidíme, že nejméně úspěšně zabřezávaly feny z prostředních dvou skupin 1 a 2. Nyní je třeba zjistit, co to říká o výši hladiny progesteronu v den krytí.

Změříme - li v jednotlivých skupinách průměrný počet dní, po kterém byly poprvé kryty, od dne měření progesteronu, dostáváme následující hodnoty: 4,16 pro skupinu 0, 1,27 pro skupinu 1, 1,04 pro skupinu 2 a 0,54 pro skupinu 3. Vzhledem k tomu, že hladina progesteronu roste v době hárání v průměru rychlostí asi 2 ng / ml za den (Lázníčka, 1994), lze odhadnout průměrnou hladinu v době krytí následovně :

(odhadnutá hladina v době krytí) = (hladina v době měření) + 2 x (průměrná délka prodlevy)

Tabulka č. 31 : Odhadnutá hladina progesteronu v den krytí pro skupiny 1 a 2

Skupina	Hladina v den měření	Průměrný nárůst za den	Průměrný počet dní	Hladina v den krytí
1- spodní mez	4	2	1,27	6,54
1 – horní mez	6,05	2	1,27	8,59
2 – spodní mez	6,05	2	1,04	8,13
2 – horní mez	9,80	2	1,04	11,88

Vidíme, že skupiny 1 a 2, které vykazovaly nejvyšší úspěšnost porodu, byly kryty v době, kdy měly hladinu progesteronu odhadnutou v rozmezí 6,54 – 11,88 ; což je v souladu s teoretickými výsledky.

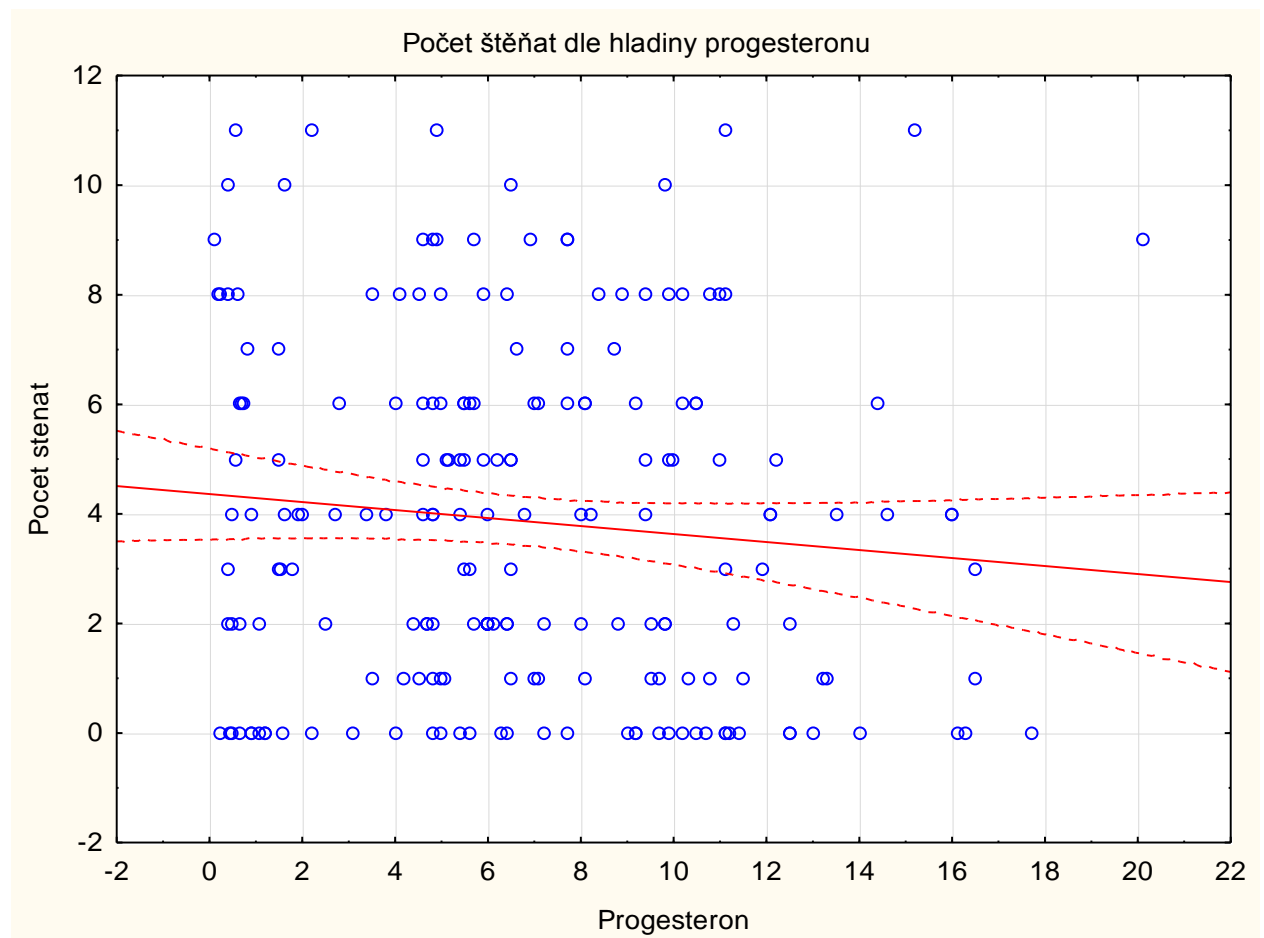
Poznamenejme, že rychlost růstu hladiny progesteronu je u jednotlivých fen značně různá, navíc je silně korelovaná s původním zařazením feny do skupiny. Jelikož tuto proměnnou nemáme změřenu, nemůžeme pracovat jinak, než s odhady, a se statistickou jistotou potvrdit nebo vyvrátit hypotézu o vhodné hladině progesteronu v den krytí.

2. Závislost počtu štěňat na výši progesteronu

Jedná se o dvě spojité proměnné. Proto jejich vzájemnou závislost můžeme měřit Pearsonovým korelačním koeficientem. Jeho hodnota je $-0,064$. Program Statistica nepovažuje tuto hodnotu za signifikantní, zdá se tedy, že počet štěňat a hladina progesteronu budou dvě nekorelované veličiny.

To ověříme grafem:

Graf č. 9 : Počet štěňat dle hladiny progesteronu



Data zjevně neprokazují velkou závislost obou proměnných. Klesající regresní přímka odpovídá zápornému korelačnímu koeficientu. Tento sklon je však nesignifikantní – lze totiž nahlédnout, že vodorovná přímka, odpovídající odhadu počtu štěňat pouze pomocí jejich průměru, ke kterému vede přijetí faktu, že hodnota progesteronu nemá na počet štěňat vliv, stále leží v pásu spolehlivosti, vyznačeném čárkovaně (znázorněný pás spolehlivosti navíc odpovídá normálnímu rozdělení počtu štěňat, jelikož jsme však normalitu zamítli, je skutečný pás spolehlivosti širší).

5.3 Srovnání přípravků Receptal, Supergestran a Pregnyl

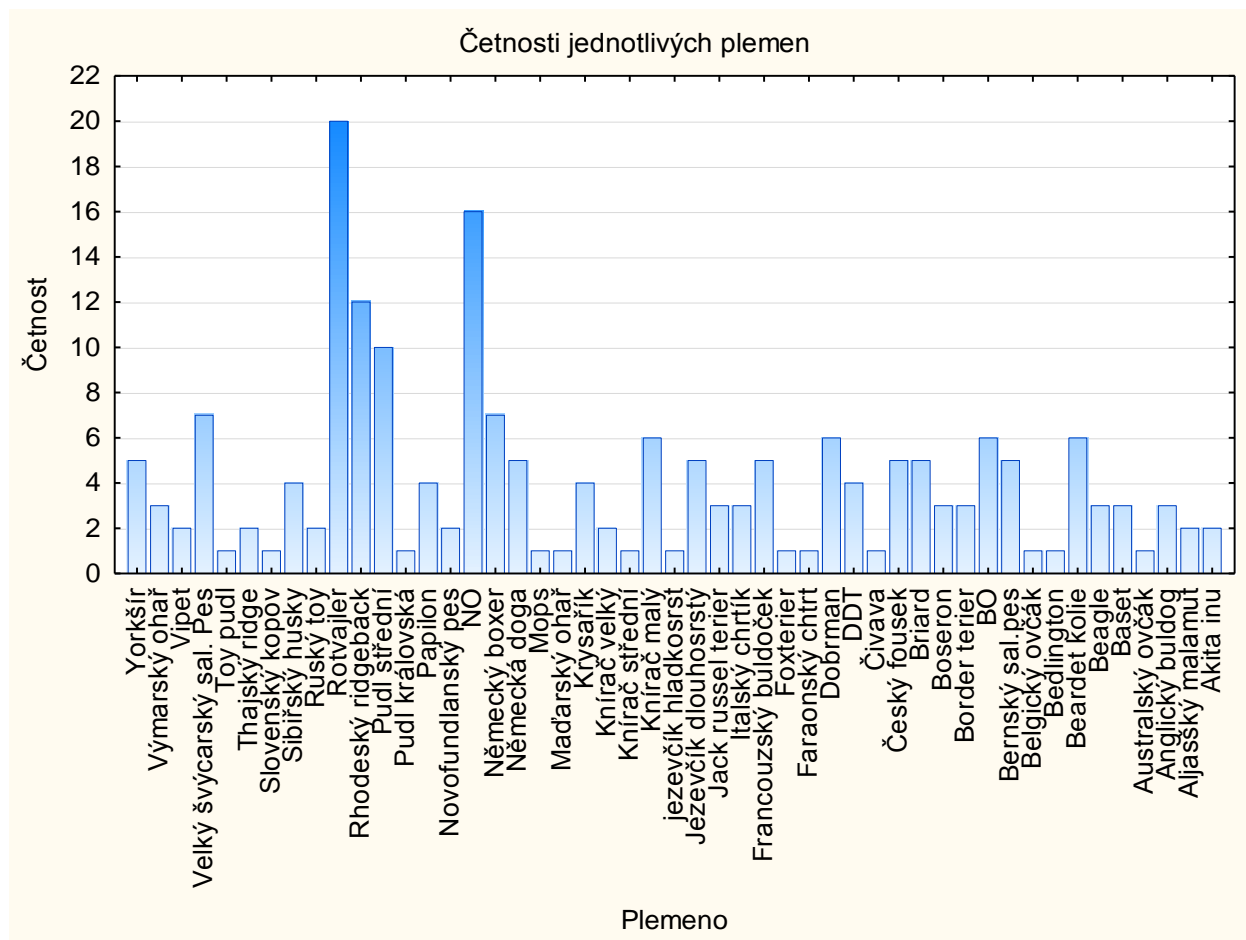
Hodnoty jednotlivých proměnných

Nejprve se pokusíme popisnou statistikou charakterizovat data.

Tabulka č. 32 : Přehled hodnot číselně udávaných proměnných. Jednotlivé statistiky jsou spočteny pouze z nechybějících hodnot.

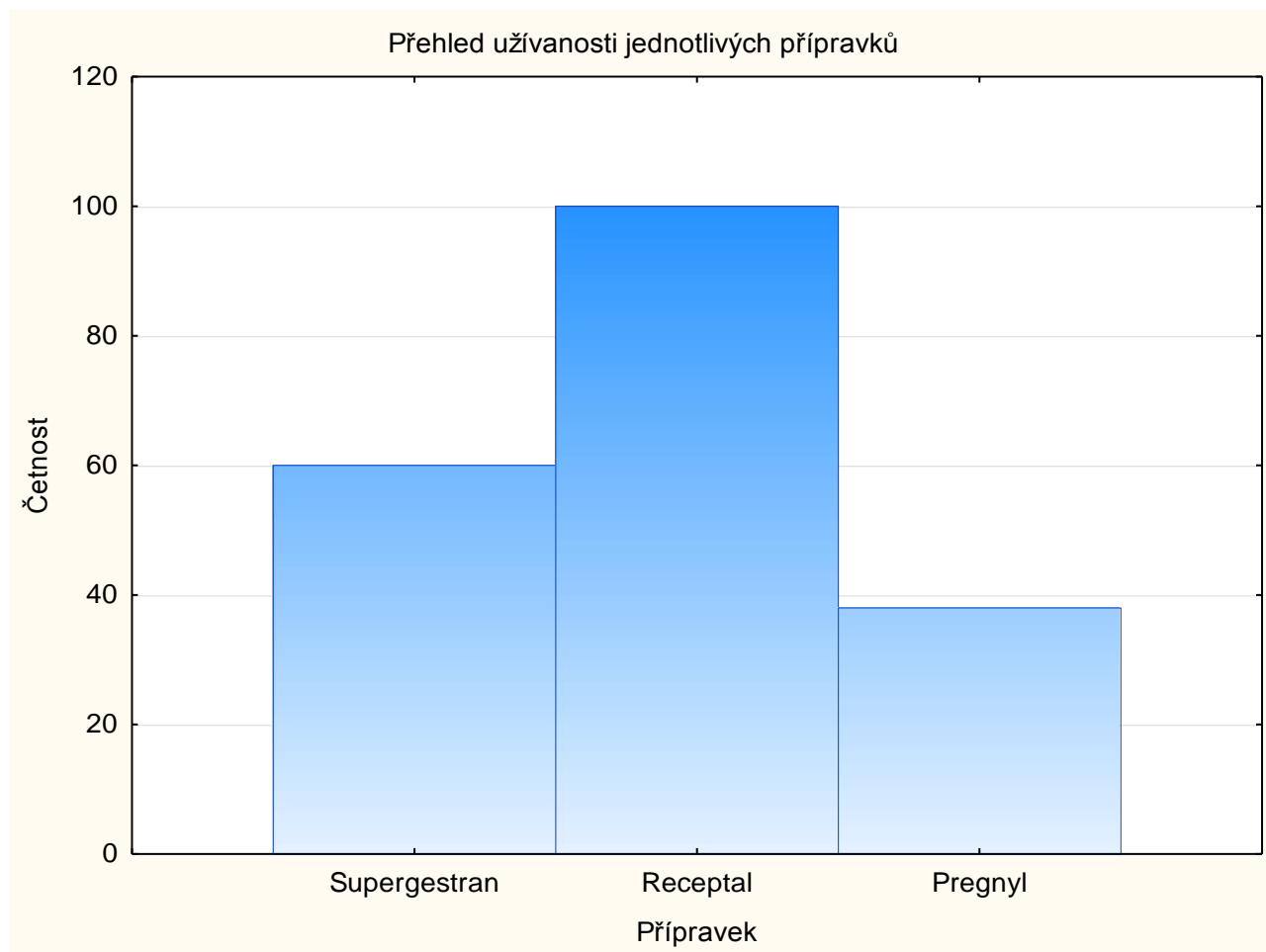
	Deskriptivní statistika								
	Platných	Průměr	Počet "ano"	95% int. spolehlivosti	Median	Minimum	Maximum	Sm. Odchylka	Normalita
ROKY	198	5,12	na	na	5,0	1,0	9,0	2,06	0,000
Den hárání	198	10,63	na	na	10,0	1,0	21,0	3,99	0,000
Progesteron původně	198	6,78	na	<5,99-7,58:	6,1	0,1	21,1	5,66	0,000
Progesteron za 2 dny	198	10,25	na	<9,24-11,25:	8,2	0,5	30,1	7,19	0,000
Abs. rozdíl	198	3,46	na	<3,10-3,82:	3,3	-5,6	14,0	2,58	0,000
Opakovaná aplikace	198	0,53	105,0	na	1,0	0,0	1,0	0,50	0,000
Krytí	198	0,93	184,0	na	1,0	0,0	1,0	0,26	0,000
Opakované krytí	198	0,47	94,0	na	0,0	0,0	1,0	0,50	0,000
Den 1	184	12,23	na	na	12,0	0,0	23,0	4,05	0,216
Den 2	94	13,30	na	na	13,0	6,0	23,0	3,37	0,042
Porod	198	0,72	142,0	<0,654-0,780	1,0	0,0	1,0	0,45	0,000

Graf č. 10 : Přehled plemen



V sadě dat je přítomno 49 různých plemen.

Graf č. 11 : Přehled užívání jednotlivých přípravků



Tabulka č. 33 : Tabulka Pearsonových korelačních koeficientů

Korelační matice, zvýrazněné hodnoty jsou signifikantní na hladině 0,05.

	ROKY	Den hárání	Progesteron původně	Progesteron za 2 dny	Abs. rozdíl	Opakovaná aplikace	Den 1	Den 2	Porod	Počet štěňat
ROKY	1,00	-0,22	-0,09	-0,09	-0,06	0,03	-0,18	-0,18	-0,07	-0,13
Den hárání	-0,22	1,00	0,35	0,32	0,13	-0,08	0,74	0,76	0,03	-0,07
Progesteron původně	-0,09	0,35	1,00	0,96	0,47	-0,63	-0,06	-0,04	0,09	0,07
Progesteron za 2 dny	-0,09	0,32	0,96	1,00	0,71	-0,72	-0,07	-0,06	0,13	0,10
Abs. rozdíl	-0,06	0,13	0,47	0,71	1,00	-0,68	-0,08	-0,08	0,19	0,13
Opakovaná aplikace	0,03	-0,08	-0,63	-0,72	-0,68	1,00	0,18	0,16	-0,16	-0,17
Den 1	-0,18	0,74	-0,06	-0,07	-0,08	0,18	1,00	0,98	0,03	-0,06
Den 2	-0,18	0,76	-0,04	-0,06	-0,08	0,16	0,98	1,00	0,05	-0,06
Porod	-0,07	0,03	0,09	0,13	0,19	-0,16	0,03	0,05	1,00	0,54
Počet štěňat	-0,13	-0,07	0,07	0,10	0,13	-0,17	-0,06	-0,06	0,54	1,00

Testy hypotéz

V první části se zaměříme na velikost změny hladiny progesteronu.

1. Statistická významnost velikosti změny hladiny progesteronu

Pro účely testu považujeme populaci za homogenní, nerozlišujeme tedy, jaký přípravek byl aplikován. Testujeme významnost změny hladiny progesteronu (proměnná „ Abs. Rozdíl “) proti hodnotě 0. Jedná se o známý jednovýběrový t - test (data sice nesplňují podmínku normality, při počtu větším než 19 však tuto podmínku nepožadujeme, jsou - li rozumně rozdělená (Anděl, 2003).

Nulovou hypotézou zde je, že změna je ve střední hodnotě nulová.

Tabulka č. 34 : Test hypotézy o statistické významnosti změny velikosti hladiny progesteronu.

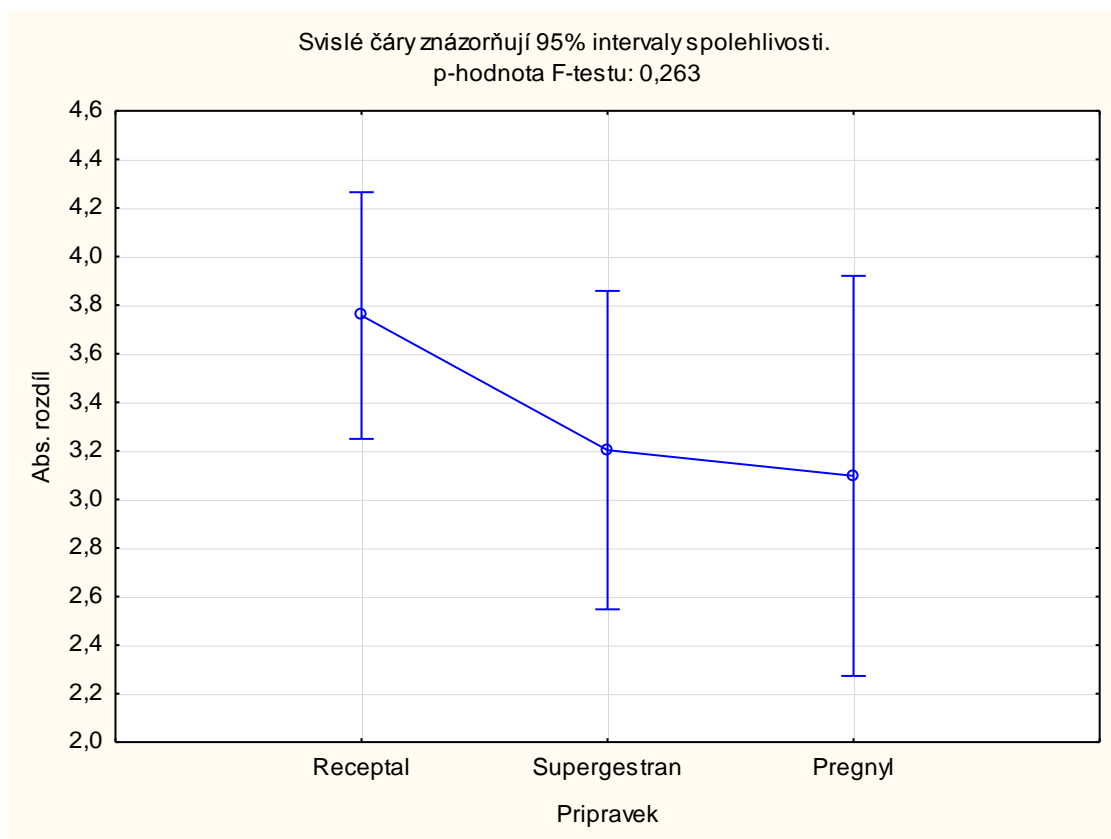
Variable	All Groups Test of means against reference constant (value) (statistika_komplet)							
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference Constant	t-value	df	p
Abs. rozdíl	3,46252	2,57973	198	0,18333	0,00	18,8864	197	0,0000

Vidíme, že nulovou hypotézu test zamítá na p - hodnotě 0, nárůst progesteronu je tedy statisticky významný. To nás nepřekvapuje, dle Tabulky č. 32 má se spolehlivostí 95 % střední nárůst hladiny hodnotu mezi 3,10 – 3,82 ng / ml.

2. Rozdíl v účinnosti jednotlivých přípravků

Chceme rozhodnout, zda má hodnota kategoriální proměnné „Přípravek“ signifikantní vliv na střední hodnotu. Použijeme tedy analýzu rozptylu (anova).

Graf č. 12 : Rozdíl v účinnosti přípravků



Z grafu je zřejmé, že na pozorovaných datech vykazuje sice nejlepší výsledky Receptal, následován Supergestranem a Pregnylem, nicméně statisticky významný tento rozdíl není.

5.4 Srovnání pravděpodobnosti porodu dle typu krytí

Zajímavou otázkou je, jak je úspěšné zabřeznutí po krytí formou inseminace, ve srovnání s přirozeným krytím.

Data

Použijeme data ze dvou tabulek – z tabulky, ve které se zabýváme úspěšností inseminace, a z tabulky, ve které měříme hodnoty progesteronu, ovšem bez toho, abychom jej fenám uměle dodávali (v tomto průzkumu máme informaci pouze o porodu, nikoliv o zabřeznutí, proto budeme hypotézu formulovat vzhledem k existenci porodu). Data z průzkumu, v jehož rámci byl progesteron fenám uměle dodáván, nevyužíváme, jelikož je v něm pracováno s fenami, které mají se zabřeznutím potíže, proto je nelze považovat za nezávislý vzorek. Při zpracování dat řešíme tyto těžkosti, týkající se dat ohledně inseminace :

- Informaci o zabřeznutí / nezabřeznutí máme pouze u 102 fen z původních 130.
- Ve stejném průzkumu máme pouze u 78 fen informaci, zda porodily (u 57 z těch, které zabřezly, z nich porodilo 56, zbylých 21 jsou feny, u kterých víme, že nezabřezly, tudíž ani neprodily)

Zmíněné problémy nastávají z důvodu, že majitelé často s fenami přestali chodit na kontroly, čímž zmenšili sběr informací. Tyto těžkosti budeme řešit následovně:

Omezíme vzorek fen, oplodněných formou inseminace, na 78 pozorování fen, u kterých víme, zda porodily (56 ano, 22 ne).

Tento přístup je striktní a nepracuje se žádnými spekulacemi. Dále je tento přístup konzistentní s přístupem, použitým pro získání dat do průzkumu, týkajícího se měření progesteronu (zde taktéž feny, které přestaly chodit, byly vyřazeny).

Výsledky

Srovnání jsme provedli formou dvouvýběrového Studentova t - testu rovnosti středních hodnot dvou výběrů. Tento test můžeme provést – jeho předpokladem je, že průměr z obou výběrů má normální rozdělení. Tento předpoklad je asymptoticky splněn díky centrální limitní větě.

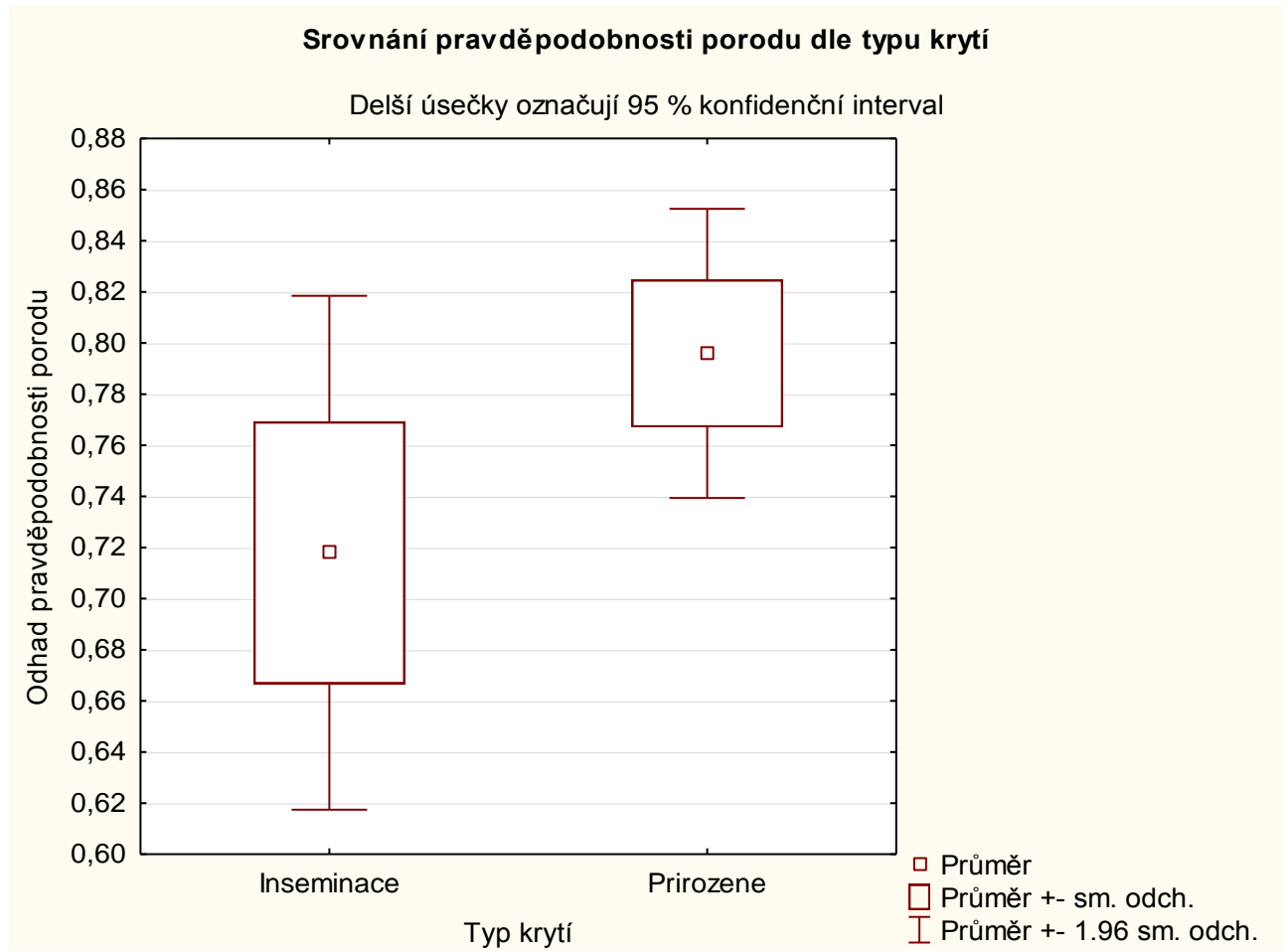
Tabulka č. 35 : Test rovnosti středních hodnot pro pravděpodobnost porodu po oplodnění formou inseminace, ve srovnání s přirozeným krytím.

T-tests; Grouping: Typ (srovnaniX)					
Group 1: Inseminace					
Group 2: Prirozene					
Variable	Mean Inseminace	Mean Prirozene	p	Valid N Inseminace	Valid N Prirozene
porod	0,718	0,796	0,165	78	196

Vidíme, že p - hodnota je 0,165, tudíž nemůžeme zamítnout shodu středních hodnot pro pravděpodobnost porodu. Nicméně z tabulky je vidět, že střední úspěšnost přirozeného krytí je 79,6 %, což je o 7,8 % více, než střední úspěšnost inseminace (71,8 %). Lze tak spekulovat, že při zvětšení vzorku by se ukázalo přirozené krytí jako signifikantně lepší, než inseminace.

Výsledky lze ilustrovat i krabicovým diagramem:

Graf č. 13 : Srovnání rovnosti středních hodnot pro pravděpodobnost porodu po oplodnění formou inseminace, ve srovnání s přirozeným krytím.



6 Diskuze

Cílem práce bylo ověřit na základě dat z výběrových souborů hypotézy H_1 (Feny nejvíce zabřezávají po krytí při koncentraci progesteronu 7 - 14 ng / ml (je to optimální koncentrace pro krytí)) a H_2 (Feny po inseminaci nativním spermatem vykazují horší výsledky zabřezávání než feny po přirozeném krytí).

Na základě toho byl dále vyhodnocen vliv stanovování koncentrace progesteronu z krve fen na schopnost zabřezávání a případně odhaleny další závislosti zabřeznutí feny na vysvětlujících proměnných.

Dále byla zjišťována na základě výběrových souborů schopnost zabřeznout při inseminaci nativním semenem a v neposlední řadě porovnávána úspěšnost zabřeznutí po inseminaci nativním semenem a po přirozeném krytí.

Data byla získávána ze soukromé veterinární kliniky MVDr. A. Láznický, který je odborníkem v oblasti reprodukce zvířat. Data související s inseminací poskytla veterinární laboratoř Vedilab z Plzně.

Celkem byla inseminace prováděna u 46 plemen. Zastoupení plemen, která podstoupila inseminaci bylo velmi různorodé, nicméně větší výskyt byl zaznamenán u plemen neapolský mastin, jorkšířský teriér, australský honácký pes, zlatý retrívr a středoasijský pastevecký pes. V mém výběrovém souboru byla zaznamenána možnost horšího zabřezávání fen u plemene středoasijský pastevecký pes. Jedná se však zřejmě o náhodnost výběru (např. feny z jedné chovatelské stanice), protože nebylo žádným autorem potvrzeno, že by feny plemene středoasijský pastevecký pes vykazovaly horší výsledky zabřezávání při inseminaci nativním semenem než plemena ostatní.

Při inseminaci, která byla prováděna vícekrát, nebyla zjištěna závislost mezi počtem inseminací a schopností lépe zabřeznout. Hegstad et al. (1989) však uvádí, že šanci na úspěšné zabřeznutí zvýšíme, pokud ještě inseminujeme za další 2 dny po přirozeném krytí nebo za 2 dny po dosažení hodnoty progesteronu 4 až 10 ng / ml.

Kudláč (1972) říká, že úspěšnost umělé inseminace čerstvým spermatem se pohybuje kolem 70 – 80 %, lze tedy předpokládat, že úspěšnost bude menší než při přirozeném krytí. Mé studie ukázaly, že úspěšnost přirozeného krytí je 71,8 % ; což koresponduje s výsledky autora.

Mé výsledky taktéž korespondují s Kudláč a kol. (1987) , který uvádí, že úspěšnost umělé inseminace je třeba očekávat vždy menší než při přirozeném krytí. Úspěšnost inseminace konzervovaným semenem při deponování semene do pochvy výrazně snižuje

omezená způsobilost spermií k průniku přes ochranné bariéry v pohlavním traktu feny, především přes děložní krček %.

V našich pokusech byla inseminace prováděna pouze intravaginálně. Jak uvádí Linde – Forsberg (2000), nejvyšší úspěšnost zabřezávání je inseminací přímo do dělohy čerstvým semenem. Velikost vrhu, ale nemá vliv, zda inseminujeme do pochvy či dělohy. Taktéž velikost vrhu nezávisí na tom, zda použijeme při inseminaci semeno nativní, chlazené či mražené.

Linde – Forsberg (2000) uvádí, že inseminací nativním semenem v jejích pokusech celkem zabřezlo 65,2 % fen. Mé studie ukázaly, že úspěšnost zabřeznutí prostřednictvím inseminace nativním semenem je 71,8 % ; což je o 7,8 % méně, než při přirozeném krytí (79,6 %). Lze tak spekulovat, že při zvětšení vzorku by se ukázalo přirozené krytí jako signifikantně lepší, než inseminace.

Farstad (1984) ve svém průzkumu uvádí, že bylo sledováno 92 fen různých plemen, které byly přirozeně kryty a inseminovány nativním semenem. Po přirozeném krytí zabřezlo 92 % fen. Při inseminaci nativním semenem pouze 84 %. Inseminováno bylo přímo do dělohy. To potvrzuje hypotézu H₂, že feny po inseminaci nativním spermatem vykazují horší výsledky zabřezávání než feny po přirozeném krytí.

Další výsledky práce ukázaly, že úspěšné zabřeznutí feny nemá vliv na to, zda před tím byla či nebyla úspěšně kryta a zda byla kryta psem, který již v minulosti kryl.

Taktéž nemá úspěšné zabřeznutí feny vliv na to, zda v minulosti již měla nějaké vrhy štěnat či zda byla kryta psem, který již měl v minulosti štěňata.

Lze předpokládat, že úspěšnost inseminace na kvalitě ejakulátu záleží. Poskytnutá data ukazují na nestandardizované závěry o kvalitě. Dotyčný vyplnil data neúplně a lze předpokládat i problematické a nejednotné rozdělení kvality ejakulátu na tři skupiny 0 – 1 – 2. Nula odpovídá špatnému hodnocení, jednička průměrnému, dvojka odpovídá dobré kvalitě ejakulátu.

Mé studie ukázaly, že věk feny nezávisí na tom, zda úspěšněji zabřezne či ne. Nejlépe se v našem pozorování jevila skupina fen kategorie 0, tedy feny mladší tří let. Naopak Fieni et al. (2001) uvádí, že nejlepší věk pro první krytí feny je od tří let.

Věk psa v mé práci neprokázal vliv na úspěšné zabřeznutí feny. Nejlépe se v našem pozorování jevily dvě skupiny psů, mladších tří let a starších pěti let.

Dále bylo z poskytnutých dat zjištěno, že nejčastěji se velikost vrhu po inseminaci pohybovala mezi čtyřmi a šesti štěňaty.

V našem výzkumu jsme dospěli k závěru, že věk feny pravděpodobně bude záviset na velikosti vrhu. Nejpočetnější vrhy měly feny ve skupině 2, kde byl věkový průměr 5,66 roků, tj. většina z nich byla stará 5 nebo 6 let. Naopak jsme ale dospěli k závěru, že počet štěňat ve vrhu nezávisí na věku psa – otce štěňat, ani na tom, zda byl již v minulosti otcem.

Jak vidno, u prvoroďiček je menší očekávaný počet štěňat než u fen, které již štěňata měly. Velikost vrhu tedy závisí na tom, zda fena již měla v minulosti nějaká štěňata.

Další výsledky práce ukázaly, že počet štěňat a hladina progesteronu budou dvě nekorelované veličiny, tedy na sobě nezávislé.

Při prvním měření hladiny progesteronu v krvi fen byly feny rozděleny do dvou skupin dle výše progesteronu. Při takovémto rozdělení výsledky ukázaly, že zabřeznutí nezávisí na výši progesteronu.

Ve druhém pozorování byly feny rozděleny již podrobněji, do čtyř skupin. Zde již výsledky ukázaly, že pravděpodobnost zabřeznutí na výši progesteronu závisí. Jde o to, že známe hodnotu progesteronu v den měření, nikoli však většinou v den krytí.

Vidíme, že neúspěšněji zabřezávaly feny z prostředních dvou skupin 1 a 2. Progesteron u skupiny č. 1 se pohyboval v rozmezí 4,0 – 6,05 ng / ml. U skupiny č. 2 to byla hodnota 6,05 – 9,8 ng / ml. V další studii autorů Edqvist et al. (1975) se ukázalo, že zabřezla většina fen, krytých ve fázi estru s hladinami progesteronu 10 ng / ml. To koresponduje s mými výsledky.

Změříme - li v jednotlivých skupinách průměrný počet dní, po kterém byly poprvé kryty, ode dne měření progesteronu, dostáváme následující hodnoty : 4,16 pro skupinu 0 ; 1,27 pro skupinu 1 ; 1,04 pro skupinu 2 a 0,54 pro skupinu 3. Vzhledem k tomu, že hladina progesteronu roste v době hárání v průměru rychlostí asi 2 ng / ml za den, lze odhadnout průměrnou hladinu progesteronu v době krytí (Láznička, 1994).

Vidíme, že skupiny 1 a 2, které vykazovaly nejvyšší úspěšnost porodu, byly kryty v době, kdy měly hladinu progesteronu odhadnutou v rozmezí 6,54 – 11,88 ; což je v souladu s teoretickými výsledky. Vitásek a kol. (2001) zmiňuje, že v případě, že hladina progesteronu byla na hodnotách 7,4 byly feny kryty nebo inseminovány ihned (rozmezí progesteronu od 7,4 do 18 ng / ml).

England et al. (2010) uvádí, že nejvhodnější doba pro krytí je při koncentraci progesteronu 10 – 25 ng / ml. To opět koresponduje s mými výsledky.

Fieni et al. (2001) uvádí ve svém článku, že většina fen byla úspěšně nakryta psem při koncentraci progesteronu $12,8 \pm 3,8$ ng / ml. To koresponduje s mými výsledky.

Vitásek a kol. (2011) ve své studii uvádí, že v letech 1998 - 2000 bylo na klinice porodnictví, gynekologie a andrologie FVL VFU Brno vyšetřeno 120 fen různého stáří (1,5 - 6 let) a plemen, u kterých byly v průběhu hárání jednorázově či opakovaně stanovovány koncentrace progesteronu v krevním séru. Na základě zjištěných hodnot progesteronu byly feny pozvány na opakované vyšetření, případně byl doporučen termín krytí podle předem zvoleného schématu : při zjištěných hodnotách progesteronu pod 2 ng / ml - opakování vyšetření za 3 - 5 dní ; 2 - 3 ng / ml - opakování vyšetření nebo krytí za 3 - 4 dny ; 3,1 - 4,5 ng / ml - krytí za 2 - 3 dny ; 4,6 - 8 ng / ml - krytí za 1 - 2 dny ; 8,1 - 16 ng / ml – okamžité krytí. Hodnoty progesteronu 8,1 – 16 ng / ml a následné doporučení okamžitého krytí korespondují s mými výsledky.

Kudláč a kol. (1987) uvádí, že za nejpriznivější koncentraci progesteronu pro krytí se tak považují hodnoty v rozmezí 8 – 13 ng / ml. Hodnoty převyšující toto rozmezí poukazují na pozdní estrus nebo časný diestrus, kdy možnost koncepce rychle zaniká.

Vitásek a kol. (2011), uvádí, že optimální dobou k okamžité inseminaci je koncentrace progesteronu 8,1 - 16 ng / ml, což se blíží i mým hodnotám.

Vitásek a kol. (2012) uvádí, že při endoskopicky asistovaných transcervikálních intrauterinních inseminací zabřezlo při inseminaci nativním semenem nejvíce fen s koncentrací progesteronu od 4,4 do 19,0 ng / ml, což opět koresponduje s mými výsledky.

Faktem však je, že výši progesteronu neznáme přesně v době krytí, protože většina fen nekryje tentýž den, kdy se jim hodnota progesteronu měří. Hodnota progesteronu stále stoupá a tak lze jen předpokládat, že v době krytí bude mnohem vyšší než byla v době měření.

7 Závěr

V práci byly ověřovány dvě vědecké hypotézy H_1 a H_2 :

H_1 : Feny nejvíce zabřezávají po krytí při koncentraci progesteronu 7 - 14 ng / ml (je to optimální koncentrace pro krytí).

H_2 : Feny po inseminaci nativním spermatem vykazují horší výsledky zabřezávání než feny po přirozeném krytí.

Naším výzkumem byla zcela potvrzena hypotéza H_1 , že nejvhodnější koncentrace progesteronu pro krytí se pohybuje v rozmezí mezi 7 – 14 ng / ml (mé výsledky ukázaly na hodnoty v rozmezí 6,54 – 11,88 ng / ml). Výsledkem celé práce je poznatek, který se ztotožňuje s mnoha autory.

Při ověřování hypotézy H_2 (Výsledky inseminace nativním semenem versus přirozené krytí), také prokázaly, že střední úspěšnost přirozeného krytí je 79,6 %, což je o 7,8 % více, než střední úspěšnost inseminace (71,8 %). I druhá vědecká hypotéza, jež byla cílem mého výzkumu, se potvrdila. Lze tak spekulovat, že při zvětšení vzorku by se ukázalo přirozené krytí jako signifikantně lepší, než inseminace.

Bohužel bylo velmi nesnadné získat dostatek ucelených dat k tomu, abychom mohli vyvozovat jednoznačné a striktní závěry. Soubory byly mnohdy neúplné a mnoho údajů chybělo, proto se s nimi nedalo pracovat a byly vyřazeny. V naší republice je zatím velmi málo odborníků na tuto problematiku, kteří si vedou statistiky ohledně hodnot progesteronu a inseminací. Vzhledem k tomu, že větší množství fen po prvním změření hodnot progesteronu či provedení inseminace už nedorazilo na následnou kontrolu, nebylo možné zjistit, zda zabřezly či ne.

8 Seznam použité literatury

Allan, E., Blogg, R. 1999. Domáci lékař Vašeho psa. Nakladatelství Cesty. ISBN 80 – 7181 – 245 - 5.

Alifanov, FG. 1935. Iskusstevnenow osemenevie sobak. Abst Anim Breeding 3 : 285.

Anděl, J. 2003. Statistické metody. MATFYZpress. MFF – UK. Praha.

Arbeiter, K., Dobretsberger, M., Müller, E., Holzmann, A. 1991. Ein indirekter Nachweis der Ovulation und Fertilisation beim Hund durch Progesteronverlaufsuntersuchungen. Journal of Veterinary Medicine A. 38. S. 696 – 701.

Arnold, S., Reichler, I., Hubler, M. 2007. Clinic for Reproductive Medicine, University of Zurich (online) (cit. 12-3-2010). Dostupné z [http:// www.veterina-info.cz](http://www.veterina-info.cz)

Barlett, DJ. 1962. Studies on dog semen. I. morphological characteristics. J Reprod Fertil 3 : 173 – 189.

Bell, ET., Cristie, DW. 1971. Duration of proestrus, oestrus and vulval bleeding in the beagle bitch. Br Vet J 127 : xxv – xxvii.

Benneti, A.H., Toniollo, G.H. a Oliveria, J.A. 2004. Progesterone, estradiol β 17 and cortisol serum concentrations during late proestrus, estrus and gestational diestrus in canine female dogs. Cienc.Rural, Vol. 34, No.2, str. 471 - 478, ISSN 0130 - 8478.

Bonavet s.r.o., veterinární klinika Mladá Boleslav, (online) 2013 (cit. 6.10.2013). Dostupné z <http://www.bonavet.cz/clanky/hormonalni-antikoncepce.html>

Bondestam, S., Kärkkäinen, M., Alitalo, I. 1983. Real-time ultrasound pregnancy diagnosis in the bitch. Journal Small Animal Practise 24. 145 – 151.

Bondestam, S., Kärkkäinen, M., Alitalo I., Forss, M. 1984. Evaluating the accuracy of canine pregnancy diagnosis and litter size real-time ultrasound. Acta vet. Scand. 25, 327 – 332.

Branam, JE., Keen, CL., Ling, GV. 1984. Selected physical and chemical characteristics of prostatic fluid collected by ejaculation from healthy dogs and from dogs with bacterial prostatitis. *Am J Vet Res* 45 : 825 – 829.

Case, L. P. 2005. *The Dog: Its Behavior, Nutrition and Health*. Blakwell publishing. Ames. p. 479. ISBN 0813812542.

Concannon, PW., Hansel, W., MC Entee, K. 1977. Changes in LH progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*. 17. S. 604 – 613.

Concannon, PW., Powers, ME., Holder, W. 1977. Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* 16 : 517 – 526.

Concannon, P. W., Hansel, W. 1977. Prostaglandin F_2 induced luteolysis, hypotermia, and abortions in beagle bitches. 13 : 533 – 542.

Concannon, P. W. 1986. Canine pregnancy and parturition. *Vet Clin North Am*. 16 : 453 – 475.

Concannon, PW., Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy X*. Philadelphia. WB Saunders. p. 1247 – 1259.

Čech, E. 1974. *Ultrazvuková diagnostika v porodnictví a gynekologii*. Avicenum Praha.

De Coster, R., Beckers J., Beerens, D. 1983. A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: Plasma levels during the reproductive cycle. *Acta Endocrinol* 103 : 473 – 478.

De Cramer, KGM., 2011. Surgical uterine drainage and lavage as treatment for canine pyometra. *Journal of the south African veterinary association*. 83 (3). 172 - 177.

Doležel, R., Kudláč, E. 1997. *Veterinární gynekologie*. 144 stran. ISBN 80 – 85114 – 04 - 6.

Dostál, J. 1995. Chov psů – genetika v kynologické praxi. Dona. České Budějovice. 206 s. ISBN: 80 – 85463 – 58 - X.

Dostál, J., Hartl, K., Hřebíková, M., Němec, J., Tichá, V. 1997. Kynologická příručka pro rozhodčí, chovatele a vystavovatele. Dona. ISBN 80 – 85463 – 65 - 2.

Dostál, J., 2007. Genetika a šlechtění plemen psů. DONA. ISBN 978 – 80 – 7322 – 104 - 1.

Dubiel, A. 1976. Evaluation of semen properties and ejaculation reflex in dogs with reference to fertility. In proceedings of the International Congress on Animal Reproduction and AI. July 12 – 16. Krakow. p. 75.

Duchková, D. Vetcentrum Stodůlky, (online) 2008 (cit. 6-3-2010). Dostupné z <http://www.vetcentrum.cz>

Edquist, L. E., Johansson, E. D. B., Kasstrom, H., Olsson, S. E., Richking, M. 1975. Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrus cycle and pregnancy. Acta Endocrinol. P. 554 – 564.

Edwards, J., Mandeville, J., Slay, B. 1997. DNA and the AKC. AKC Gazette 114 : 55 – 57.

England, G. C. W. 1998. Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy terminativ. BSAWA 113 – 126.

England, G. C. W., Burgess, C. M., Freeman, S. L., Smith, S. C., Pacey, A. A. 2006. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. Theriogenology. 66 (6 – 7) : 1410 – 8.

England, G., Heimendahl, A. 2010. BSAVA Manual of Canine and feline reproduction and Neonatology. Druhé vydání. BSAVA. ISBN 978 1 905319 19 0.

Evans, JM., Anderton, DJ. 1990. Determining the optimum time to mate bitches. Veterinary practise. S. 28 – 29.

- Fair, WR., Wehner, N. 1973. The antibacterial action of canine prostatic fluid and human seminal plasma in an agar diffusion assay system. *Invest Urol* 10 : 262 – 265.
- Farstad, W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract* 25 : 561.
- Feldman, E. C., Davidson, A. P., Nelson, R. W., Nyland, T. G., Munro, C. 1993. Prostaglandin induction of abortion in pregnant bitches after misalliance. *Am Vet Med Assoc.* 202 : 1855 – 1858.
- Feldman, EC., Nelson, RW. 1996. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Feldman EC, Nelson RW. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd ed. Philadelphia; WB Saunders. Pp. 534 - 539.
- Fernandes, PA., Bowen, RA., Kostas, AC. 1987. Luteal function in the bitch : Changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. *Biol Reprod* 37 : 804 – 811.
- Fiala, L. 1986. Diagnostika gravidity pomocí ultrazvuku u domácích a exotických zvířat. *Veterinářství* 36. Strana 116 – 117.
- Fieni, F., Martal, J., Marnet, P. G., Siliart, B., Bernard, F., Riou, M., Bruyas, J. F., Tainturier, D. 2001. Hormonal variation in bitches after early or mid – pregnancy termination with aglepristone. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 57. P. 243 – 248.
- Froman, DP., Amann, RP. 1983. Inhibition of motility of bovine, canine and equine spermatozoa by artificial vaginal lubricants. *Theriogenology* 20 : 357 – 361.
- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1976. *Umelá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat*, Bratislava, nakl. Príroda.
- Ghulmiyyah, L., Sibai, B. 2012. Maternal Mortality From Preeclampsia/Eclampsia. *Seminar in perinatology*. 36 (1). 56 - 59.

- Giesenberg, S. 2004. Pseudopregnancy in the bitch. Australian veterinary practitioner. 34 (4). 164 - 168.
- Goodwin, M., Gooding, KM., Regnier, F. 1979. Sex pheromone in the dog. Science 203 : 559 – 561.
- Graham, EF., Schmehl, MKL., Nelson, DS. 1980. Problems with laboratory assays. In Proceedings of the 8th Tech Conf AI Repro. Columbia. MO. May 2 – 3. p. 1 – 8.
- Grygar, I., Kudláč, E. 1997. Ultrasonografie ve veterinárním porodnictví a gynekologii. Nakladatelství Slezan Hlučín. ISBN 80 – 901948 – 6 - 9.
- Günzel, AR., Lüning, I. 1983. Zur echographischen Trächtigkeitserkennung mit dem VETOSCAN Ultraschallgerät – Möglichkeiten und Grenzen ds Einsatzes bei der Hündin. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 90. 440 – 443.
- Günzel, AR., Klug – Simon, Ch., Peukert, A. 1985. Zum Fortpflanzungsgeschehen der Katze – korrespondierende ovarielle und vaginalzytologische Befunde. Veterinärmedizin. 9. S. 727 – 73.
- Hadley, JC. 1975. Total unconjugated oestrogen and progesterone concentration in peripheral blood during the oestrous cycle of the dog. J Reprod Fertil 44 : 445 – 451.
- Hagman, R., Lagerstedt, AS., Hedhammar, A., Egenvall, A. 2011. A breed-matched case-control study of potential risk-factors for canine pyometra. Theriogenology. 75 (7). 1251 - 1257.
- Harrop, AE. 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. Br Vet J 110 : 424 - 425.
- Hegstad, RL., Johnston, SD. 1989. Use of a rapid qualitative ELISA technique to determine serum progesterone concentrations in the bitch. Nashville. p. 277 – 287.

Hoffmann, B., Hoveler, R., Hasan, SH. 1992. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J Reprod Fertil* 96 : 837 – 845.

Holst, PA., Plemister, RD. 1974. Onset of diestrus in the beagle bitch: Definition and significance. *Am J Vet Res* 35 : 401 – 406.

Holst, PA., Plemister, RD. 1975. Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *American Journal of Veterinary Research*. 36. S. 705 – 706.

Holst, PA. 1986. Vaginal cytology in the bitch. In : Morrow, AD. : *Current Therapy in Theriogenology – Canine (VI.)*. W. B. Saunders Company. Philadelphia. S. 457 – 462.

Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. 1998. Change in semen quality and in vitro capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. *J Vet Med Sci*. 60:607 – 614.

Christensen, N.O. 1958. *Deutsch. Tierarztl. Wschr.* P. 65. 465 – 466.

Christiansen, IbJ. 1984. Reproduction in the dog. In : *Reproduction in the Dog and Cat*. Bailliere Tindall. Eastbourne. S. 1 – 221.

Jestřábová, V. 2004. *Štěňata – výživa, péče, výchova*. Dona. České Budějovice. 135 s. ISBN : 80 – 7322 – 047 - 4.

Johnston, SD. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am* 21 : 545 – 551.

Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. S. 2001. Breeding Management and Artificial Insemination of the Bitch. In: *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia. Saunders. 41 – 65.

Johnston, SD., Root – Kustritz, M., Olson, P. 2001. *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders. Philadelphia.

Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. S. 2001. Semen collection, Evaluation and Preservation. In: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia. Saunders. 287 - 306.

Jung, C., Wehrend, A., König, A., Bostedt, H. 2002. Investigations about the incidence, differentiation and microbiology of canine mastitis. *Praktische tierarzt.* 83 (6). 508 - 511.

Kim, YJ., Kim, BJ. 1995. Studies on artificial insemination with canine semen frozen using methanol and preserved in liquid nitrogen. *Kor J Vet Res.* 12 : 207 – 214.

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.

Kobilková, J., Siracký, J. 1990. *Cyodiagnostika v gynekologii.* Avicentrum. Praha. 276 s.

Kooistra, HS., Okkens, AC. 2001. Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog. *Reprod Domest Anim.* 36 (3 – 4) : 115 - 9.

Košař, P. Veterinární služby a poradenství Říčany, (online) 2004 (cit. 6 – 10 - 2013). Dostupné z http://veterina.iap.cz/zdravotni_problematika.html

Kozumplík, J. 1962. *Veterinářství* 3, str. 75 – 77.

Kudláč, E. 1972. *Veterinární porodnictví a gynekologie III.* Díl. 398 s.

Kudláč, E., Elečko, J. 1987. *Veterinární porodnictví a gynekologie.* Nakladatelství SZNP. 576 s.

Kvapil, R., Kvapilová, R., *Průvodce psí reprodukci,* Praha: J. Špičák – Tok, 2007, 78 s. ISBN 976 – 80 – 86177 -21 - 2.

Láznička, A. 1992. *Poševní cytologie v diagnostice reprodukčních stavů fen.* 1. Vydání, 32 s. Brno.

Láznička, A. 1994. Progesteronový test – I. Monitorování pohlavního cyklu u fen – endokrinologická podstata testu. Veterinářství 44. S. 256 – 258.

Láznička, A. 2011. Psí gynekolog. Časopis Psí sporty. Číslo 3. Ročník 5. Vyšlo 5.5. 2011, strana 14. Czech Press Group, a.s. ISSN 1802 – 1867.

Lévy, X., Fontbonne, A. 2007. Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. Rev Bras Reprod Anim. 31 : 128 – 134.

Lévy, X. Fontaine, E., Gellet, A. 2007. Surgical cysts removal : a new technique for the treatment of ovarian cysts in the bitch. Proceeding of the 16 th APMVEAC Congress, 5 th Biannual EVSSAR Symposium. Estoril. Portugal. P. 120.

Linde – Forsberg, C., Strom Holst, B., Govette, G. 1999. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen – thawed dog semen : A retrospective study. Theriogenology. 52 (1) : 11 – 23.

Linde – Forsberg, C. 2000. Fertility data from 2041 controlled artificial inseminations in dogs. In : Proceeding of the 4th Int Symp Canine Feline reprod. Oslo. 120 (abstr.)

Linde – Forsberg, C. 2004. University Upsala, Sweden (online) (cit. 11 – 3 - 2010)
Dostupné z [http:// www.veterina-info.cz](http://www.veterina-info.cz)

Macedo, S. P., Malm, C., Henry, M. R. J. M., Telles, L. F., Figueiredo, M. S., Fukushima, F. B., Neves, M. M., Cavalcanti, A. A. O., Chaves, M. S., Mascarenhas, R. M., Legares, M. A., Gheller, V. A. 2012. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. Res Vet Sci. 92 (3) : 494 – 500.

Madej, A., Linde – Forsberg, C., Garnum, F. 1989. A rapid radioimmunoassay for determination of LH in dogs. J Reprod Fertil Suppl 39 : 329.

Makler, A., Fisher, M., Lissak, A. 1984. A new method for rapid determination of sperm concentration in bull and ram semen. Theriogenology 21 : 543 – 554.

- Masken, JF. 1972. Circulation hormone levels in the cycling beagle. Gaines Research Center. p. 33 – 39.
- Maule, J.P. 1962. The Semen of Animals and Artificial Insemination. P. 420. ISBN – 10 : 0851981100.
- Mellin, TN., Orczyk, GP., Hichens, M. 1976. Serum profiles and luteinizing hormone, progesterone and total estrogens during the canine estrous cycle. *Theriogenology* 5 : 175 – 187.
- Michle, W. 1987. The sexual cycle in the bitch. *Clinical – Insight*. 11 : 617 – 623.
- Naxera, V. 1991. Pes a domácí lékař. CANIS. 144 stran. ISBN : 80 – 900820 – 7 - 6.
- Nishiyama, T., Kinugasa, T., Kimura, T. 1999. Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles. *J Am Anim Hosp Assoc* 35 : 348 – 352.
- Oettle, EE. 1988. Sperm abnormalities in the dog: A light and electron microscopic study. *Vet Med Rev* 59 : 28 – 70.
- Olar, TT. 1984. Cryopreservation of dog spermatozoa. PhD Dissertation. Colorado State University.
- Olson, PN., Bowen, RA., Behrendt, MD. 1982. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus, and estrus. *Biol Reprod* 27 : 1196 – 1206.
- Olson, PN., Bowen, RA., Behrendt, MD. 1984. Concentrations of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus, and early diestrus. *Am J Vet Res* 45 : 145 – 148.
- Olson, PN., Husted, PW. 1986. Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. In : Morrow, AD. : *Current Therapy in Theriogenology – Canine (VI.)*. W. B. Saunders Company. Philadelphia. S. 463 – 466.

Onclin, K., Lauwers, F., Verstegen, JP. 2001. FSH secretion patterns during pregnant and nonpregnant luteal periods and 24 h secretion patterns in male and female dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 57 : 15 - 21.

Ozyurtlu, N., Alacam, E. 2005. Effectiveness of homeopathy for the treatment of pseudopregnancy in bitches. *Turkish journal of veterinary & animal sciences.* 29 (3). 903 - 907.

Payan – Carreira, R., Miranda, S., Nizanski, W. 2011. Artificial Insemination in Dogs. In: Manafi, M., editor. *Artificial Insemination in Farm Animals.* InTech. (cited 2012 Oct 29). Available from: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs>

Phemister , RD., Holst, PA., Spano, JS. 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* 8 : 74 – 82.

Pretzer, S. D., Lillich, R. K., Althouse, G. C. 2006. Single, transcervical insemination using frozen – thawed semen in the Greyhound : A case series study. *Theriogenology.* 65 (6) : 1029 – 36.

Procházka, Z. 1989. *Chov psů.* Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 252 s. ISBN 80 – 209 – 0015 - 2.

Procházka, Z. 1994. *Chov psů. Druhé a rozšířené vydání.* ISBN 80 – 209 – 0015 - 2.

Přinosilová, P., Kopecká, V., Kunetková, M., Šípek, J. 2012. Odběr epididymálních spermií psa za účelem kryokonzervace – popis dvou případů. *Časopis Veterinární klinika.* číslo 6. ročník 9. Vydavatel Profi Press. ISSN 1214 – 6080.

Přinosilová, P. 2013. *Metody asistované reprodukce psů ve veterinární praxi. Seminář pro chovatele 24.3. 2013. Laboratoř spermatologie a andrologie Brno.*

Reimers, TJ., Phemister, RD., Niswender, GD. 1978. Radioimmunological measurement of follicle stimulating hormone and prolactin in the dog. *Biol Reprod* 19 : 673 – 679.

Rice, D. 2008. The complete book of dog breeding. Second edition. Barron's. Educational series. Inc. New York. USA. 186 p. ISBN 0 – 7641 – 3887 – 1.

Sathiamoorthy, T., Kulasekar, K., Joseph, C., Patil, M., Veerapandian, C. 2007. Clinical management of pseudopregnancy in bitches with cabergoline. Indian veterinary journal. 84 (2). 184 - 185.

Savant, Haris. M. R. N. 2005. Canine reproduction and Whelping. Dogwise publishing Fircrest. WA. 77 p. ISBN 1 – 929242 – 37 – 9.

Shille, V. a kol. 1985. The use of ultrasonography for pregnancy diagnosis in the bitch. J. Am. Vet. Med. Assoc. 187. P. 1021 – 1025.

Schlafer, DH. 2003. Pathology of the canine ovary and uterus : what 's important, what 's not. Proceedings of the SFT Annual Conference Columbus. Ohio. Pp. 212 – 220.

Schutte, AP. 1967. Canine vaginal cytology III. Compilation and evaluation of cellular Indiceschanges. Journal of Small Animal Practise. 8. S. 313 – 317.

Skalka, P. 1997. Sexuální život, březost a porod. Pes přítel člověka. Číslo 12. Strana 9.

Smith, FO. 1984. Cryopreservation of canine semen. PhD thesis. University of Minnesota.

Sokolowski, J. H. 1971. The effects of ovariectomy on pregnancy maintenance in the bitch. Lab Anim Sci. 21 : 696 – 699.

Soley, JT. Oettlé, EE. 1986. Severe sperm abnormalities with subsequent recovery following on scrotal oedema and posthitis in a bulldog. J Small Anim Pract 27 : 477 – 484.

Sova, Z., 1978. Choroby psů a jejich prevence. SZN Praha. 245 s. ISBN : 0706378.

Susi, A., Reichler, I., Hubler, M. 2007. Pyometra u fén. Pes přítel člověka č. 1. Strana 34. Clinic for Reproductive Medicine, University of Zurich.

Takeishi, M., Toyoshima, T., Ryo, T. 1975. Studies on reproduction in the dog. VI. Sexual maturity of male beagles. Bull Coll Ag Vet Med Nihon Univ 32 : 213 – 223.

Taverne, M.A.M., Okkens, AC., Oord, RV. 1985. Pregnancy diagnosis in the dog: a comparison between abdominal palpation and linear-array real-time echography. The Veterinary Quarterly 7. 249 - 255.

Thomassen, R., Sanson, G., Krogenaes, A., Fougner, J. A., Berg, K. A., Farstad, W. 2006. Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non – surgical approach. Theriogenology. 66 (6 – 7) : 1645 – 50.

Tichá, V. 2000. Malá škola pro chovatele psů. Dona. České Budějovice. 225 s. ISBN: 80 – 86136 – 84 - 1.

Tsutsui T, Shimizu T. 1973. Studies on the physiology of reproduction in the dog, I. Duration of estrus. Jap J Anim Reprod 19 : 132 - 136.

Tsutsui, T., Steward, DR. 1991. Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. J Vet Med Sci 53 : 1025 – 1029.

Vacek, Z. 1987. Vývoj pohlavních žláz a jejich vývodných cest. In : Embryologie pro pediatrii. Avicentrum. Praha. S. 215 – 225.

Van Haaften, B., Dielman, SJ., Okkens, AC. 1989. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and / or bromocriptine. J Reprod Fertil Suppl 39 : 330 – 331.

Věžník, Z. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie metodiky spermatoanalýzy. ISBN 80 – 86895 – 01 - 7.

Vitásek, R., Číhalová, P., Zajíc, J. 2001. Zkušenosti s určováním vhodné doby krytí u fen na základě koncentrace progesteronu v periferní krvi. Veterinářství 51. Strana 9 – 11.

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., Přinosilová P., Novotný R. 2012. Endoskopicky asistovaná transcervikální intrauterinní inseminace: retrospektivní studie. Veterinární klinika 9: 227 - 231.

Watts, JR., Wright, PJ. 1995. Investigating uterine disease in the bitch : uterine cannulation for cytology, mikrobiology and hysteroscopy. Journal of Small animal Practise 36. 201 – 206.

Wildt, DE., Baas, EJ., Chakraborty, Wolfle, TL., Stewart, AP. 1982. Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. Theriogenology 17 : 445 – 452.

Wilson, M. S. 1993. Non – surgical intrauterine artificial insemination in the bitches using frozen semen. J Reprod Fertil Suppl. 47 : 307 – 11.

Wilson, M. S. 2001. Transcervical insemination techniques in the bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 31 (2) : 291 – 304.

Wilson, M. S., Concannon, P.W., England, G., Verstegen, III, J., Linde – Forsberg, C. 2003. Endoscopic transcervical insemination in the bitch. A1232. 1203.

Wollrab, J. 1988. Veterinární – chovatelské aspekty kontroly reprodukce psův a mačiek. In : Gamčík, P., Busch, W., Kudláč, E. Veterinární – chovatelská kontrola reprodukcie užitočných zvierat. Příroda. Bratislava. S. 295 – 328.

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

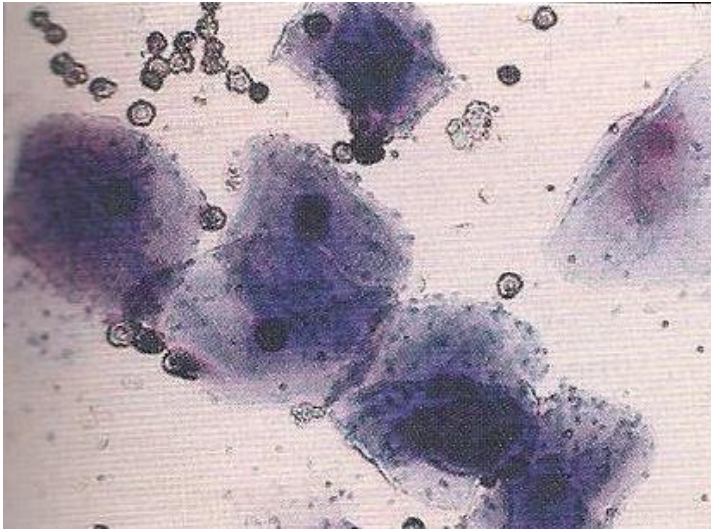
Zabel, S., Günzel – Apel, A., Bunck, C. F., Dieleman, S. J., Einspanier, A., Hopper, H. O. 2006. Concentration of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short – cycling German Shepherd dog. Theriogenology 66 : 1431 - 1435.

9 Samostatné přílohy

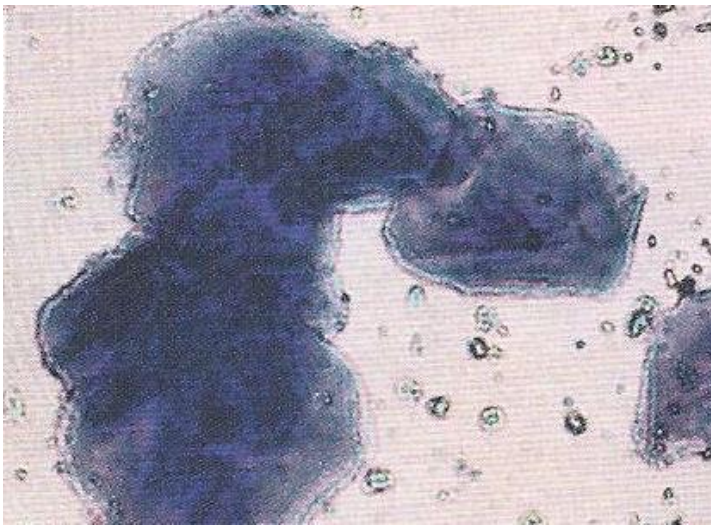
Seznam příloh

- Příloha č. 1: Vaginální cytologie : Proestrus
- Příloha č. 2: Vaginální cytologie : Estrus
- Příloha č. 3: Vaginální cytologie : Metestrus
- Příloha č. 4: Anestrus
- Příloha č. 5: Schematické znázornění estru
- Příloha č. 6: Vaginální cytologie: časný diestrus
- Příloha č. 7: Poševní cytologie
- Příloha č. 8: Poševní cytologie
- Příloha č. 9: Poševní obraz 24 hodin po koitu (estrus)
- Příloha č. 10: Znázornění vlny LH a koncentrace progesteronu
- Příloha č. 11: Endokrinologické změny během březosti a laktace
- Příloha č. 12: Prodloužený estrus
- Příloha č. 13: Folikulární cysty
- Příloha č. 14: Juvenilní vaginitida u fen
- Příloha č. 15: Vaginitis
- Příloha č. 16: Pyometra
- Příloha č. 17: Přirozené krytí feny
- Příloha č. 18: Manuální odběr semene od psa
- Příloha č. 19: Inseminace
- Příloha č. 20: Zavedení katetru při inseminaci

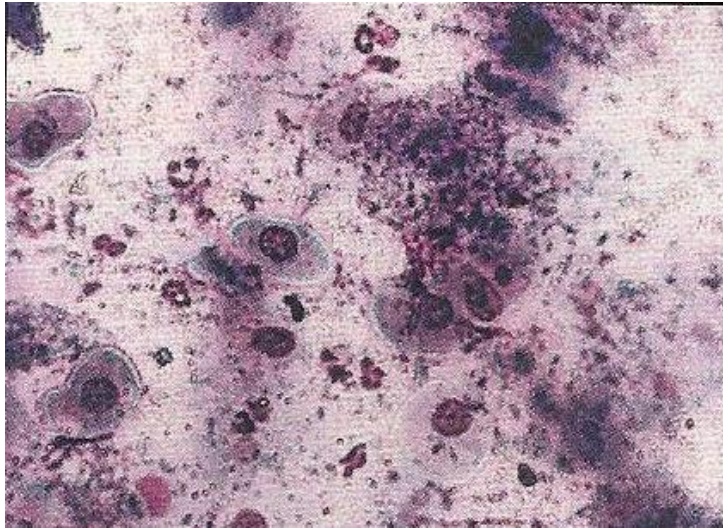
Příloha č. 1 : Vaginální cytologie : Proestrus (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 2 : Vaginální cytologie : Estrus (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 3 : Vaginální cytologie : Metestrus (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 4 : Anestrus (Láznička, 1992).



Příloha č. 5 : Schematické znázornění estru (Johnston et al., 2001).

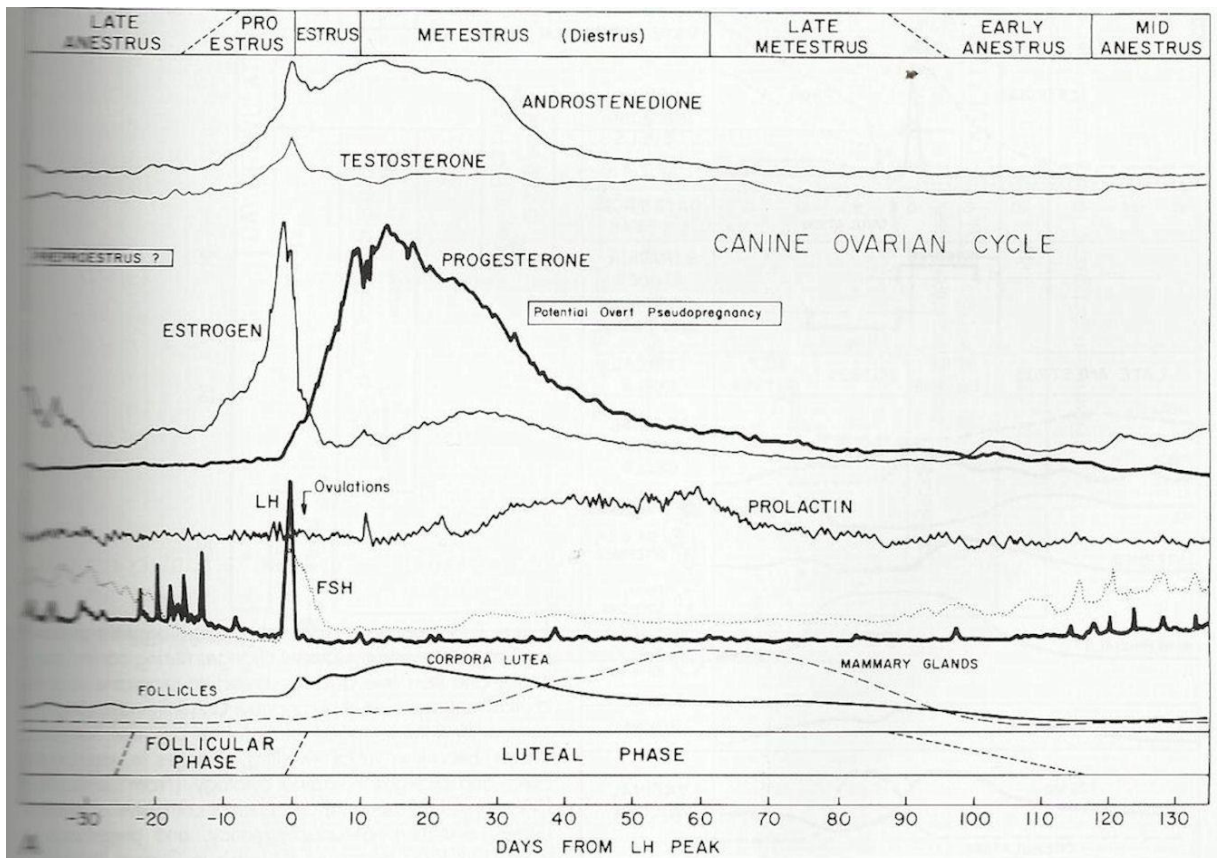
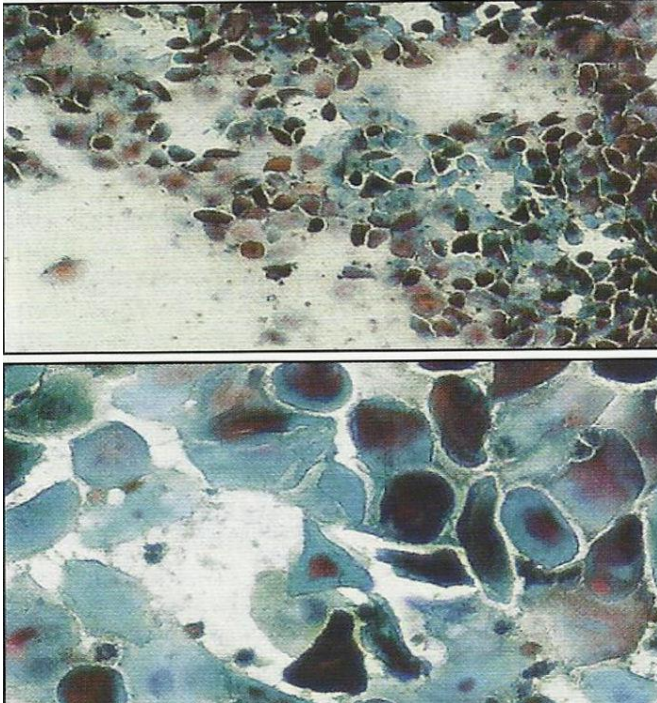


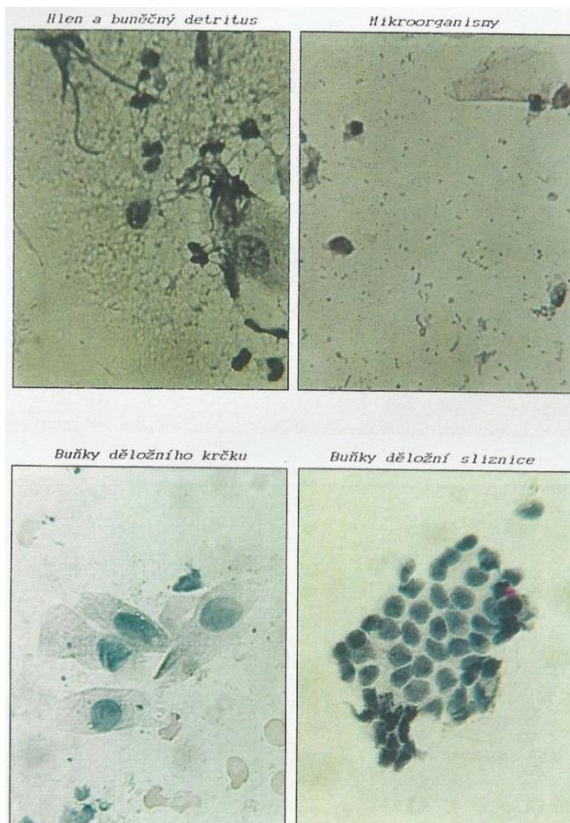
Figure 2-5. Schematic diagrams of the canine estrous cycle with day 0 = day of the LH surge. **A:** A schematic diagram representing hormonal and physiologic changes during the canine ovarian cycle.

Schematické znázornění pohlavního cyklu u feny, den 0 - den nástupu vlny LH. Obrázek znázorňuje hormonální a fyziologické změny během ovariálního cyklu) *Illustration continued on following page*

Příloha č. 6 : Vaginální cytologie: časný diestrus. Jsou vidět parabazální a intermediální buňky, spolu s neutrofily. Při nechtěném nakrytí je tento stěr nejlepší pro vyvolání abortu (England a Heimendahl, 2010).



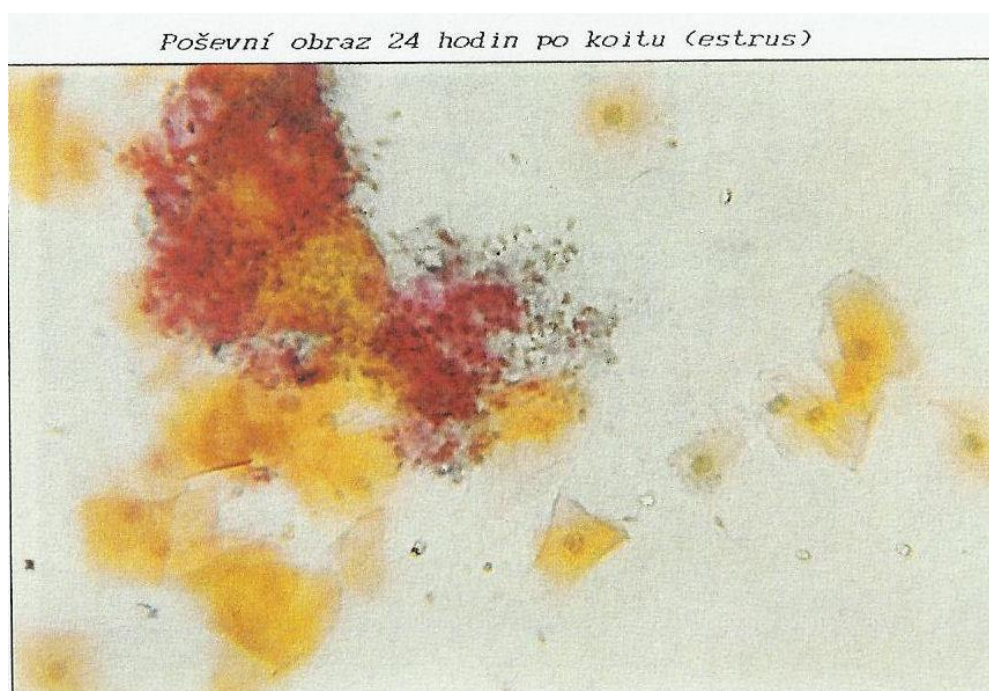
Příloha č. 7 : Poševní cytologie (Láznička, 1992).



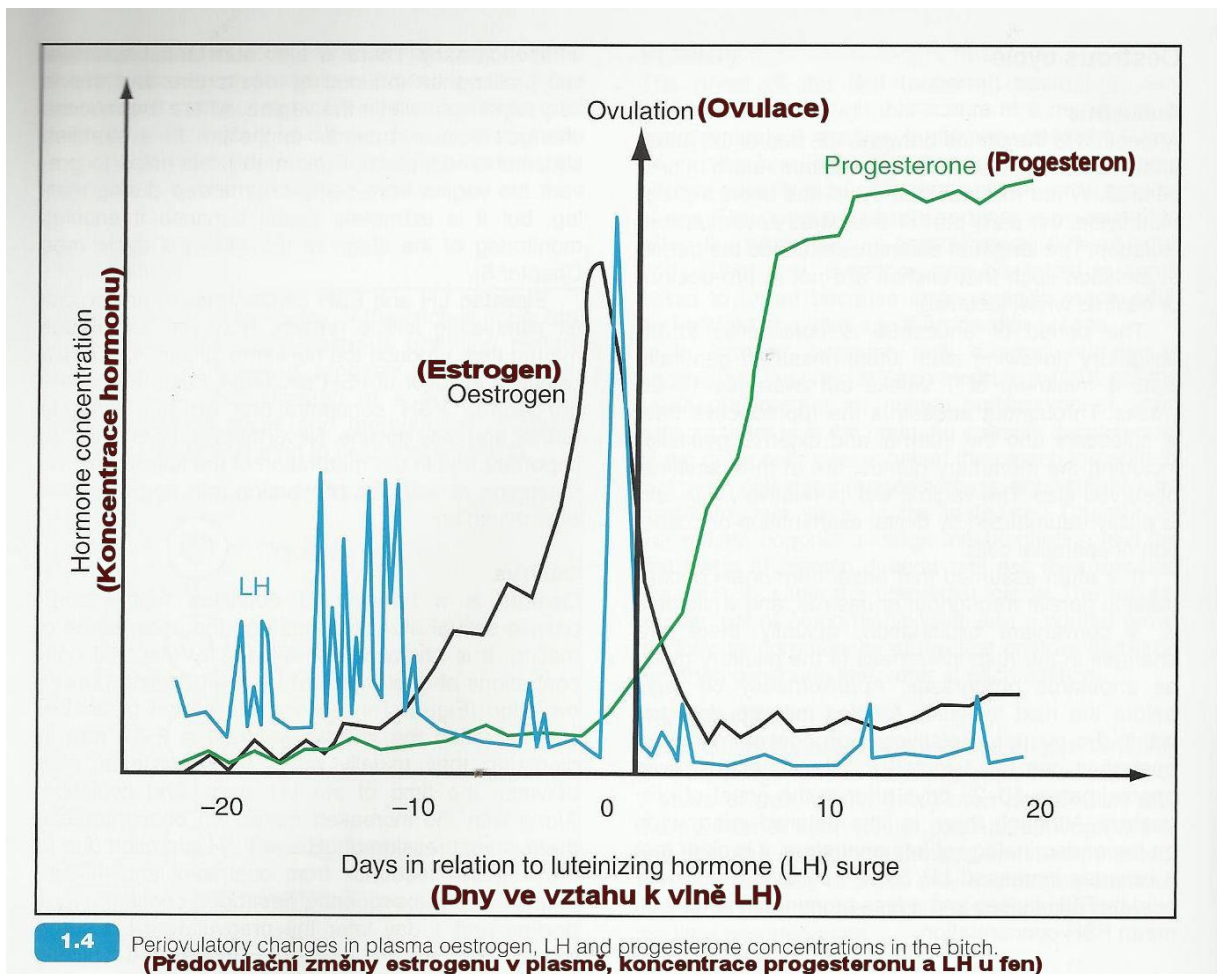
Příloha č. 8 : Poševní cytologie (Láznička, 1992).



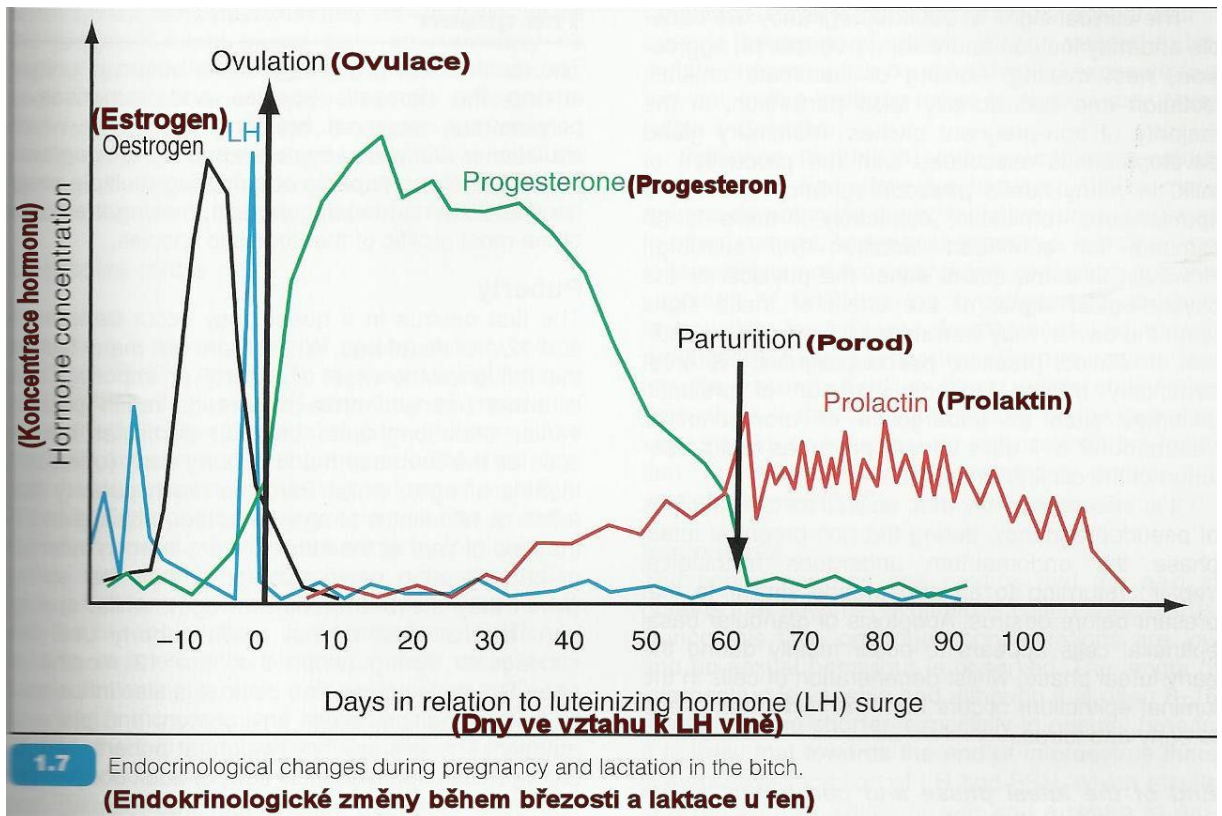
Příloha č. 9 : Poševní obraz 24 hodin po koitu (estrus) (Láznička, 1992).



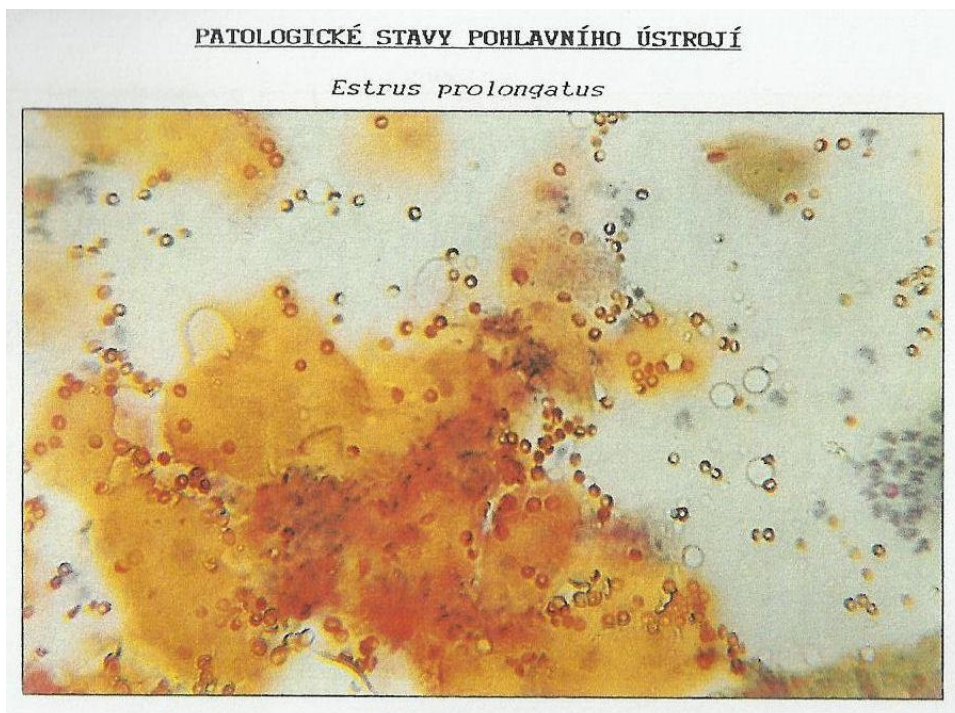
Příloha č. 10 : Znázornění vlny LH a koncentrace progesteronu (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 11 : Endokrinnologické změny během březosti a laktace (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 12 : Prodloužený estrus (Láznička, 1992).



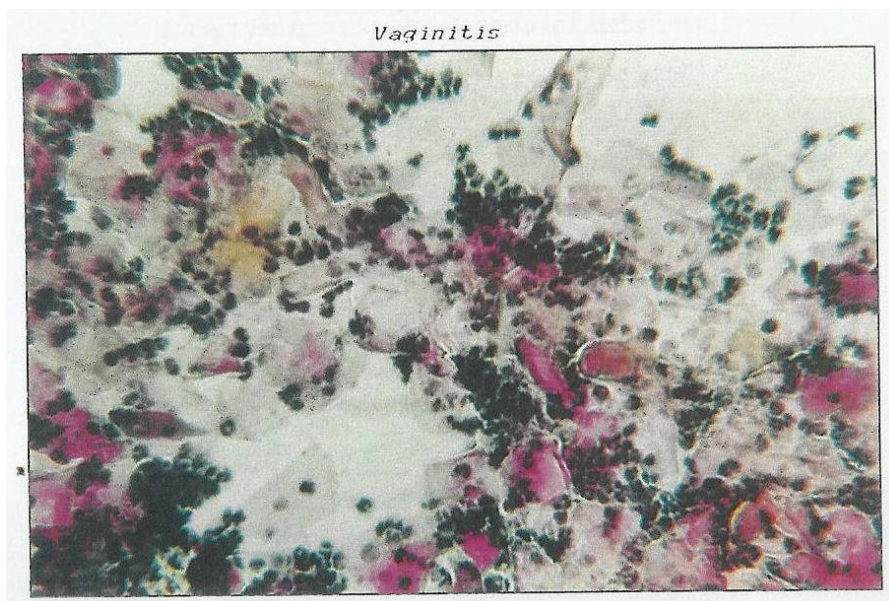
Příloha č. 13 : Folikulární cysty (England a Heimendahl, 2010).



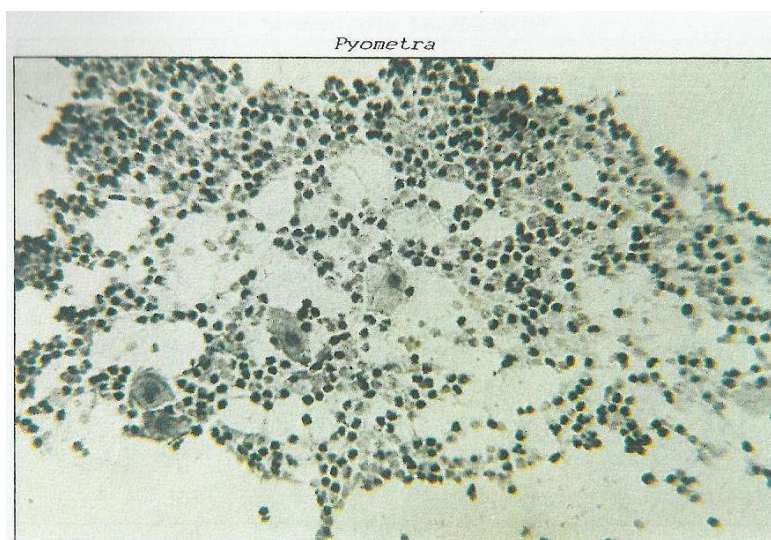
Příloha č. 14 : Juvenilní vaginitida u fen (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 15 : Vaginitis (Láznička, 1992).



Příloha č. 16 : Pyometra (Láznička, 1992).



Příloha č. 17 : Přirozené krytí feny (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 18 : Manuální odběr semene od psa (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 19 : Inseminace (England a Heimendahl, 2010).



Příloha č. 20 : Zavedení katetru při inseminaci (Johnston et al., 2001).

