UNIVERZA V LJUBLJANI

VETERINARSKA FAKULTETA

Primož Klinc

ASISTIRANA REPRODUKCIJA PSOV





LJUBLJANA, 2020

Primož Klinc

ASISTIRANA REPRODUKCIJA PSOV

Izdala in založila

UNIVERZA V LJUBLJANI

Veterinarska fakulteta

Strokovna recenzija:

prof. dr. Marjan Kosec, dr. vet. med., VF, Univerza v Ljubljani

izr. prof. dr. Tomaž Snoj, dr. vet. med., VF, Univerza v Ljubljani

Lektoriranje:

ga. Ivanka Šircelj Žnidaršič

Grafična priprava:

g. Božo Pirc

CIP – kataloški zapis o publikaciji

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID=43530755

ISBN 978-961-95242-0-6 (pdf)

Vsebina

UVOD ... 4

1 ODVZEM IN KONZERVIRANJE SEMENA ... 5

1.1 PREGLED PLEMENJAKA ... 5

1.2 PRIDOBIVANJE SEMENA ... 9

1.2.1 Odvzem semena s pomočjo digitalne manipulacije ... 9

1.2.2 Odvzem semena z elektroejakulatorjem ... 11

1.2.3 Pridobivanje semena iz nadmodkov in semenovoda ... 12

1.3 PREGLED EJAKULATA ... 15

1.3.1 Makroskopski pregled semena ... 15

1.3.2 Mikroskopski pregled semena ... 15

1.3.2.1 Gibljivost semenčic ... 15

1.3.2.2.1 Določitev koncentracije semenčic s številnimi komorami ... 19

1.3.2.3 Morfologija semenčic ... 22

1.3.2.4 Vitalnost semenčic ... 23

1.3.2.4.1 Eozin/nigrozin ... 25

1.3.2.4.2 Uporaba fluorescenčnih barvil ... 26

1.3.2.4.3 Hipoosmotski test (HOST) ... 26

1.4 KONZERVIRANJE SEMENA ... 28

1.4.2 Tekoče konzerviranje semena ... 28

1.4.3 Zamrzovanje in hranjenje semena v tekočem dušiku ... 30

2 POJATVENI CIKLUS PRI PSICI IN NJEGOVA SINHRONIZACIJA ... 33

2.1 POTEK POJATVENEGA CIKLUSA PRI PSICAH ... 33

2.2 UGOTAVLJANJE FAZE CIKLUSA ... 34

2.2.1 Adspekcija in vaginalna citologija ... 35

2.2.2 Vaginoskopski pregled ... 38

2.2.3 Hormonska diagnostika pojatvenega ciklusa pri psici ... 40

2.3 MOŽNOSTI SINHRONIZACIJE POJATVENEGA CIKLUSA PRI PSICAH ... 41

3 UKREPI OB NEZAŽELENEM ZASKOKU ... 43

4 UMETNO OSEMENJEVANJE PRI PSICAH ... 45

4.2 INTRAVAGINALNO OSEMENJEVANJE ... 45

4.3 INTRAUTERINO OSEMENJEVANJE ... 47

4.3.1 Invazivno intauterino osemenjevanje ... 47

4.3.2 Neinvazinvno intrauterino osemenjevanje ... 48

4.3.2.1 Norveška oz. skandinavska tehnika 49
4.3.2.2 Endoskopska tehnika 50
LITERATURA: 52

UVOD

Asistirano reprodukcijo (ART) pri psih predstavljajo različni postopki, katerih osnovni namen in končni cilj predstavlja oploditev jajčne celice z večjo ali manjšo stopnjo medicinske pomoči. Postopke ART lahko izvajamo v naravnem okolju (neposredno pri živali) ali v laboratoriju. Zelo pogosta je tudi njuna kombinacija, pri kateri določen del izvedemo na živali, drugi del pa v laboratoriju, npr. odvzem in konzerviranje semena.

Med najpomembnejše postopke ART vključujemo odvzem in konzerviranje semena, jajčnih celic in zarodkov, umetno osemenjevanje, ločevanje semenčic po spolu, prenos zarodkov ter *in vitro* postopke oploditve. Poleg tega pa k ART prištevamo tudi medikamentozno terapijo, s katero lahko vplivamo na potek pojatvenega ciklusa (gonitve), ovulacije ter uspešnost oploditve jajčnih celic.

Nekatere izmed tehnik, med katerimi bi lahko poudarili zlasti odvzem in konzerviranje semena ter umetno osemenjevanje, so zelo dobro razvite in omogočajo doseganje zadovoljivih ali celo odličnih rezultatov. Poleg tega lahko z uporabo sodobnih pripravkov uspešno sprožimo gonitev, v kateri pride do ovulacije. V tem primeru lahko, seveda ob izpolnjenju določenih pogojev, pričakujemo povsem normalno stopnjo oploditve ter rojstvo vitalnih potomcev.

Druge tehnike ART pa se pri psih uporabljajo veliko redkeje. Mednje prištevamo tudi ločevanje semenčic po spolu. Tehnika je sicer zelo uspešna in lahko pričakujemo tudi več kot 90 % potomcev želenega spola. Predvsem zaradi visokih stroškov priprave semenčic se postopek klinično zelo redko uporablja (1). Prenos zarodkov je sicer mogoč, vendar se prav tako uporablja zelo redko, saj v večini primerov vključuje invazivni kirurški poseg tako za pridobivanje zarodkov kot tudi za njihov prenos. *In vitro* postopki oploditve so trenutno mogoči zgolj ob uporabi zrelih jajčnih celic. Uporaba nezrelih jajčnih celic, ki jih pri številnih živalskih vrstah že več desetletij uspešno vključujemo v postopke *in vitro* oploditve, pri psicah zaenkrat žal ni mogoča. Glavni razlog je v specifičnem in nezadostno raziskanem mehanizmu zorenja jajčnih celic pri psici.

V nadaljevanju so prikazani različni postopki, ki jih lahko uporabljamo v okviru tehnik ART pri psih. Posvetili se bomo najpomembnejšim postopkom, ki jih izvajamo tako pri samcih kot pri samicah, in posameznim laboratorijskim tehnikam.

1 ODVZEM IN KONZERVIRANJE SEMENA

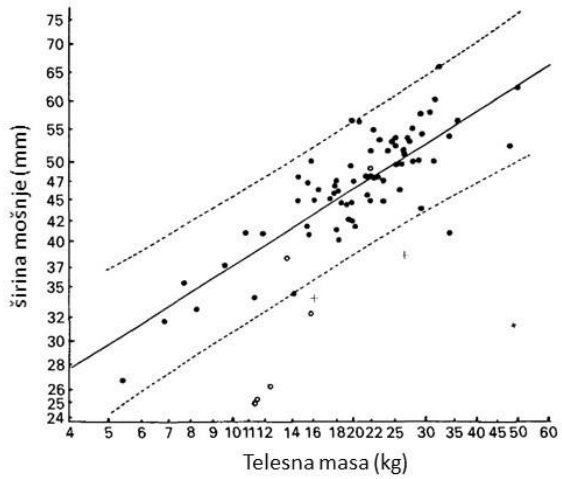
1.1 PREGLED PLEMENJAKA

Pregled, katerega osnovni namen je ugotavljanje reprodukcijskih sposobnosti plemenjaka, vključuje predvsem splošni klinični pregled živali, pregled spolnih organov in odvzem ter pregled semena. Na podlagi specifičnih anamnestičnih podatkov, zahtev lastnika in glede na rezultate osnovnega pregleda po potrebi vključimo tudi mikrobiološko preiskavo, hematološke in biokemijske preiskave krvi, v določenih primerih pa sta potrebna tudi ugotavljanje hormonskega stanja ter mikroskopska preiskava z biopsijo pridobljenega tkiva mod (2, 3, 4).

Pri splošnem kliničnem pregledu smo pozorni na različna odstopanja, ki bi lahko vplivala na reprodukcijsko sposobnost plemenjaka, kot so npr. obolenja sklepov in hrbtenice, prevelika telesna teža ali splošna oslabelost, različne nevrološke motnje in psihična odstopanja (npr. pretiran strah, agresija …). Pri določenih odstopanjih, kot sta neprimerna telesna teža ali pojav specifičnih sprememb na dlaki in koži, moramo posumiti na določene hormonske motnje, ki lahko negativno vplivajo na oploditveno sposobnost (npr. hiperadrenokorticizem). Kljub temu da se pri pomanjkanju ščitničnih hormonov (hipotireoidizem) pri psicah pogosto pojavijo motnje v plodnosti, pri psih z umetno povzročenim hipotireoidizmom niti po daljšem obdobju ni bil ugotovljen negativen vpliv na plodnost (velikost mod, število, gibljivost in morfologija semenčic) (5).

Nato nadaljujemo s pregledom mod, nadmodkov ter mošnje. Pri pregledu mod smo zlasti pozorni na njihov položaj, velikost, konsistenco, temperaturo, pomičnost v mošnji pa tudi na morebitne zatrdline (6). Posebno pozornost namenimo nadmodkom oz. predvsem repu nadmodka, ki je skladišče oploditveno sposobnih semenčic in je pritrjen kavdalno na robu mod. Pregled s palpacijo po potrebi nadgradimo tudi z ultrazvočnim pregledom, saj lahko z njim natančneje določimo strukturo mod in nadmodkov ter ugotovimo morebitne spremembe v notranjosti organa (7, 8).

Velikost mod, dnevna količina proizvedenih semenčic in število semenčic v ejakulatu so najbolj odvisni od velikosti psa (9, 10). Medtem ko lahko pri velikih pasmah psov s posameznim ejakulatom pridobimo več milijard semenčic, pri miniaturnih pasmah (npr. čivava) v posameznem ejakulatu lahko pričakujemo zgolj nekaj 10 do 100 milijonov semenčic. Velikost mod in njihov volumen lahko določimo na več načinov. Izmerimo lahko višino, širino in dolžino mod ter nato izračunamo volumen ali pa velikost določimo s sočasnim merjenjem širine obeh mod v skrotumu (11).



Graf 1: Odvisnost med širino mod in telesno težo (velikostjo) psa (prirejeno po Woodall in Johnstone, 1988)

Normalno razviti in funkcionalni modi sta trdoelastične konsistence, brez zatrdlin in prosto pomični v mošnji. Pri pregledu lahko ugotovimo tudi različne nepravilnosti, ki bolj ali manj motijo aktivnost mod. Spremembe so lahko bodisi prirojene ali pridobljene, npr. kriptorhizem, rotacija mod, vnetja, novotvorbe ipd. (slike 1–3). Pri prirojenih nepravilnostih je terapija prvenstveno usmerjena v preprečitev obolenja, ki lahko nastopi kot posledica nepravilnosti. Poleg tega pa je zelo pomembno tudi, da preprečimo nadaljnje razmnoževanje prizadetih živali. Tako npr. pri enostranskem kriptorhidu poleg zaostalega moda, ki je bolj podvrženo možnosti nastanka različnih novotvorb, odstranimo tudi v skrotum spuščeno modo. S takšnim pristopom preprečimo povečano tveganje za nastop obolenja, poleg tega pa onemogočimo nadaljnji prenos nepravilnosti. Pri kriptorhizmu se zaostalo modo ali modi lahko nahajata v trebušni votlini, ingvinalnem kanalu ali v podkožju pred skrotumom (slika 2). Čeprav se v prikazanem primeru (slika 2) modi nahajata v podkožju tik pred skrotumom, gre tudi pri tem za kriptorhizem, prizadeta žival pa je zaradi motene termoregulacije mod največkrat neplodna.



Slika 1: Rotacija mod in zakrneli repi nadmodkov



Slika 2: Kriptorhid (modi se nahajata v podkožju tik pred mošnjo)



Slika 3: Ultrazvočni pregled mod: vidne novotvorbe v desnem in levem modu (A–A in B–B)

Pred ali med samim odvzemom semena opravimo tudi pregled prepucija in spolnega uda. Pozorni smo na različne razvojne nepravilnosti, ki motijo ali celo onemogočajo koitus, poleg tega pa so lahko primarni vzrok različnih dolgotrajnih sekundarnih infekcij. Med nepravilnostmi najpogosteje ugotovimo fimozo, parafimozo, persistentni frenulum, priapizem in kronični gnojni izcedek (12).

Fimoza je stanje, pri katerem je zožena odprtina prepucija. Nepravilnost večinoma ne moti uriniranja, težava pa nastopi ob erekciji, saj penis v celoti ali le deloma zaostane v gubi prepucija. Stanje je največkrat prirojeno, lahko pa nastopi tudi kot posledica hujšega vnetja ali poškodbe prepucija. Ker se nepravilnost lahko deduje, v prvem primeru priporočamo kastracijo živali, v drugem pa lahko opravimo kirurški poseg, s katerim se poveča odprtina prepucija. S posegom pri psu ponovno omogočimo normalen izhod penisa in s tem paritev oz. odvzem semena s pomočjo digitalne manipulacije (slika 4–5).



Slika 4: Zožena odprtina prepucija (fimoza) pri 5 let starem psu, težkem 50 kg; zožitev je posledica poškodbe in infekcije prepucija.



Slika 5: Odprtino prepucija smo povečali na dorzalnem delu, rano pa zašili z intradermalnimi šivi in samorazgradljivim šivalnim materialom velikosti USP 4/0.

Pri parafimozi penis zaostane zunaj prepucija. Stanje se najpogosteje pojavi po delni ali popolni erekciji. Potrebno je hitro posredovanje, saj lahko zaradi motene prekrvavitve nastopi odmrtje dela penisa, ki se nahaja zunaj prepucija. S posegom (največkrat kirurškim) omogočimo povrnitev penisa v prepucij. Ponovitev parafimoze poskušamo preprečiti s povečanjem odprtine ali s kirurško združitvijo penisa in stene prepucija (phalopexia) (13).

V času fetalnega razvoja sta penis in prepucij združena s posebno gubo, ki se razgradi pod vplivom testosterona. Če je razgraditev gube med penisom in prepucijem nepopolna, ostane persistentna povezava v obliki traku, ki jo imenujemo frenulum. Najpogostejši klinični znaki obolenja so kronični gnojni izcedek iz prepucija, zavračanje oz. nezmožnost kopulacije in deviacija ali ukrivljanje penisa ob erekciji. Nepravilnost odpravimo s kirurškim posegom, pri katerem odstranimo vez, ki moti normalno erekcijo penisa. Po kirurškem posegu prepucij nekaj dni izpiramo s kamiličnim čajem (protivnetno delovanje bisabolola) ali blagim razkužilom (14).

Priapizem je stanje, ko erekcija penisa traja več kot 4 ure in nastane zaradi motenj pri odvodu krvi iz penisa. Vzrok so lahko različne novotvorbe na bazi penisa, krvni strdki, nevrološko obolenje ipd. Lastniki najpogosteje opazijo spremembe v vedenju živali. Pes se intenzivno liže na področju penisa, ima dolgotrajno erekcijo, opazimo pa lahko iztekanje krvi ali urina iz sečnice. Nezdravljeno obolenje lahko privede do nekroze penisa in posledično hujših zapletov, ki lahko povzročijo celo pogin živali. Uspešno zdravljenje je odvisno od vzroka in tudi možnosti njegove sanacije. Priporoča se aplikacija simpatomimetičnega zdravila fenilefrina v kavernozni del penisa ter vlaženje vidnega dela penisa z ustreznim gelom. V najhujših primerih, ki lahko privedejo celo do nekroze večjega dela spolnega uda, moramo penis amputirati (15).

Pri psih se kronični gnojni izcedek iz prepucija pojavlja razmeroma pogosto in je posledica vnetja tako stene prepucija kot tudi penisa (balanopostitis). Kljub temu da primarnega vzroka večinoma ne odkrijemo, s podrobnim pregledom izključimo in po potrebi odpravimo različne prirojene in pridobljene nepravilnosti (fimoza, frenulum, novotvorbe ipd.). Po odstranitvi primarnega vzroka prepucij nekaj zaporednih dni 2–3-krat dnevno prepiramo z blagim razkužilom in po vsakem zdravljenju vanj apliciramo za sluznice primerno antiseptično ali

antibiotično mazilo. V skrajnem primeru (npr. poškodbe, novotvorbe) lahko opravimo amputacijo penisa in skrotalno uretrostomijo (16).

1.2 PRIDOBIVANJE SEMENA

Seme pri psu odvzamemo v okviru androloškega pregleda, zaradi umetnega osemenjevanja, konzerviranja semena ali v raziskovalne namene. V okviru androloškega pregleda moramo seme pridobiti na čim bolj naraven način. Seme, ki ga potrebujemo za umetno osemenjevanje ali konzerviranje, pa lahko pridobimo tudi s pomočjo kirurške tehnike po kastraciji mod ali celo dva dni po poginu živali.

Seme od psa večinoma pridobimo z uporabo tehnike digitalne manipulacije.

Precej redkeje odvzem opravimo z uporabo elektroejakulatorja (EJ). Glavni razlogi, ki omejujejo uporabo EJ, so obvezna vključitev splošne anestezije, število pridobljenih semenčic je relativno nizko, med odvzemom pa se seme pogosto kontaminira z urinom.

Relativno veliko število oploditveno sposobnih semenčic lahko pridobimo tudi iz nadmodkov. Postopek je zelo zanesljiv, lahko se uporablja tudi pri psih, pri katerih odvzem ejakulata zaradi različnih razlogov ni mogoč, ali celo po poginu živali. Za kvalitetno izvedbo postopka potrebujemo ustrezno opremljen laboratorij, postopek pa je mogoče izvesti zgolj enkrat oz. največ dvakrat v primeru posamezne odstranitve mod.

1.2.1 Odvzem semena s pomočjo digitalne manipulacije

Odvzem semena s tehniko digitalne manipulacije (DM) je daleč najpogostejši način, s katerim od psa lahko pridobimo seme. Predstavlja neinvazivno tehniko, ki jo lahko uspešno uporabimo pri veliki večini živali. Podobna je tudi tehnika, pri kateri seme odvzamemo z umetno vagino (UV), vendar se kljub določenim prednostim ta tehnika pri kliničnem delu uporablja izredno redko. Glavni razlog leži v tem, da je odvzem semena s pomočjo DM veliko enostavnejši in cenejši, količina in kvaliteta pridobljenega semena pa sta povsem primerljivi (17).

Predvsem je pomembno, da odvzem opravimo v mirnem in primerno temperiranem prostoru. Izogibamo se prostorov, v katerih je bil pes izpostavljen stresnim ali bolečim posegom. Zlasti pri mlajših in živalih, pri katerih odvzem opravljamo prvič, je zaželena prisotnost goneče se psice. Psa prisotnost psice dodatno stimulira, ejakulat pridobimo hitreje, v njem pa je pogosto tudi večje število semenčic. Pred odvzemom naj se pes vsaj nekaj minut privaja na okolje. V tem času izvedemo njegovo identifikacijo in opravimo osnovni klinični pregled in pregled spolnih organov. Ustrezna stimulacija ob ejakulaciji privede do krčenja stene nadmodkovega voda, semenovoda, sečnice in prostate, kar sproži izločanje semenčic in semenske plazme (ejakulacija). Odvzem semena pričnemo z intenzivno masažo penisa na kavdalnem delu prepucija, to je na področju, kjer se nahajata parni izboklini brecila – bulbus glandis (BG) (slika 6). Po nastopu delne erekcije skozi odprtino prepucija potisnemo penis vključno z BG. Popolno erekcijo dosežemo in jo vzdržujemo s konstantnim pritiskom na penis kavdalno oz. nad BG (slika 7). Po nastopu popolne erekcije spolni ud obrnemo v kavdalno smer in pričnemo z zbiranjem semena. Seme zbiramo v ustrezni spermozbiralnik, najpogosteje za enkratno uporabo (bodisi plastičen ali polivinilast – slika 8). Pri zbiranju semena smo še posebej pozorni na vzdrževanje ustrezne temperature, saj tako preprečimo, da bi bile semenčice izpostavljene temperaturnemu šoku.

Pri odvzemu semena s pomočjo DM lahko pridobimo celoten ejakulat. Ta je sestavljen iz treh frakcij. Prva (predsemenska) frakcija je namenjena predvsem čiščenju uretre in jo (vsaj začetni del) ne zbiramo. Sledi druga frakcija (semenska), ki vsebuje veliko semenčic in ima značilno sivobelo barvo. Tretja frakcija (posemenska) predstavlja izloček prostate, je prozorna in jo pri načrtovanem konzerviranju semena ne zbiramo (slika 9–11). Če načrtujemo osemenitev neposredno po odvzemu, zberemo tudi določeno količino posemenske frakcije, in sicer toliko, da je skupni volumen zbranega semena od 1 do 10 ml (odvisno od velikosti psa). Pri odvzemu smo pazljivi, da s konico penisa ne kontaminiramo zbranega semena (18).

Pri načrtovanem konzerviranju semena priporočamo največ 2–3 odvzeme tedensko. Pri posameznem postopku lahko konzerviramo večje število semenčic, če vzamemo dva ejakulata v razmaku 0,5 do 1 ure. Drugi ejakulat sicer pogosto vsebuje manj semenčic kot prvi, vendar lahko na ta način končno število semenčic, ki jih lahko uporabimo za npr. konzerviranje, povečamo za več kot 50 %. Zlasti pri psih, ki že dalj časa niso ejakulirali, se priporoča odvzem in pregled semena nekaj dni pred načrtovanim osemenjevanjem ali konzerviranjem. Dodatni odvzem ima pozitiven vpliv na kvaliteto semena, poleg tega pa to lahko predhodno določimo, kar daje lastniku več možnosti, npr. izbira alternativnega plemenjaka, kadar seme ni zadovoljive kakovosti (19).



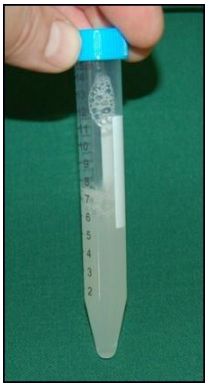
Slika 6: Pričetek odvzema semena – masaža prepucija



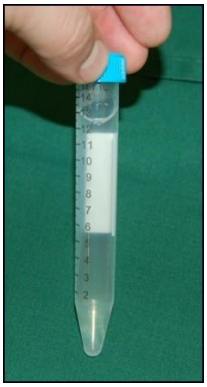
Slika 7: Zbiranje semena (izvajamo konstanten pritisk nad BG, penis je obrnjen v kavdalno smer, konica penisa se ne dotika zbranega semena – tega zaščitimo pred naglimi spremembami temperature)



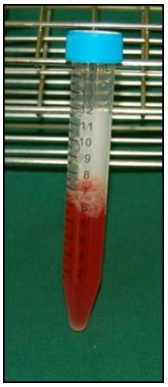
Slika 8: Spermozbiralnik za zbiranje pasjega semena



Slike 9: Ejakulat psa



Slika 10: Izloček prostate



Slika 11: Hemospermia

1.2.2 Odvzem semena z elektroejakulatorjem

Elektroejakulacija je postopek, pri katerem z električno stimulacijo in krčenjem akcesornih spolnih žlez, semenovoda in sečnice povzročimo ejakulacijo oz. izločitev semena. Uporaba tehnike je pri psih zelo omejena. Glavna razloga sta velika invazivnost postopka ter relativno nizka uspešnost, saj pri številnih plemenjakih ejakulata s tem postopkom ne moremo pridobiti. Pri psih, pri katerih seme sicer pridobimo, ejakulat večinoma vsebuje relativno majhno število semenčic, pogosta pa je tudi kontaminacija z urinom. Tehnika se pogosteje uporablja pri divjih psih (afriški psi, volkovi …), saj pri njih odvzem semena z DM večinoma ni mogoč (20, 21).

Pred izvedbo tega sorazmerno invazivnega posega moramo živali anestezirati. Za pomiritev psa najpogosteje uporabljamo ksilazin (1 mg/kg TM *i.m.*) ali medetomidin (10–20 µg/kg TM *i.m.*), globoko anestezijo pa dosežemo z aplikacijo ketamina (8 mg/kg TM *i.m.* oz. 2 mg/kg TM *i.v.*). Ejakulacijo lahko sprožimo z električnimi impulzi moči 100 mA in frekvenco 50 Hz. Posamezni impulz traja 3 sekunde, med njimi pa je 3-sekundni premor. V postopek vključimo največ do 10 faz, v vsaki fazi pa naredimo 10 ponovitev. Električne napetosti dvigujemo postopoma, in sicer od 1,5 do 10,9 V. Po pričetku ejakulacije električne napetosti ne dvigujemo več, zbiranje semena pa zaključimo z nekaj dodatnimi impulzi enake napetosti. Uspešnost postopka in količino pridobljenega semena lahko povečamo z ustrezno stimulacijo psa s pomočjo goneče se psice pred pričetkom anestezije ter aplikacijo prostaglandina F2α (22).



Slika 12: Elektroejakulator z rektalno sondo

1.2.3 Pridobivanje semena iz nadmodkov in semenovoda

V glavi in telesu nadmodka poteka dokončno zorenje semenčic. Po zaključenem zorenju semenčice postanejo gibljive, poleg tega pa pridobijo tudi sposobnost oploditi jajčno celico. Oploditveno sposobne semenčice se nato shranjujejo v repu nadmodka in semenovodu. Z ustreznimi postopki lahko iz repov nadmodka pridobimo oploditveno sposobne semenčice, ki jih lahko uporabimo neposredno za umetno osemenitev ali pa jih konzerviramo (23). Kljub temu da je uspešnost konzerviranja nadmodkovega semena nekoliko slabša v primerjavi s semenom, ki ga pridobimo ob ejakulaciji, se zaradi številnih prednosti, kot so pridobitev oploditveno sposobnih semenčic pri azoospermiji ali po poginu živali, tudi to seme sorazmerno pogosto uporablja za konzerviranje (24).

Za anestezijo živali, pri katerih želimo po kastraciji iz nadmodkov pridobiti semenčice, se priporoča uporaba propofola ali kombinacije ketamina in deksmedetomidina. Uporaba tiopentala ima lahko negativen vpliv na kvaliteto tako svežega kot ohlajenega semena iz nadmodkov, zato se njegove uporabe v tem primeru izogibamo (25). V repu nadmodka

semenčice ohranijo oploditveno sposobnost tudi več dni. Pri hranjenju nadmodkov na 4 °C v prvih 48 urah ni bila ugotovljena znižana vitalnost semenčic. Posamezne gibljive semenčice, ki so ohranile oploditveno sposobnost, pa so bile ugotovljene celo 8 dni po kastraciji (26). Po kastraciji ali poginu živali imamo, seveda pod določenimi pogoji (temperatura okoli 4 °C), vsaj dva dni časa, da iz nadmodkov pridobimo vitalne in oploditveno sposobne semenčice.

Pri pridobivanju nadmodkovega semena se največkrat uporabljata dve tehniki. Nadmodek bodisi narežemo na tanke rezine ali ga izperemo retrogradno. V obeh primerih nadmodek najprej ločimo od mod, odstranimo površinsko fascijo in večje krvne žile. V prvem primeru rep nadmodka narežemo na tanke rezine in jih prelijemo z ustreznim razredčevalcem, ki je ogret na sobno temperaturo. Po približno 10 minutah iz raztopine s filtriranjem odstranimo tkivo nadmodka, pridobljeno seme pa lahko uporabimo za konzerviranje ali umetno osemenjevanje. Pri retrogradnem izpiranju v semenovod vstavimo kateter, nato ob pomoči brizge z razredčevalcem ustvarimo nadtlak, s katerim iz semenovoda in nadmodkovega voda izperemo semenčice. Z retrogradnim izpiranjem nadmodkov večinoma pridobimo večje število kvalitetnejših semenčic, z manj nezaželenimi primesmi, kot so kri, druge celice in vezivo. Predvsem zaradi enostavnosti postopka pa nadmodkove semenčice kljub temu najpogosteje pridobivamo z izpiranjem tankih rezin (27).



Slika 13: Retrogradno izpiranje nadmodka



Slika 14: Priprava rezin nadmodka



Slika 15: Filtracija razredčevalca z rezinami nadmodka skozi stomikrometrski filter

1.3 PREGLED EJAKULATA

Makroskopski pregled semena opravimo med odvzemom, mikroskopskega pa čim prej po pridobitvi semena. Pred mikroskopskim pregledom se izogibamo prevelikim temperaturnim spremembam oz. nihanjem, saj te lahko negativno vplivajo na posamezne preiskovane parametre. Kvaliteta in količina pridobljenega semena sta odvisni predvsem od starosti in velikosti psa, njegovega zdravstvenega stanja in tehnike odvzema.

1.3.1 Makroskopski pregled semena

Ob odvzemu ejakulata lahko na podlagi barve ločimo tri frakcije, in sicer predsemensko, semensko in posemensko (izloček prostate). Pred- in posemenska frakcija sta prozorni, medtem ko je semenska frakcija sivobele barve, intenziteta barve pa je odvisna predvsem od koncentracije semenčic. Ejakulatu je lahko primešana tudi kri zaradi bolezenskih sprememb prostate (npr. benigna hiperplazija), počenja žilic v sečnici ali poškodb penisa. Poleg tega se v ejakulatu lahko pojavijo vnetni produkti (gnoj) in urin. Odsotnost semenčic v ejakulatu (azoospermija) je lahko posledica motenj v delovanju mod, transportnega sistema (nadmodkova voda in semenovoda) ali retrogradne ejakulacije (ejakulacija semenčic v sečni mehur). Retrogradna ejakulacija je pri psih relativno redka. Nanjo posumimo pri azoospermiji ali oligozoospermiji pri živalih z normalno razvitimi spolnimi organi. Diagnozo postavimo z odvzemom in preiskavo urina po zaključeni ejakulaciji. Znano je, da tudi pri zdravih živalih med ejakulacijo določen del semenčic zaide v sečni mehur. Z aplikacijo fenilpropanolamina (4 mg/kg TM enkrat dnevno pet zaporednih dni) lahko povečamo tonus sečnice in zmanjšamo število semenčic, ki so med ejakulacijo iztisnjene v sečni mehur. Posledično se lahko poveča število semenčic v ejakulatu (28).

Prav tako je pomembno, da določimo volumen zbranega ejakulata. Ta pri psu znaša okrog 10 ml (2–19 ml), odvisen pa je predvsem od pasme in količine zbranega izločka prostate (29).

1.3.2 Mikroskopski pregled semena

Mikroskopski pregled semena omogoča sorazmerno natančno določitev kvalitete semenčic v preiskovanem vzorcu. Na podlagi ugotovljene kvalitete lahko do določene stopnje predvidimo tudi njihovo oploditveno sposobnost. Zavedati pa se moramo, da z mikroskopskim pregledom semena lahko potrdimo neplodnost pri živalih. Če s preiskavo ne ugotovimo večjih negativnih odstopanj, pa kljub temu ne moremo trditi, da ima določeni osebek normalno plodnost. Namreč preiskave plemenjaka in semena nam omogočajo potrditev številnih, vendar ne vseh vzrokov neplodnosti.

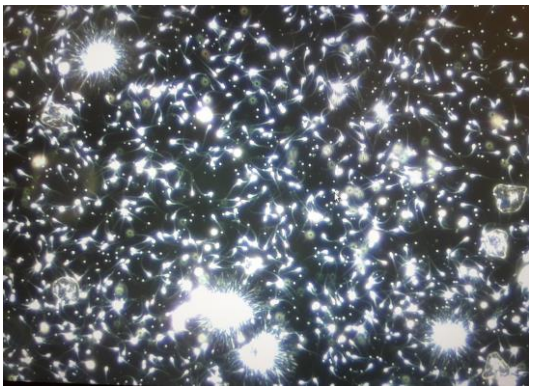
Poleg osnovnih analiz, ki vključujejo določitev gibljivosti, koncentracije, morfologije in vitalnosti semenčic, moramo po opravljenih analizah pripraviti poročilo. To poleg rezultatov analiz vsebuje tudi izračune, po katerih lahko natančneje opišemo kvaliteto preiskovanega vzorca. Na podlagi rezultatov preiskave in izračunov lahko sprejmemo odločitev o plodnosti plemenjaka, smiselnosti uporabe določenega semena ter določimo stopnjo razredčitve in število osemenjevalnih doz pri pripravi konzerviranega semena.

1.3.2.1 Gibljivost semenčic

Določanje gibljivosti predstavlja enega izmed osnovnih in najpomembnejših parametrov pri določanju kvalitete in oploditvene sposobnosti semenčic. Ustrezna gibljivost je predpogoj, da semenčice dosežejo mesto oploditve in vstopijo v jajčno celico. Kvaliteten ejakulat psa vsebuje nad 85 % gibljivih semenčic, od teh vsaj 80 % progresivno gibljivih. V konzerviranje večinoma vključimo zgolj ejakulate, pri katerih ugotovimo nad 75 % gibljivih semenčic.

Temperatura ima velik vpliv na gibljivost semenčic. Zato je izredno pomembno, da pred in med preiskavo zagotovimo ustrezno temperaturo vzorca, ki naj se giblje med 35–37 °C. Pri preiskavi uporabljamo ogreto predmetno in pokrivno steklo, mikroskop pa naj bo opremljen z grelno mizico. Gibljivost lahko ocenimo subjektivno z uporabo faznokontrastnega mikroskopa (50–200x povečava). Natančnejša in objektivnejša analiza je mogoča ob uporabi posebnega računalniškega sistema (npr. Hamilton-Thorne).

Pri subjektivnem pregledu gibljivosti lahko sorazmerno preprosto in natančno določimo odstotek gibljivih in negibljivih semenčic. Za nadaljnjo razlikovanje med progresivno in moteno gibljivimi semenčicami pa je potrebna večja izkušenost ocenjevalca. Progresivno gibljive semenčice so namreč tiste, ki se gibljejo dovolj hitro, njihova pot pa je sorazmerno ravna, vse ostale gibljive semenčice so moteno gibljive. Odločitev, ali je določena semenčica progresivno (pravilno) ali moteno gibljiva, je odvisna predvsem od izkušenj ocenjevalca. Pri pregledu nekaterih vzorcev semena ugotovimo, da se semenčice združujejo v skupke ali aglutinate. Aglutinacija je največkrat posledica poškodbe membran (temperaturni šok, spremenjena sestava semenske plazme ipd.) ali prekapacitacije semenčic. V vzorcih, pri katerih prihaja do aglutinacije semenčic, lahko pričakujemo skrajšano preživetje semenčic, kar ima negativen vpliv na njihovo oploditveno sposobnost in so manj primerne za konzerviranje.



Slika 16: Aglutinacija semenčic

Računalniški sistem (CASA – computer assisted sperm analysis) omogoča, da poleg objektivne določitve odstotka gibljivih in progresivno gibljivih semenčic določimo tudi različne druge parametre, ki so pomembni za oceno oploditvene sposobnosti semenčic in njihove dolgoživosti. Z računalniškim sistemom lahko npr. zaznamo spremembo v gibanju semenčic, ki je posledica kapacitacije. Kapacitacija je stopnja v dozorevanju semenčic, s katero te pridobijo dokončno oploditveno sposobnost. Stopnjo predstavljajo različni biokemični procesi, s katerimi se spremeni način gibanja semenčic, poleg tega pa modifikacija površinskih glikoproteinov omogoča združitev semenčice z membrano jajčne celice. Novejši sistemi omogočajo, da s pomočjo posebnih fluorescenčnih barvil istočasno z gibljivostjo določimo tudi vitalnost

semenčic. S posebnimi barvili lahko obarvamo tudi vse semenčice v vzorcu ter tako določimo gibljivost tudi v motnih razredčevalcih, kjer takšna določitev sicer ne bi bila mogoča (30).

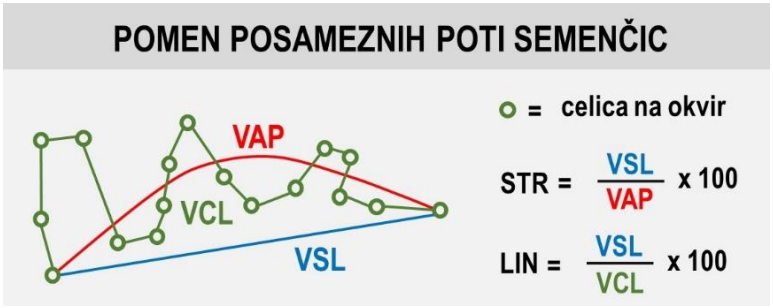


Slika 17: Računalniški sistem za analizo semena (Hamilton-Thorne)

Sistem CASA (computer assisted sperm analysis – računalniško podprt sistem za analizo semenčic) vključuje faznokontrastni mikroskop s kamero in grelno mizico, zmogljiv računalnik, ki omogoča analizo in shranjevanje pridobljenih podatkov, ter monitor. Z manjšimi spremembami nastavitev lahko program prilagodimo za analizo semena različnih živalskih vrst. Določimo predvsem velikost semenčic oz. njihove glave, ki se zelo razlikuje med živalskimi vrstami, kontrast ter mejne vrednosti hitrosti gibanja semenčic. Računalniški sistem lahko na podlagi teh podatkov razlikuje semenčice od drugih delcev v vzorcu, določi koncentracijo, odstotek gibljivih in progresivno gibljivih semenčic ter številne druge parametre. Vzorec semena analiziramo v posebnih števnih komorah (Leja ali Makler), ki imajo natančno določeno višino 10 µm in so predhodno ogrete na ustrezno temperaturo. Nizka višina kamric je pomembna, saj računalniška analiza lahko poteka le, če se vse semenčice nahajajo v enem fokusu. Pomembno je tudi, da je v analiziranem vzorcu približno 50 x 10^6 semenčic na 1 ml. Pri preveliki koncentraciji rezultati analize niso natančni zaradi prekrivanja poti posameznih semenčic, pri prenizki pa je v analizo vključeno premalo semenčic, zato niso primeren pokazatelj stanja v celotnem vzorcu (31).

Parameter	**Mejne vrednosti**
temperatura analize (°C)	37
minimalni kontrast	25
minimalna velikost celic (piksli)	4
nizki VAP – mejna vrednost (µm/s)	30
nizki VSL – mejna vrednost (µm/s)	15
srednji VAP – mejna vrednost (µm/s)	50

Tabela 2: Primer nastavitev sistema CASA za analizo pasjega semena (32)



Slika 18: Shematski prikaz in izračun posameznih parametrov

Med najpomembnejše parametre, ki na različne načine opisujejo gibanje semenčic, vključujemo VCL (hitrost celotne poti, *ang.* curvilinear velocity), VAP (povprečna hitrost poti, *ang.* velocity average pathway), VSL (hitrost ravne črte, *ang.* velocity straight line), STR (ravnost poti, *ang.* straightness), LIN (linearnost), ALH (amplituda stranskega odmika glave, *ang.* amplitude of lateral head displacement) in BCF (frekvenca premikanja glave, *ang.* beat cross frequency).
Visoki parametri VCL, ALH in BCF so indikatorji visoke moči semenčic, zanje pa je značilno hiperaktivno gibanje semenčic. Vrednosti omenjenih parametrov se povečajo pri kapacitiranih ali prekapacitiranih semenčicah, drugi parametri, kot so VSL, STR in LIN, pa označujejo progresivno gibanje semenčic, njihove vrednosti pa se pri kapacitaciji ali prekapacitaciji zmanjšajo. Ugotovljeno je bilo, da se lahko že samo z VCL in LIN natančno določi kapacitacijo ali prekapacitacijo semenčic (33). Z računalniško analizo vzorca semena oz. ejakulata lahko torej preverimo, ali je gibljivost semenčic primerna in ali je pri manipulaciji semena prišlo do prezgodnje kapacitacije semenčic, ki lahko negativno vpliva na njihovo oploditveno sposobnost in primernost za konzerviranje.

1.3.2.2 Koncentracija semenčic

Natančna določitev koncentracije semenčic je izredno pomembna pri preverjanju oploditvene sposobnosti plemenjaka ter pripravi osemenjevalnih doz semena. V kombinaciji z nekaterimi drugimi preiskavami, kot so npr. volumen, gibljivost semenčic, njihova morfologija in vitalnost, lahko v preiskovanem vzorcu semena določimo skupno število semenčic, število progresivno gibljivih, morfološko nespremenjenih in vitalnih semenčic.

Koncentracijo semenčic lahko določamo na različne načine. Za ta namen lahko uporabimo pretočno citometrijo, spektrofotometer, računalniški sistem CASA ter števne komore.

S pretočno citometrijo lahko zelo natančno in hitro določimo koncentracijo semenčic. S sočasno uporabo ustreznih fluorescenčnih barvil (npr. propidijev jodid) lahko določimo tudi vitalnost semenčic. Pri sodobnih aparaturah, npr. NucleoCounter SP-100 (Chemometec, Danska), preiskovano seme damo v posebej pripravljene kasete, ki imajo vključeno fluorescenčno barvilo. Po analizi, ki traja približno 30 sekund, pridobimo zelo natančne podatke o koncentraciji in vitalnosti semenčic. Velika prednost analize je, da gel in različni delci v semenski plazmi ne motijo njene izvedbe, poleg tega pa je analizo mogoče izvesti tudi pri vzorcih semena, razredčenih z netransparentnimi razredčevalci, ki vsebujejo npr. jajčni rumenjak ali druge dodatke (34). Glavna dejavnika, ki omejujeta širšo uporabo omenjene tehnike, sta visoka cena aparature ter sorazmerno visok strošek analize posameznega vzorca.

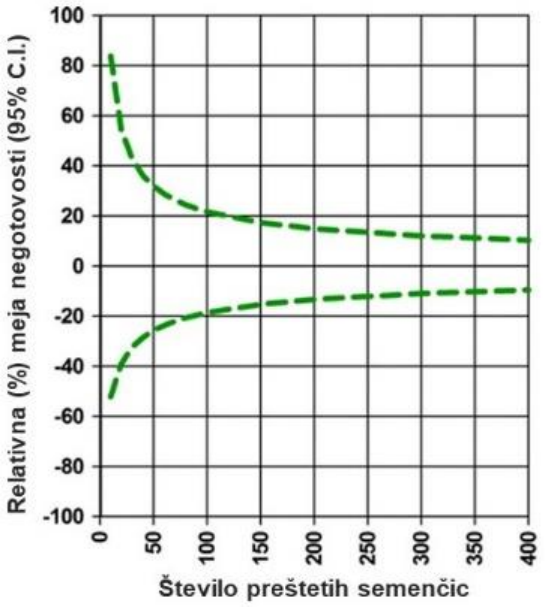
S spektrofotometrom lahko zelo hitro določimo koncentracijo semenčic. Metoda je zaradi principa delovanja sorazmerno nenatančna in jo zato večinoma uporabljamo pri rutinskih pregledih, ko moramo v kratkem času opraviti pregled večjega števila plemenjakov. V tem primeru koncentracijo semenčic določimo posredno z merjenjem prehoda svetlobe preko preiskovanega vzorca. Glede na to, da prehod svetlobe preko vzorca poleg semenčic motijo tudi druge primesi (npr. kri, različne nesnage, epitelne celice ipd.), lahko rezultati močno odstopajo od dejanskih vrednosti. Zaradi pogoste velike variabilnosti med rezultati več meritev istega vzorca vedno opravimo vsaj dve meritvi in prikažemo njuno povprečje. Tretjo meritev opravimo, če je bilo med prvima dvema več kot desetodstotno odstopanje. Pri izračunu povprečja upoštevamo le dve meritvi z manjšim odstopanjem. Metoda je uporabna le za merjenje koncentracije semenčic v nativnem ejakulatu. Preiskovano seme damo v posebne kivete, jih vstavimo v aparaturo, rezultat pa pridobimo v nekaj sekundah (35).

Sistem CASA se uporablja predvsem za objektivno določitev gibljivosti semenčic. Pri analizi vzorca uporabljamo posebne komore (Makler, Leja ipd.), ki imajo natančno določeno višino, kar omogoča tudi določitev koncentracije. Predvsem zaradi prekrivanja poti gibanja semenčic so posamezne semenčice pogosto upoštevane kot dve ali celo tri različne, zato je koncentracija semenčic, ki jo pridobimo po omenjeni metodi, pogosto višja od dejanske in nenatančna.

S števnimi komorami lahko ob pravilni pripravi vzorca in izvedbi analize zelo natančno določimo koncentracijo semenčic. Metoda sicer zahteva nekoliko več časa in je zato bolj primerna za uporabo pri manjšem številu vzorcev in takrat, ko je natančna določitev koncentracije semenčic zelo pomembna, npr. priprava osemenjevalnih doz, raziskave ipd.

1.3.2.2.1 Določitev koncentracije semenčic s števnimi komorami

Določitev koncentracije semenčic s številnimi komorami je mogoča pri ustrezno razredčenih vzorcih, ki morajo vsebovati le negibljive semenčice. Kljub temu da za razredčitev lahko uporabimo različne raztopine, za ta namen najpogosteje uporabimo destilirano vodo, ki povzroči ireverzibilne poškodbe semenčic in popolno izgubo njihove gibljivosti. Stopnja razredčitve je odvisna predvsem od pričakovane koncentracije semenčic. Razredčitev mora biti dovolj velika, da pri štetju ne prihaja do prevelikega prekrivanja semenčic. Če je razredčitev prevelika in je število preštetih semenčic manjše od 50, lahko pričakujemo napako, ki se z nižanjem števila preštetih semenčic še povečuje. Zato poskušamo pripraviti takšno razredčitev, da imamo v desetih poljih komore med 100 do 200 semenčic. Pri pregledu ejakulata žrebca, merjasca, psa in mačka, kjer pričakujemo koncentracijo semenčic med 50 in 300 x 10^6/ml, pripravimo razredčitev 1 : 20 do 1 : 100 (500 do 100 µL semena na 10 ml vode), pri bikih, ovnih in kozlih, kjer pričakujemo precej višje koncentracije semenčic (600 x 10^6 do nekaj milijard semenčic na mililiter), pa pripravimo razredčitev 1 : 200 do 1 : 800 (50 do 12,5 µL semena na 10 ml vode). Večinoma najprej pripravimo nižje razredčitve, pripravljene raztopine semena pa po potrebi dodatno razredčimo.



Slika 19: Vpliv števila preštetih semenčic na zanesljivost določanja koncentracije semenčic – prirejeno po Brito LFC in sod., 2016 (36)

Za določitev koncentracije semenčic največkrat uporabimo številne komore (po Neubauerju, Thomi ter Bürkerju in Türku). Vse tri komore imajo enako višino (100 µm) in enako velikost mreže, ki označuje območje, v katerem ugotavljamo število semenčic. Uporabljamo lahko tudi Maklerjeve komore, vendar so manj zanesljive, saj imajo desetkrat nižjo višino (10 µm) in zato na isti površini pregledamo desetkrat manjši volumen, kar močno zniža zanesljivost rezultatov. Zaradi nižje višine se Maklerjeve komore pogosteje uporabljajo predvsem za računalniško analizo gibanja semenčic, saj omogočajo pregled celotnega vzorca v enem fokusu.

Prve tri najpogosteje uporabljene številne komore so sestavljene iz debelejše predmetnice in krovnega stekla. Predmetnica ima na vsaki strani srednjega dela izrisani dve mreži. Površina najmanjših v mreži izrisanih kvadratov znaša 0,0025 mm^2, 16 manjših kvadratov pa sestavlja

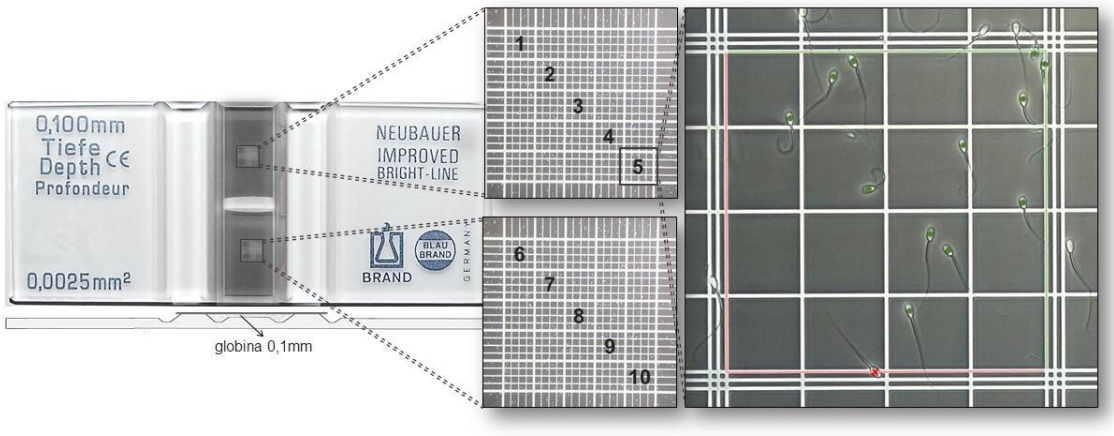
večji kvadrat s površino 0,04 mm^2. Največkrat pregledamo in določimo število semenčic v desetih večjih kvadratih, kar predstavlja 1/25 mm^2. Po postavitvi pokrivnega stekla se na mestu, kjer sta izrisani mreži, oblikuje natančno 0,1 mm visoka reža, v kateri se razporedi vzorec semena. V desetih večjih kvadratih preiščemo 0,04 mm^3, kar upoštevamo tudi pri končnem izračunu koncentracije semenčic in zato število preštetih semenčic pomnožimo s 25 (1 mm^3/0,04 mm^3). Dobljeno vrednost dodatno pomnožimo še s stopnjo razredčitve (npr. 200 pri razredčitvi 1 : 200). Izračunane vrednosti predstavljajo koncentracijo semenčic, izraženo s številom semenčic na mikroliter (µl). Če koncentracijo prikažemo s številom semenčic na mililiter (ml), moramo rezultat pomnožiti s 1000.

Pred analizo krovno steklo položimo na posebej oblikovane robove predmetnice, ki jih pred tem navlažimo z destilirano vodo (zagotovi ustrezno pritrditev krovnega stekla). Med krovnim steklom in površino, kjer se nahaja mreža za štetje semenčic, se tako oblikuje prostor z višino 0,1 mm. V ta prostor na vsaki strani previdno apliciramo približno 10 µL pripravljene, dobro premešane raztopine semena. Pomembno je, da raztopina napolni celotno komoro oz. del, na katerem je izrisana mreža za štetje. Višek raztopine pa se lahko prerazporedi v stranskih vdolbinah.



Slika 20: Aplikacija raztopine semena v števno komoro

Po aplikaciji vzorca počakamo 5 do 10 minut, da se semenčice usedejo na dno komore. Za štetje semenčic uporabljamo faznokontrastni mikroskop in 50–200x povečavo.



Slika 21: Prikaz števne komore in štetja semenčic. V poljih, označenih z 1 do 10, ugotavljamo prisotnost semenčic. Štejemo z zeleno barvo označene semenčice. Rdeče označenih semenčic, katerih glave se nahajajo na rdeče označenih mejnih črtah, ne štejemo.

Enačba za izračun koncentracije semenčic:

C = N x R x (1 mm^3/VP mm^3) x 1000

VP = 0,0025 mm^2 x 0,1 mm x 16 x 10 **= 0,04 mm^3**

Če ugotavljamo semenčice v 10 poljih, lahko formulo poenostavimo:

C = N x R x 25 x 1000

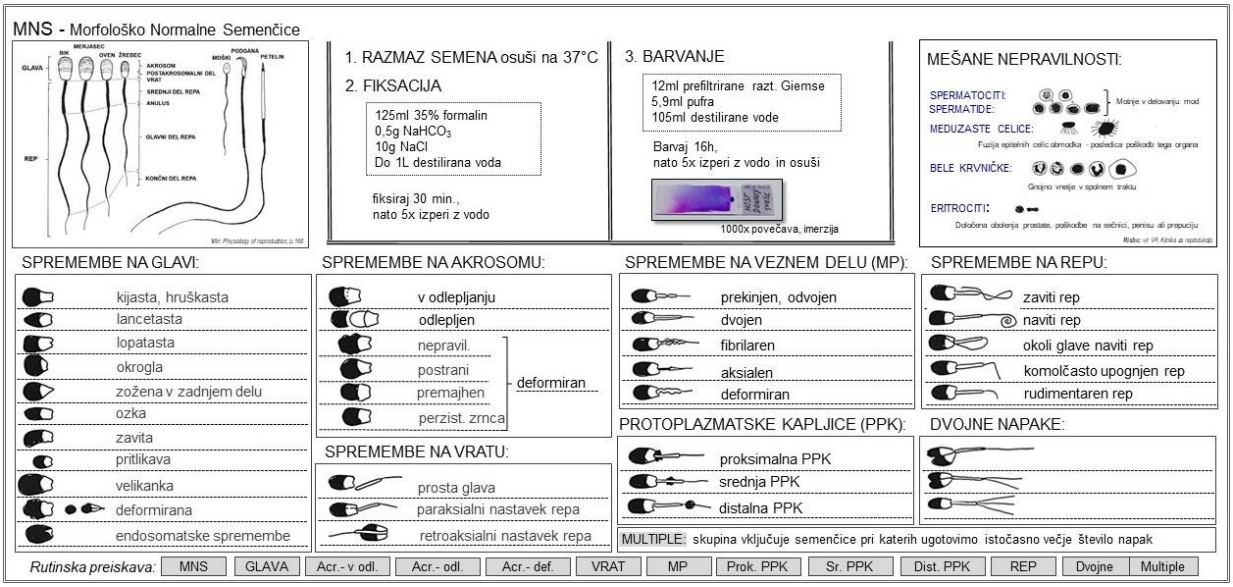
(C – koncentracija semenčic x 10^6/ml; N – število preštetih semenčic; R – razredčitev; VP – volumen, v katerem so preštete semenčice)

1.3.2.3 Morfologija semenčic

Določanje morfologije predstavlja eno izmed osnovnih metod pri ugotavljanju oploditvene sposobnosti semenčic. Posamezne morfološke napake lahko bolj ali manj vplivajo na oploditveno sposobnost prizadetih semenčic. Na oploditveno sposobnost preiskovanega vzorca semena ima velik vpliv tudi skupni odstotek morfološko nenormalnih semenčic in vrsta nepravilnosti. Višji kot je odstotek semenčic s poškodovanimi akrosomi, večja je količina izločenih akrosomalnih encimov, ki negativno vplivajo na vitalnost, dolgoživost in oploditveno sposobnost morfološko normalnih in vitalnih semenčic.

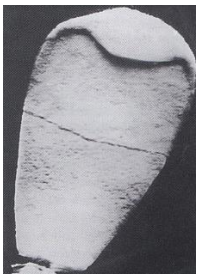
Morfologijo semenčic določamo glede na mesto, kjer se nahaja poškodba (akrosom, glava, vrat, srednji del in rep), vrednotimo pa tudi prisotnost protoplazmatske kapljice. Glede na kraj nastanka poškodbe ločimo primarne (modo), sekundarne (nadmodek) in terciarne (posledica manipulacije semenčic po ejakulaciji) semenčice, glede na pomembnost pa pomembne in manj pomembne ter glede na možnost kompenzacije na kompenzacijske in nekompenzacijske.

Morfologijo semenčic lahko določamo na fiksiranih preparatih, ki so neobarvani ali obarvani. Na neobarvanih preparatih lahko morfologijo določamo po fiksaciji semenčic z raztopino po Hancocku (2784 g tri natrijev citrat dva hidrat, 4 mL 37 % raztopine formalina in destilirana voda do 100 mL) (37). V tem primeru semenčice razredčimo z raztopino po Hancocku, vzorec semena pa nato pregledamo po pokritju s krovnim steklom. Ker semenčice niso obarvane, za preiskavo potrebujemo faznokontrastni mikroskop. Preiskavo pa moramo opraviti v nekaj urah po razredčitvi z raztopino po Hancocku. Opisani način uporabljamo predvsem za hitro določanje morfologije v laboratoriju, ki je opremljen s faznokontrastnim mikroskopom. Najpogosteje pa morfologijo semenčic določamo na obarvanih preparatih. V tem primeru najprej pripravimo razmaz semenčic, ga posušimo, nato fiksiramo in obarvamo z enim izmed barvil. Za hitro barvanje lahko uporabimo npr. Spermac® barvilo (Minitube, Nemčija), s pomočjo katerega lahko preparat preiščemo že nekaj minut po pripravi razmaza. Kvalitetnejše obarvanje posameznih delov semenčic pa dosežemo z uporabo barvila in postopka po Giemsi, kjer pa postopek fiksacije in barvanja traja 16,5 ure.



Slika 22: Določanje morfologije semenčic glede na mesto na semenčici; MNS – morfološko normalne semenčice

Pri klinični diagnostiki sta najpomembnejši delitvi glede na pomembnost in glede na možnost kompenzacije. Med pomembnejše napake prištevamo napake na akrosomu in napake na glavi ter vse nekompenzacijske napake, to je napake, pri katerih oploditvene sposobnosti semena ne moremo povečati s povečanjem števila semenčic v osemenjevalni dozi. Med nekompenzacijske napake prištevamo npr. t. i. gumbasti akrosom (*ang*. knobbed acrosome). Če v vzorcu semena ugotovimo manjši odstotek semenčic z omenjeno napako, je oploditvena sposobnost plemenjaka zmanjšana. Če je v vzorcu višji odstotek semenčic, ki imajo gumbasti akrosom (25–100 %), pa je takšen plemenjak praktično neploden in tudi z dvigom skupnega števila semenčic v osemenjevalni dozi ne moremo doseči sprejemljive stopnje oploditvene sposobnosti. Pri *in vitro* oploditvi z intaktnimi semenčicami plemenjaka, pri katerem so ugotovili visok odstotek semenčic z gumbastimi akrosomi, so ugotovili zmanjšan razvojni potencial zarodkov. Poleg tega v vzorcu, v katerem ugotovimo semenčice s takšnimi napakami, niti drastičen dvig skupnega števila semenčic nima pozitivnega vpliva na njihovo oploditveno sposobnost. Napaka je torej zelo pomembna in je ni mogoče kompenzirati (29).



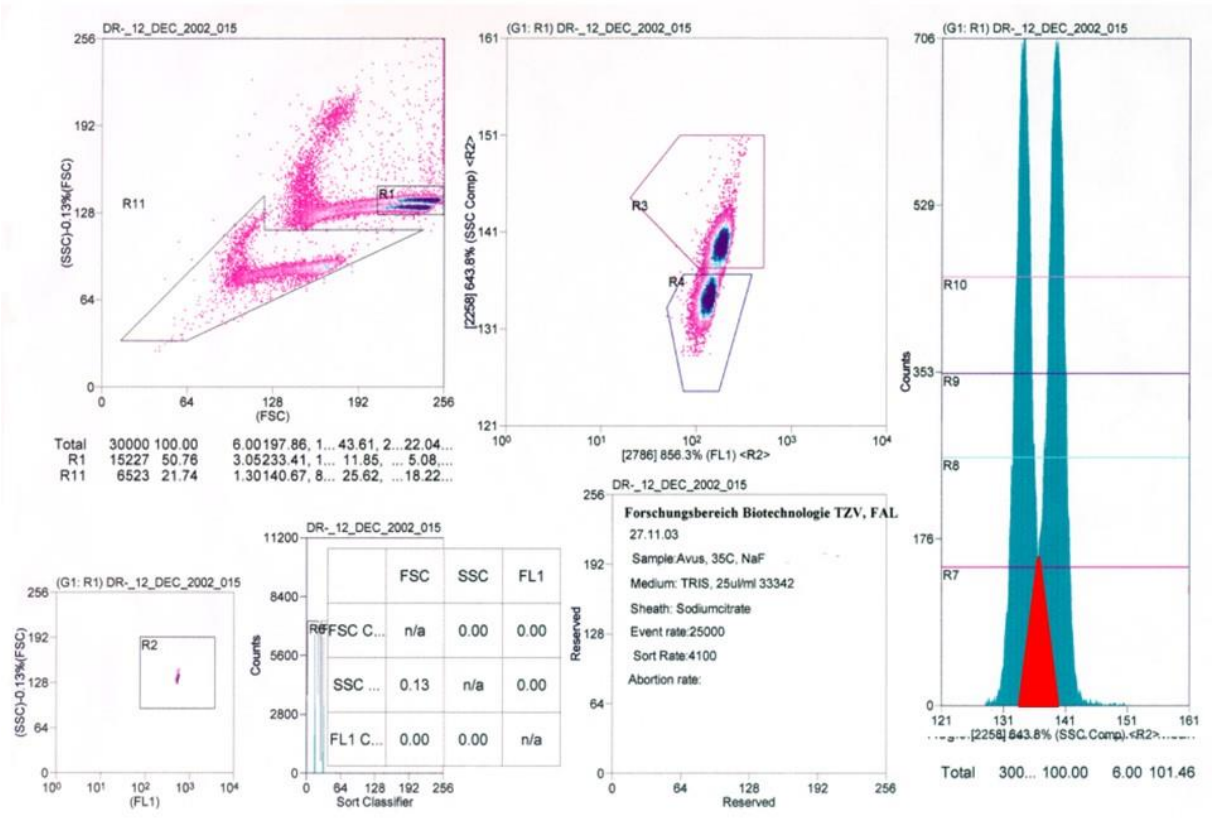
Slika 22a: Gumbasti akrosom (vir: DE Noakes in sod., Veterinary reproduction and obstetrics, 9. izdaja, 2009, str. 753)

1.3.2.4 Vitalnost semenčic

Poleg ugotavljanja gibljivosti in morfologije predstavlja vitalnost semenčic zelo pomemben posredni podatek o njihovi oploditveni sposobnosti. Vitalnost semenčic lahko ugotavljamo z

različnimi rezistentnimi testi v kombinaciji z gibljivostjo in morfologijo. Med te teste prištevamo 24-urni rezistentni test na 5 °C (Müllerjev test). Pri tej analizi pred inkubacijo semenčic na 5 °C in po njej ugotavljamo različne parametre, kot so gibljivost, morfologija, supravitalna barvanja, hipoosmotski test in podobno. Na podlagi kvalitete semenčic pred rezistentnim testom in po njem lahko sklepamo o njihovi oploditveni sposobnosti. Podobno lahko termorezistentni test opravljamo tudi na višjih temperaturah, npr. pri 37 °C. Pri tej analizi je čas inkubacije skrajšan na nekaj ur. Po tem času pa ponovno opravljamo analize, s katerimi ugotavljamo razliko v kvaliteti med različnimi vzorci semena.

S supravitalnimi barvanji ugotavljamo razliko med prehodnostjo celičnih membran ali aktivnostjo posameznih organelov semenčic, npr. aktivnost mitohondrijev. Prehodnost membran lahko ugotavljamo z uporabo navadnih ali fluorescenčnih barvil, analize pa opravimo z navadnim ali fluorescenčnim mikroskopom. Pri uporabi fluorescenčnih barvil lahko za analize poleg mikroskopa uporabimo tudi pretočni citometer. Prednost tega je v izredno velikem številu analiziranih semenčic v kratkem času. Medtem ko lahko z mikroskopom analiziramo zgolj nekaj sto semenčic, lahko v enakem časovnem obdobju z uporabo pretočne citometrije analiziramo več 10 tisoč semenčic.

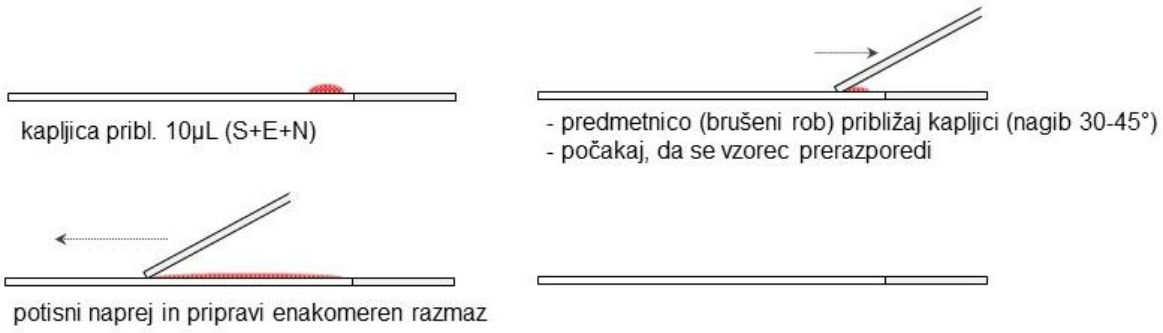


Slika 23: Ugotavljanje različnih populacij semenčic po obarvanju s fluorescenčnimi barvili z uporabo pretočne citometrije

Glede na to, da predstavlja pretočna citometrija sorazmerno drag postopek za ugotavljanje vitalnosti semenčic, se pri rutinskih analizah v kliničnih razmerah pogosto poslužujemo enostavnejših testov. Te teste lahko izvajamo ob pomoči navadnega ali faznokontrastnega, v določenih primerih pa tudi fluorescenčnega mikroskopa.

1.3.2.4.1 Eozin/nigrozin

Eozin je barvilo, ki prehaja le skozi poškodovano celično membrano in semenčice obarva rdeče oz. rožnato. Semenčice, ki nimajo poškodovane celične membrane, ostanejo neobarvane. Barvilo nigrozin se uporablja le zaradi ustvarjanja večjega kontrasta in lažjega ugotavljanja obarvanja z eozinom. Obstaja več različnih postopkov barvanja, ki ga lahko izvajamo v epruveti ali neposredno na predmetnici. Zaradi večje natančnosti in boljše ponovljivosti bomo predstavili postopek barvanja v epruveti. Vzorcu semena (50 µL) dodamo pripravljeno 2 % raztopino eozina (100 µL). Raztopini dobro premešamo in inkubiramo 30 sekund na 37 °C. Nato dodamo 10 % raztopino nigrozina (150 µL), vzorec s pipeto dobro premešamo in takoj naredimo razmaz na ogreti predmetnici. Seme, raztopine in predmetnica naj bodo ogreti na 37 °C. Vzorec nato preiščemo z mikroskopom pri 400- do 1000x povečavi. Pri kvalitetnem vzorcu svežega semena pričakujemo minimalno 70 %, pri zamrznjenem pa nad 50 % semenčic, ki se niso obarvale z eozinom.



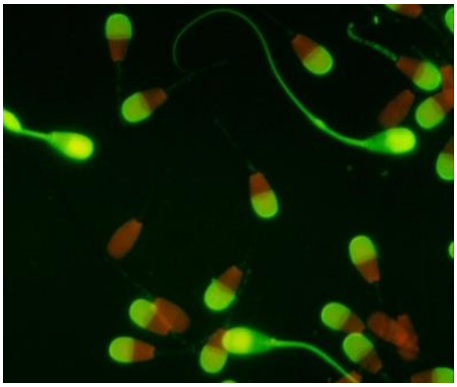
Slika 24: Priprava razmaza na predmetnici (S – raztopina semena, E – raztopina eozina, N – raztopina nigrozina)



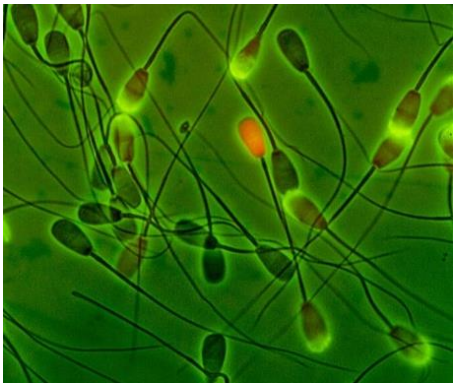
Slika 25: Analiza semenčic po uporabi supravitalnega barvila eozin (eozin negativni – bele barve, eozin pozitivni – rdeče barve)

1.3.2.4.2 Uporaba fluorescenčnih barvil

Široka paleta fluorescenčnih barvil omogoča poleg ugotavljanja intaktnosti celične membrane tudi določanje številnih drugih parametrov, s katerimi lahko natančneje proučimo aktivnost in vitalnost semenčic. Posamezna barvila lahko uporabljamo samostojno ali sočasno v kombinaciji različnih barvil. Analize pa lahko opravimo s fluorescenčnim mikroskopom ali pretočno citometrijo. Med fluorescenčnimi barvili se pogosto uporabljajo propidijev jodid (PI), karboksifluorescein diacetat (CFDA), fluorescein izotiocianat – vezan arašidov aglutinin (FITC-PNA), karbocianin barvilo (JC-1) in številna druga. S PI podobno kot z eozinom ugotavljamo integriteto celične membrane, CFDA vstopi v vse semenčice, pri vitalnih pa se zaradi delovanja esteraz obarva zeleno. FITC-PNA se veže na notranjo akrosomalno membrano, kar omogoči njeno obarvanje, če je poškodovana zunanja akrosomalna membrana, JC-1 pa se uporablja za ugotavljanje membranskega potenciala mitohondrijev in s tem njihove aktivnosti.



Slika 26: Ugotavljanje vitalnosti semenčic po barvanju s fluorescenčnimi barvili in preiskavo s fluorescenčnim mikroskopom



Slika 27: Ugotavljanje vitalnosti semenčic in integritete akrosomalne membrane po barvanju s fluorescenčnimi barvili (PI/FITC-PNA) in preiskavo s fluorescenčnim mikroskopom

V tem primeru se rdeče obarvajo semenčice s poškodovano plazemsko membrano, zeleno pa semenčice s poškodovano zunanjo in intaktno notranjo akrosomalno membrano, na katero se veže FITC-PNA.

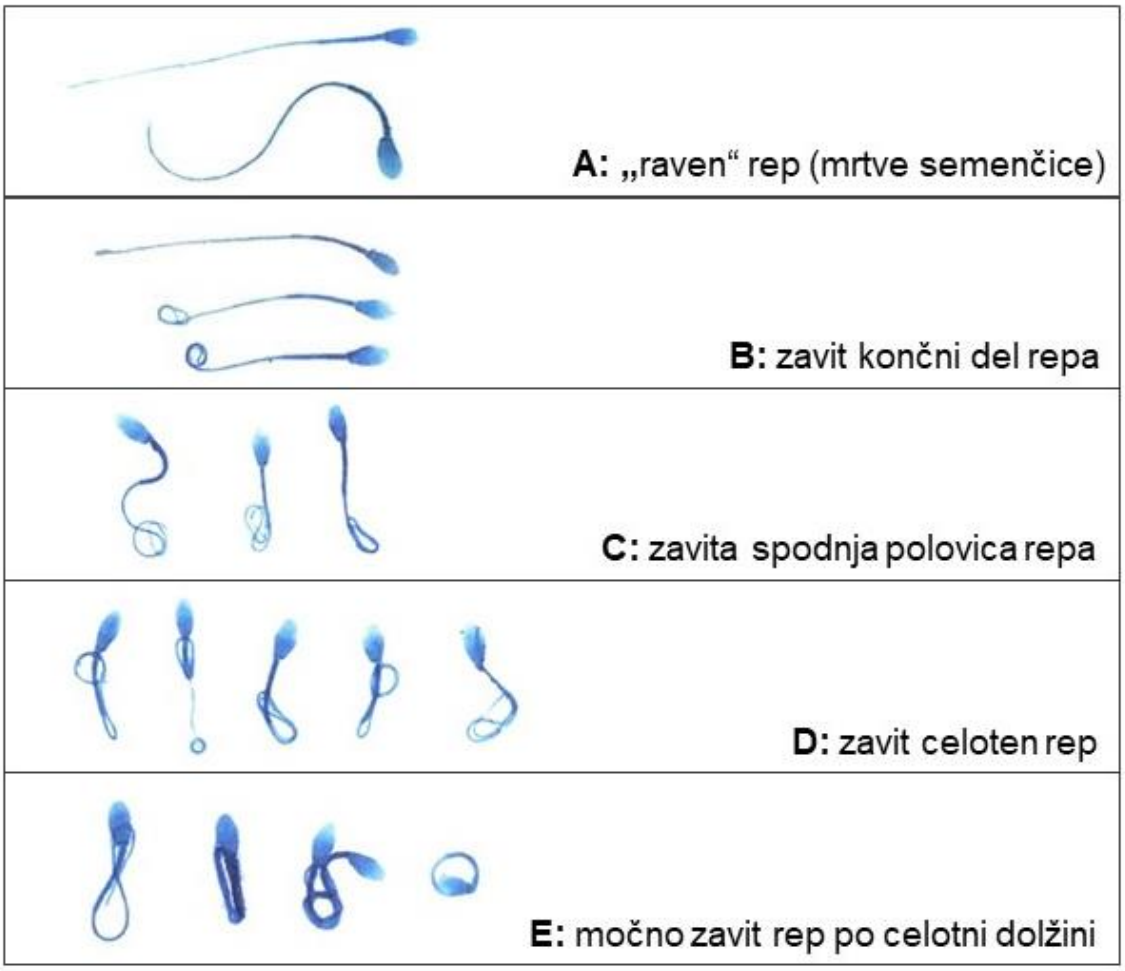
1.3.2.4.3 Hipoosmotski test (HOST)

HOST je sorazmerno preprost test, s katerim ugotavljamo integriteto celične membrane semenčic. Opravljamo ga s pomočjo hipoosmotske raztopine. Zaradi velikih razlik v osmolarnosti tekočina vdre pod celično membrano, kar povzroči tvorbo majhnih izboklin, okrog katerih se zavije rep semenčice. Semenčice, pri katerih po določenem času inkubacije v hipoosmotski raztopini ugotovimo zavit rep, imajo nepoškodovano membrano. Pri semenčicah, ki imajo poškodovano celično membrano, tekočina prosto prehaja, zato ne prihaja do tvorjenja izboklin in rep ostane raven (38). Glede na to, da imamo v vzorcu semena že pred HOST-om različen odstotek semenčic z zavitimi repi, moramo to upoštevati tudi pri končni oceni. Od skupnega odstotka zavitih repov, ki jih ugotovimo po HOST-u, moramo zato odšteti odstotek zavitih repov, ki smo jih ugotovili z morfološko analizo.

% HOST poz. semen. = % zavitih repov po HOST – % morfološko zavitih repov

Glede na intenzivnost zavijanja repov semenčice, ki so pozitivno odreagirale v hipoosmotski raztopini, razdelimo v štiri skupine (B, C, D, E). Skupina E vključuje semenčice, pri katerih je prišlo do najbolj intenzivnega zavijanja repov.

Pri testu lahko uporabljamo enostavne raztopine sladkorjev in/ali tudi bolj kompleksno sestavljene, ki imajo osmolarnost od 50 do 150 mOsm/l. Ena izmed najbolj enostavnih raztopin je hipoosmotska raztopina saharoze. Pripravimo jo tako, da natehtamo 0,856 g saharoze in dodamo do 50 ml destilirane vode. Pripravljena raztopina vsebuje 50 mOsm/l. Test izvedemo tako, da 1 mililitru hipoosmotske raztopine dodamo 0,1 ml preiskovanega vzorca semena. Tako raztopina kot seme morajo biti ogreti na 37 °C. Vzorec inkubiramo 30 minut na 37 °C, nato ga pripravimo za analizo. Če analizo opravimo takoj, potem vzorec semena razredčimo z raztopino po Hancocku (imobilizacija semenčic), analizo pa nato opravimo na pokriti kapljici. Iz vzorca semena lahko pripravimo tudi razmaz, ga fiksiramo, obarvamo in analiziramo kot pri klasični morfološki analizi.



Slika 28: Skupine semenčic glede na intenzivnost zavijanja njihovih repov po HOST-u

Po zaključenem makroskopskem in mikroskopskem pregledu semena lahko izračunamo skupno število semenčic in določimo število progresivno gibljivih in morfološko nespremenjenih semenčic v ejakulatu. Te izredno pomembne podatke potrebujemo za natančnejšo postavitev diagnoze pri androloškem pregledu, pripravo osemenjevalnih doz in pri konzerviranju semena.

1.4 KONZERVIRANJE SEMENA

Če semena ne uporabimo neposredno po odvzemu in želimo njegovo oploditveno sposobnost ohraniti več dni ali celo let, ga moramo ustrezno obdelati oz. konzervirati. Izredno pomembni dejavniki, ki vplivajo na uspešnost konzerviranja, so izbira in vzdrževanje primerne temperature, uporaba ustreznih razredčevalcev ter postopek redčenja.

Ločimo dva načina konzerviranja, in sicer tekoče konzerviranje in zamrzovanje. Tekoče konzerviranje je za semenčice manj stresno, vendar pa lahko njihovo oploditveno sposobnost ohranimo le nekaj dni. Pri globokem zamrzovanju so semenčice izpostavljene večjemu stresu, posledično pa se nekoliko zmanjša njihova oploditvena sposobnost. Največja prednost priprave zamrznjenega semena je, da ga lahko uporabimo tudi več desetletij po pripravi, brez povečanja negativnega vpliva konzerviranja.

1.4.2 Tekoče konzerviranje semena

Priprava tekoče konzerviranega semena je sorazmerno preprosta. Pazimo, da odvzamemo zgolj ali vsaj pretežno le semensko frakcijo, saj tako ni potrebno dodatno koncentriranje semena s centrifugiranjem. Znano je namreč, da centrifugiranje vpliva negativno na vitalnost in oploditveno sposobnost semenčic. Določen del izločka prostate je celo zaželen, saj je bilo ugotovljeno, da ima pozitiven vpliv na ohranitev vitalnosti tekoče konzerviranih semenčic, še posebej če so pridobljene iz nadmodkov (24).

Pri pripravi tekoče konzerviranega semena smo predvsem pozorni na izbiro ustreznega razredčevalca, stopnjo razredčitve, temperature redčenja in konzerviranja. Ne glede na izbiro postopka bo vselej prišlo do zmanjšanja kvalitete in oploditvene sposobnosti semenčic v odvisnosti od časa, ki je potekel od odvzema in redčenja. Z izbiro ustreznih postopkov in razredčevalcev lahko zmanjšamo hitrost izgube kvalitete in oploditvene sposobnosti semenčic, ne moremo pa ju povsem zavreti.

Pri uporabi tris-fruktoznega razredčevalca z 20 % dodanega jajčnega rumenjaka hitrost ohlajevanja razredčenega pasjega semena (2,25 °C/min ali 0,2 °C/min) ni vplivala na kvaliteto konzerviranih semenčic. Kvaliteta semena se je v obeh skupinah enakomerno zniževala in je ostala zadovoljiva do 96 ur po začetku redčenja (39). Pasje seme lahko torej, v nasprotju s semenom nekaterih drugih živalskih vrst, sorazmerno hitro ohladimo na temperaturo +5 °C brez negativnega vpliva na kvaliteto semenčic.

V študiji, v kateri so ugotavljali vpliv temperature skladiščenja na kvaliteto semena, razredčenega z razredčevalcem, ki vsebuje jajčni rumenjak in fruktozo ali glukozo, so ugotovili, da je najoptimalnejša temperatura skladiščenja razredčenega semena do 48 ur med 4 in 12 °C. Pri nižjih ali višjih temperaturah (2 °C in 16–24 °C) so po 48 urah ugotovili slabšo gibljivost in višji odstotek semenčic z morfološkimi spremembami (40).

Postopek konzerviranja lahko izvajamo s komercialno pripravljenimi razredčevalci ali kompletnimi kiti, kot je npr. UK Clone® (Surrey, VB). V našem laboratoriju najboljše uspehe dosegamo z modificiranim razredčevalcem po Uppsali, ki ga po pripravi hranimo na –20 °C. Sestava razredčevalca je prikazana v tabeli 1. Vsebuje kislino, pufer in hranilne snovi z dodatkom jajčnega rumenjaka. Ta je pomemben zaradi zaščite celičnih membran semenčic med postopkom ohlajevanja in hranjenja na 5 °C. Za tekoče konzerviranje ali razredčevanje semena pred umetno osemenitvijo lahko uporabimo razredčevalec TM (thaw medium) (41). Razredčevalec I in II (Raz. I in II) pa uporabimo za globoko zamrzovanje semena. Jajčni rumenjak dodamo TM tik pred uporabo. S tem preprečimo, da bi prišlo do oksidacije lipidov, kar bi se lahko zgodilo, če bi hranili kompletno sestavljen razredčevalec z jajčnim rumenjakom. Kljub temu da se podobno kot pri semenu ostalih živalskih vrst tudi za pasje seme lahko sorazmerno uspešno uporablja razredčevalce, ki ne vsebujejo živalskih proizvodov (jajčni rumenjak), temveč se namesto njih uporablja sojine lipoproteine, se zaradi dobrih rezultatov in enostavne uporabe v praksi še vedno največ uporabljajo prav razredčevalci, ki temeljijo na jajčnem rumenjaku (42).

	TM	**Raz. I**	**Raz. II**
TRIS	2,4 g	2,4 g	2,4 g
citronska kislina monohidrat	1,4 g	1,4 g	1,4 g

glukoza	0,8 g	0,8 g	0,8 g
Na-benzilpenicilin	0,06 g	0,06 g	0,06 g
streptomicin sulfat	0,1 g	0,1 g	0,1 g
jajčni rumenjak	–	20 ml	20 ml
glicerol	–	3 ml	7 ml
Equex STM pasta	–	–	0,8 ml
destilirana voda	do 77 ml	do 100 ml	do 100 ml
pH	6,60	6,56	6,48
osmolarnost	320 mOsm	740 mOsm	1370 mOsm

Tabela 1: Sestava razredčevalca za konzerviranje pasjega semena (41)

Ejakulat po odvzemu pregledamo. Če nam je uspelo odvzeti pretežno semensko frakcijo, seme razredčimo z razredčevalcem, ki je ogret na 27 °C v razmerju 1 : 2 do 1 : 5 (seme : razredčevalec). Razredčeno seme ponovno pregledamo in določimo njegovo koncentracijo, skupno število, gibljivost, po potrebi pa tudi vitalnost in morfologijo. Epruveto s semenom nato zavijemo v papirnato brisačo in vstavimo v posebno škatlo iz stiropora ter dobro zapremo. Najbolje je, da za ta namen uporabljamo posebej pripravljene škatle z debelo steno, kar v vzorcu semena zagotavlja večdnevno ohranjanje hladilniške temperature (okoli +5 °C).



Slika 29: Posebna škatla za transport semena (Minitube, Nemčija)

Če je mogoče, se priporoča, da vzorec semena ni večji od treh mililitrov. Pri slabši kvaliteti in manjšem skupnem številu gibljivih semenčic lahko z manjšim volumnom uspešno opravimo tudi transcervikalno endoskopsko intrauterino osemenitev.

1.4.3 Zamrzovanje in hranjenje semena v tekočem dušiku

Zamrzovanje semena v tekočem dušiku je dokaj zahteven postopek, ki vključuje uporabo posebne opreme in specifičnih razredčevalcev (tabela 1). Medtem ko lahko tekoče konzervirano seme pripravimo v splošni ambulanti, potrebujemo za zamrzovanje posebno dodatno opremo in inštrumentarij. Med drugim potrebujemo hladilno komoro, sistem za polnjenje in varjenje slamic ter sistem za zamrzovanje slamic. Nenazadnje pa potrebujemo tudi določene kapacitete za shranjevanje zamrznjenega semena.

Po odvzemu in pregledu ejakulata lahko pričnemo s postopkom zamrzovanja. Priporočeno je, da se zamrzuje zgolj ejakulate, pri katerih ugotovimo minimalno 70 % gibljivih semenčic. V tem primeru lahko tudi po odmrzovanju pričakujemo zadovoljivo kvaliteto semena. V izjemnih primerih, npr. pri elitnem plemenjaku, se odločimo tudi za zamrzovanje semena, ki ima slabšo kvaliteto. Vendar pa se lahko zgodi, da takšno seme ne bo primerno za uporabo po odmrzovanju. V prihodnosti bomo verjetno takšno seme uporabljali v postopkih *in vitro* fertilizacije, ki pa jih v tem trenutku pri psih še ne moremo rutinsko izvajati.

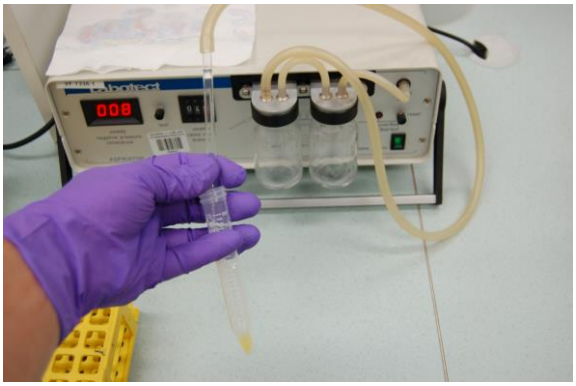
Po odvzemu ejakulata moramo semenčice najprej zgostiti. Za ta namen se poslužujemo centrifugiranja. Po njem odstranimo semensko plazmo in jo nadomestimo z ustreznim razredčevalcem. Razredčeno seme ohladimo na 5 °C in mu dodamo razredčevalec II, ki vsebuje višjo koncentracijo glicerola. Nato s semenom napolnimo slamice, jih zavarimo in po določenem času ekvilibracije zamrznemo. Postopek je prikazan s slikami 30–34.



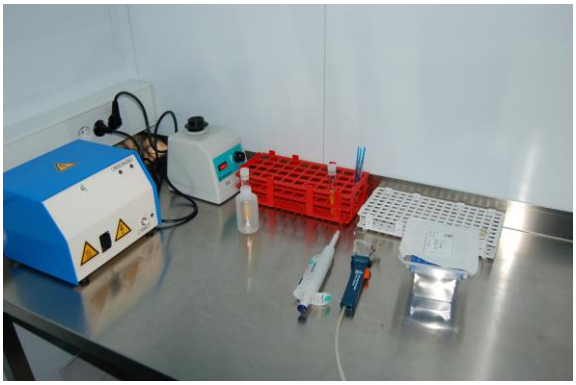
Slika 30: Faznokontrastni mikroskop, opremljen z grelno mizico, ki omogoča kvalitetno analizo gibljivosti semena. Prikazana je tudi vodna kopel, v kateri ohranjamo razredčevalce in odvzeto seme na ustrezni temperaturi.



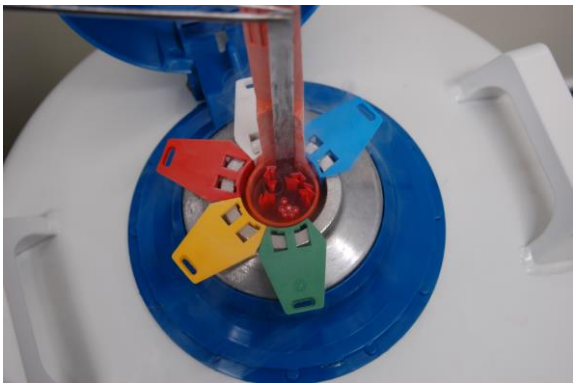
Slika 31: Centrifuga za koncentriranje semenčic



Slika 32: Aspirator za odstranitev supernatanta



Slika 33: Aparature in oprema, ki so potrebne za polnjenje in varjenje slamic



Slika 34: Kontejner za shranjevanje zamrznjenega pasjega semena

Slamice, ki jih uporabljamo za zamrznjeno seme, moramo primerno označiti. Večinoma na slamico zapišemo pasmo in ime psa, njegovo rodovniško številko, datum ter mesto zamrzovanja. V posameznih primerih, posebej pri izvozu semena v določene države, slamice označimo specifično glede na zahteve države uvoznice. Izredno pomembno je tudi vodenje protokolov zamrzovanja, s katerimi zagotovimo ustrezno sledljivost individualnih vzorcev.

Ugotovljeno je bilo, da lahko seme kvalitetno zamrznemo po razredčitvi s CaniPRO Freeze A® (Minitube, Nemčija) tudi po 24-urni inkubaciji na 5 °C, brez negativnega vpliva na kvaliteto semena (43). To je izredno pomemben podatek, saj pomeni, da seme lahko odvzamemo npr. v splošni ambulanti, kjer ga razredčimo z razredčevalcem za tekoče konzerviranje, ohladimo in pošljemo v večji center, kjer ga zamrznejo.

Podobne rezultate so ugotovili tudi pri razredčevanju semena s tris-glukoznim razredčevalcem. Ugotovili so, da držanje razredčenega semena na 4 °C do 48 ur nima negativnega vpliva na kvaliteto po zamrzovanju odtajanega pasjega semena oz. da niso ugotovili razlik v kvaliteti s semenom, ki je bilo procesirano in zamrznjeno neposredno po odvzemu, in semenom, pri katerem je bil dodan razredčevalec z glicerolom in seme zamrznjeno 6, 12, 24 in 48 ur po odvzemu.

Na naši kliniki smo ugotovili, da lahko nerazredčen ejakulat držimo na sobni temperaturi do 2 uri in ga šele nato procesiramo za zamrzovanje. V primerjavi s semenom, ki smo ga procesirali takoj po odvzemu, nismo ugotovili negativnega vpliva na kvaliteto semenčic. Torej imamo približno dve uri časa, da pričnemo s postopki zamrzovanja, seme pa lahko tudi v tem primeru odvzamemo v ločeni ustanovi in dostavimo v laboratorij, kjer opravljajo zamrzovanje semena.

2 POJATVENI CIKLUS PRI PSICI IN NJEGOVA SINHRONIZACIJA

V primerjavi z drugimi živalskimi vrstami ima pojatveni ciklus pri psici dokaj specifičen potek. Razlikuje se predvsem v dolžini in pogostnosti pojatev ter dolžini spolne neaktivnosti ali anestrije. Zelo pomembno je, da poznamo normalni potek pojatvenega ciklusa, kdaj nastopi ovulacija ter kdaj fertilno in kdaj fertilizacijsko obdobje. Fertilno obdobje predstavlja čas, ko zaskok lahko vodi do oploditve jajčnih celic in brejosti, fertilizacijsko obdobje pa predstavlja čas, v katerem se jajčna celica lahko oplodi. Fertilizacijsko obdobje se prične približno 2 dni po ovulaciji, zaključi pa 5 dni po ovulaciji, fertilno obdobje pa predstavlja celotno fertilizacijsko obdobje ter čas, ki ga semenčice lahko preživijo v rodilih samice, kar pomeni nekaj dodatnih dni oz. pri zelo kvalitetnem semenu in optimalnih pogojih v rodilih maksimalno tudi do 10 dni (44).

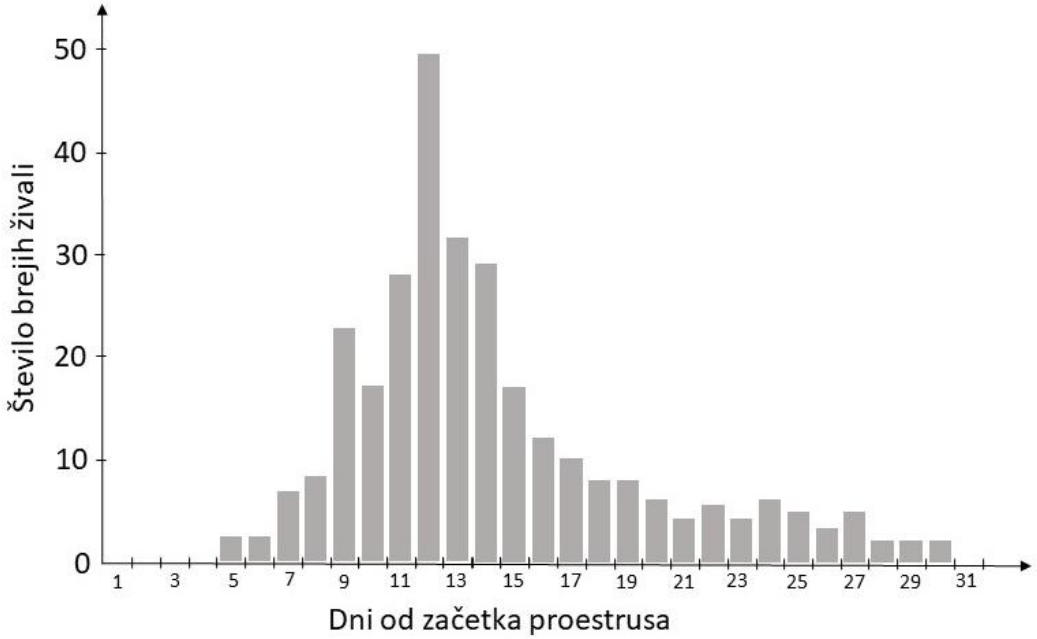
2.1 POTEK POJATVENEGA CIKLUSA PRI PSICAH

Pri psicah poteka t. i. monoestrični pojatveni ciklus. To pomeni, da sta dve gonitvi med seboj ločeni z različno dolgim obdobjem brez zaznavne spolne aktivnosti ali anestrusa. Med gonitvijo in anestrijo poteka še t. i. metestrus, ki predstavlja fazo aktivnih rumenih teles. Dolžina metestrusa je pri psici neodvisna od brejosti in traja v povprečju 63 dni. Dolžina anestrusa oz. časa med dvema gonitvama (metestrus in anestrus) je dokaj značilna za posamezno psico, močno pa se razlikuje med posameznimi živalmi. Fiziološko traja od 2 do 12 mesecev in več, v povprečju okrog 7 mesecev. Zelo pomembno je, da se zavedamo, da rodila potrebujejo minimalno 4 mesece za popolno regeneracijo. To pomeni, da lahko normalno stopnjo koncepcije pričakujemo le, ko je čas med dvema gonitvama enak ali daljši od 4 mesecev. Predvsem smo pozorni, da v primeru sinhronizacije gonitve upoštevamo, da je indukcija spolne aktivnosti smiselna le, ko je od zadnje gonitve poteklo najmanj 4 mesece.

Pri psicah ločimo 4 faze pojatvenega ciklusa, in sicer proestrus, estrus, metestrus in anestrus. Medtem ko je dolžina metestrusa dokaj specifična in traja 63 dni ne glede na to, ali je psica breja ali ne, se dolžine proestrusa in estrusa med posameznimi psicami močno razlikujejo. V povprečju pa traja vsaka izmed njiju med 8 in 10 dni. Ob začetku proestrusa se pojavi krvavitev iz nožnice, vendar pa psica še ne dovoli zaskoka. Proestrus se nadaljuje v estrus. Estrus je obdobje, v katerem psica dovoli zaskok, pojavi se ovulacija, pride do zaskoka, koncepcije in rasti rumenega telesa oz. teles. Estrus se nadaljuje v metestrus, to je obdobje, v katerem psica

ne dovoli zaskoka, nastopi pa tudi znatnejši dvig progesterona. V času metestrusa poteka brejost ali navidezna brejost. Anestrus označuje obdobje med metestrusom in proestrusom. Zanj je značilna neaktivnost jajčnikov, neopazni pa so tudi znaki spolne aktivnosti.

Kljub temu da je pri večini psic fertilizacijsko obdobje med 14. in 16. dnem od začetka proestrusa, pa obstajajo velike razlike med posameznimi živalmi. Pri nekaterih živalih ovulacija nastopi že 5. dan po začetku proestrusa, pri drugih pa šele 30. dan. Če bi se zanašali zgolj na ustaljeno prakso in paritve opravljali med 12. in 14. dnem po začetku proestrusa, pri velikem številu sicer povsem zdravih psic ne bi moglo priti do oploditve.



Graf 2: Interval med začetkom proestrusa in ovulacijo

Na podlagi rezultatov, prikazanih v grafu 1, lahko zelo nazorno vidimo, da je fertilizacijsko obdobje pri večini psic dejansko med 12. in 15. dnem, kljub temu pa je pri velikem številu psic zunaj teh okvirov.

2.2 UGOTAVLJANJE FAZE CIKLUSA

Fazo ciklusa določamo z namenom določanja fertilnega in fertilizacijskega obdobja ter optimalnega časa za hormonsko manipulacijo ciklusa in ovulacije. Diagnostični postopki, ki so nam v pomoč pri natančni določitvi, so anamneza, inspekcija in palpacija zunanjih genitalij, odvzem vaginalnega brisa in vaginoskopija ter določanje ravni spolnih hormonov, predvsem progesterona.

Pomembno je, da poznamo specifični potek pojatvenega ciklusa pri psicah ter razliko med fertilnim in fertilizacijskim obdobjem. Fertilno obdobje je obdobje, v katerem zaskok ali umetna oploditev še lahko vodi do uspešne oploditve. Pri naravnem zaskoku ali umetni osemenitvi s svežim semenom se to obdobje prične tudi do 7 dni pred ovulacijo in traja do petega ali celo šestega dne po ovulaciji. Pri tekoče konzerviranem semenu je dolžina fertilnega obdobja odvisna od vrste razredčevalca, postopka konzerviranja in časa, ki je potekel od začetka konzerviranja do osemenitve. V primerjavi s svežim semenom je fertilno obdobje tekoče

konzerviranega semena večinoma skrajšano za nekaj dni. Pri zamrznjenem semenu je to obdobje močno skrajšano in se prične šele približno 24 ur po ovulaciji. Fertilizacijsko obdobje pa je obdobje, ko lahko pride do oploditve jajčne celice. Pri psicah je to obdobje sorazmerno specifično. Medtem ko se pri drugih živalskih vrstah prične neposredno po ovulaciji in traja nekaj ur, se pri psici prične šele 60 ur po ovulaciji, zrele jajčne celice pa nato obdržijo oploditveno sposobnost nadaljnjih 48 ur (45).

2.2.1 Adspekcija in vaginalna citologija

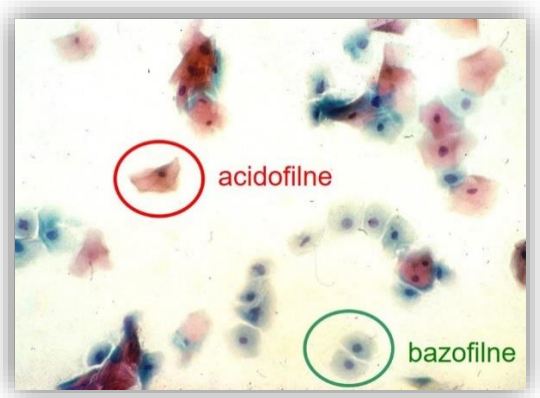
Edem sramničnih ustnic se prične povečevati ob začetku proestrusa. V prikazanem primeru lahko opazimo povečevanje otekline do 5. dne, kar je značilno za proestrus. Močna oteklina nato ostane vse do 16. dne, ko nastopi vrhunec estrusa in ovulacija. Po ovulaciji se v prikazanem primeru 17. dan oteklina prične zmanjševati in takrat nastopi najoptimalnejši čas za osemenitev oz. čas, ko predvidevamo, da bi lahko prišlo do oploditve jajčnih celic. Natančnejša določitev t. i. fertilizacijskega obdobja je mogoča na podlagi pregleda vaginalnega brisa in določanja ravni progesterona in/ali luteinizirajočega hormona.



Slika 35: Sramnične ustnice in njihove spremembe med pojatvenim ciklusom (avtor slike: S. Baranja)

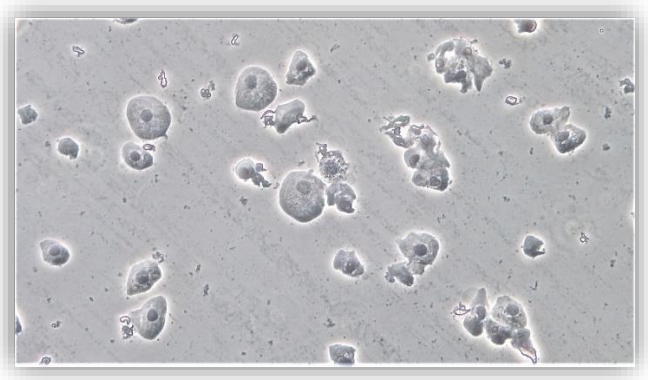
Pod vplivom estrogenov se spreminja zgradba vaginalne sluznice. Povečane koncentracije estrogenov v času gonitve povzročijo zadebelitev vaginalne sluznice in nastanek sekundarnih gub ter več plasti keratiniziranih celic. Nastanek dodatnih sekundarnih gub in plasti poroženelih celic omogočajo povečanje lumna nožnice ter njeno zaščito. Oba dejavnika sta pomembna pri zaščiti sluznice ob koitusu. Poleg epitelnih celic v razmazu ugotavljamo še prisotnost polimorfonuklearnih levkocitov. Tudi pri povsem zdravih psicah jih v manjši količini zaradi poroženelosti in zadebelitve stene ugotovimo v proestrusu, v estrusu teh celic ne najdemo, ponovno pa se pojavijo v velikih količinah po koncu estrusa, ko se zmanjša poroženelost epitelnih celic in pride do odstopanja posameznih delov sluznice. Zaradi razlik v poroženelosti sluznice med živalmi in tudi pri posamezni živali lahko stopnjo poroženelosti in pojav polimorfonuklearnih levkocitov služi zgolj za orientacijo. Bolj natančno lahko fazo pojatvenega ciklusa ugotovimo z merjenjem ravni progesterona in luteinizirajočega hormona v krvi. Upoštevati moramo, da je pri določenih živalih maksimalna poroženelost sluznice pri 80 % poroženelih celic, pri drugih živalih pa le 60 %. Lahko se pojavi tudi t. i. razdeljeni estrus, pri katerem najprej ugotovimo visok delež poroženelih celic, nato se ta močno zmanjša in tik pred ovulacijo ponovno močno naraste. Zaradi vseh teh dejavnikov imamo oceno vaginalnega brisa bolj za orientacijsko informacijo, ki istočasno nakazuje tudi zdravstveno stanje preiskovane živali (prisotnost polimorfonuklearnih levkocitov in bakterij).

Vaginalni bris lahko odvzamemo z vlažno vatenko ali z aspiracijo. V obeh primerih po pripravi razmaza ugotavljamo prisotnost prostih celic v nožnici. Bris lahko ocenimo s faznokontrastnim mikroskopom, pri čemer ugotavljamo predvsem razlike v obliki celic in velikosti jedra. Razmaz pa lahko tudi obarvamo. Z uporabo barvila po Papanikolaouju lahko ločimo acidofilne (poroženele) in bazofilne celice nižjih plasti sluznice. Na podlagi razmerja med acidofilnimi in bazofilnimi celicami lahko določimo fazo ciklusa. Domneva se, da je psica v estrusu, ko je acidofilni indeks 0,9 ali več.

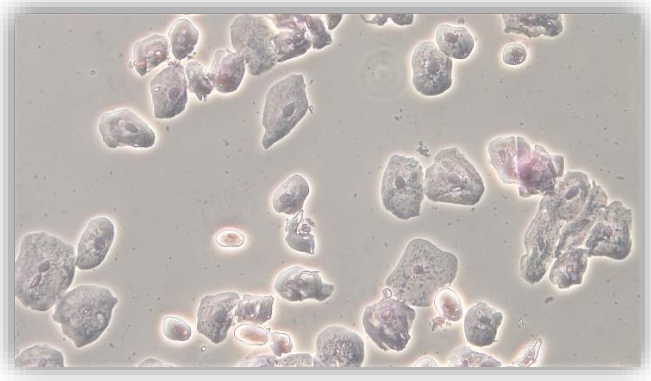


Slika 36: Vaginalni bris po barvanju po Papanikolaouju. Nizek acidofilni indeks nakazuje proestrus.

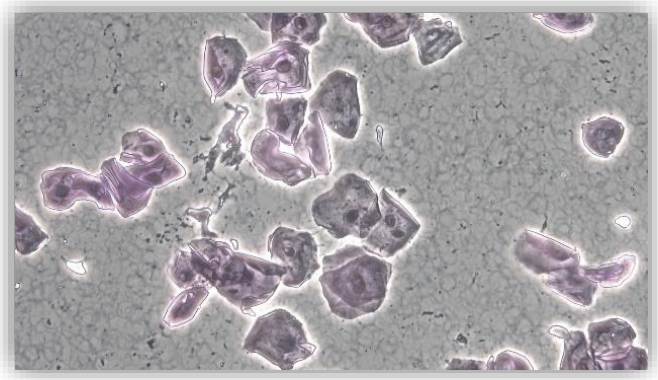
Pripravljeni razmaz lahko obarvamo tudi enostavneje, npr. z uporabo Testsimplets predmetnic (Minitube, Nemčija). S tem ugotavljamo zgolj razliko v morfologiji celic. Na osnovi teh informacij ugotovimo prisotnost in delež poroženelih celic.



Slika 37: Vaginalni bris, obarvan na Testsimplets predmetnici. Preiskovana žival je najverjetneje v začetnem obdobju proestrusa. V brisu smo ugotovili predvsem bazalne celice z okroglo citoplazmo in velikimi jedrom. V brisu ni polimorfonuklearnih levkocitov.



Slika 38: Vaginalni bris, obarvan na Testsimplets predmetnici. Preiskovana žival je najverjetneje v proestrusu. V brisu smo ugotovili predvsem intermedialne ter manjši odstotek bazalnih in superficialnih celic.



Slika 39: Vaginalni bris, obarvan na Testsimplets predmetnici. Ocena poroženelosti sluznice na podlagi oblike celic in jedra (nekatere poroženele celice so celo brez jedra). Zaradi

sorazmerno visokega deleža celic nepravilnih oblik, ki so brez piknotičnega jedra ali imajo samo tega, predvidevamo, da je preiskovana žival v estrusu.

Estrogeni, ki se v največjih količinah izločajo na vrhuncu gonitve, povzročajo poroženelost vaginalne sluznice. Več plasti poroženelih celic je neprehodnih za polimorfonuklearne levkocite, zato na vrhuncu estrusa v vaginalnem brisu ne ugotovimo levkocitov. Ti se ponovno pojavijo ob koncu estrusa, ko se prične tanjšati debelina vaginalne sluznice, ki na posameznih delih tudi odstopi.

Z mikroskopsko oceno brisa nožnice ugotovimo v proestrusu predvsem bazalne celice, ki imajo sorazmerno veliko jedro in zaokroženo citoplazmo oz. celično steno. Celice se obarvajo bazofilno. Poleg bazalnih celic ugotovimo tudi parabazalne in intermedialne celice, ki so predhodnice superficialnih celic s piknotičnimi jedri. V razmazu vidimo eritrocite in tudi posamezne levkocite. Ozadje brisa je večinoma zamazano z gonitvenim sekretom, zaradi citolize pa lahko ugotovimo tudi posamezna prosta jedra.

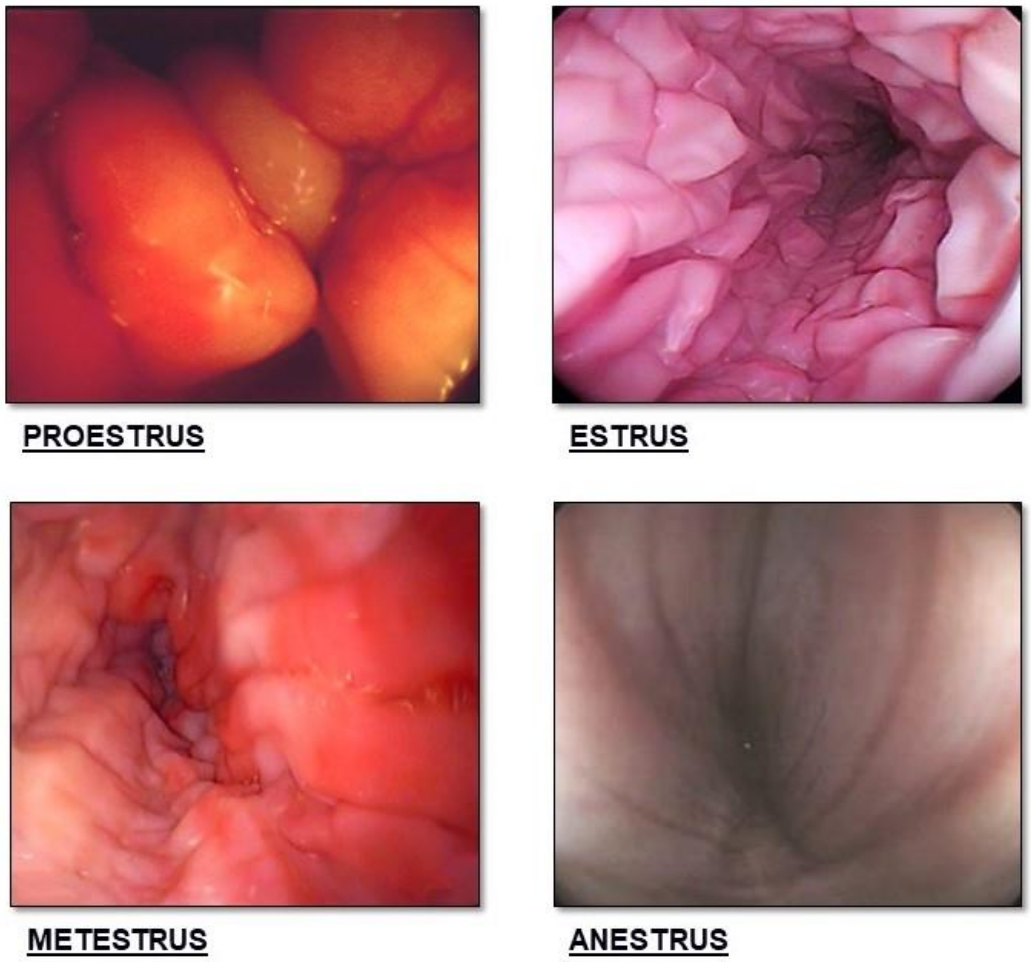
V estrusu ugotovimo pretežno acidofilne superficialne celice, ki jih je v času ovulacije nad 90 %. Eritrocitov in levkocitov v razmazu ni. Levkociti se lahko pojavijo pri patologiji. Ozadje razmaza večinoma nima nobenih znakov citolize.

V začetku metestrusa so še vedno prisotne acidofilne in bazofilne celice, kasneje v metestrusu pa le bazofilne celice, ki ležijo ena ob drugi, podobno kot tkivne celice. Za začetek metestrusa je značilno veliko število levkocitov. Eritrocitov je večinoma manj, ozadje pa je zamazano s sekretom.

V anestrusu na razmazu ugotovimo le posamezne celice iz nižjih plasti sluznice. Večinoma ne ugotovimo eritrocitov, pač pa posamezne levkocite. Pri pregledu lahko ugotovimo tudi posamezna prosta jedra, ki so posledica citolize v steni sluznice, ter različne produkte razgradnje celic.

2.2.2 Vaginoskopski pregled

Vaginoskopski pregled lahko opravimo s posebnim rigidnim endoskopom ali cistoskopom. Endoskop mora biti dovolj tanek, saj le tako lahko preidemo preko zoženega kranialnega dela nožnice do materničnega vratu. Pregled omogoča sorazmerno natančno določitev faze ciklusa, poleg tega pa tudi diagnostiko določenih obolenj (infekcije, poškodbe, anatomske nepravilnosti ipd.). Pregled večinoma opravimo sočasno ob endoskopski transcervikalni intrauterini osemenitvi. V posameznih primerih pa se zaradi pojava patološkega izcedka ali ugotavljanja razlogov neplodnosti odločimo za samostojen pregled.



Slika 40: Vaginoskopski prikaz nožnice pri psici v različnih obdobjih pojatvenega ciklusa

Ob vaginoskopskem pregledu določimo obarvanost sluznice ter razporeditev oz. število in obliko gub v steni nožnice. Poleg tega določimo tudi količino, strukturo in obarvanost sekreta.

Z endoskopskim pregledom nožnice ločimo 5 faz, ki si sledijo ciklično glede na pojatveni ciklus psice. Faze pojatvenega ciklusa sestavljajo: neaktivna faza, edem sluznice, krčenje sluznice, nagubanost oz. skrčenost sluznice, upadanje nagubanosti. Po prehodu preko vseh faz sluznica ponovno preide v neaktivno fazo.

Za neaktivno fazo je značilno, da je sluznica zmerno vlažna, bledo rožnate barve, ugotovimo lahko vzdolžne gube, pred maternicnim vratom pa se na mestu dorzalne središčne gube oblikuje t. i. psevdocerviks. Izcedka je zelo malo. Večje količine lahko tudi obarvanega izcedka so znak patoloških sprememb v nožnici ali tudi globlje v rodilih, npr. maternici. V začetku proestrusa nastopi edem sluznice. V tej fazi je sluznica edematozna oz. otekla, rožnato obarvana, na dnu pa se pojavi krvav izcedek. S prehodom iz proestrusa v estrus se ob začetni povišani ravni estrogenov, ki mu po ovulaciji sledi znižanje estrogenov in povišanje ravni progesterona, sluznica prične krčiti, edem sluznice se zmanjšuje, posledično pa se oblikujejo sekundarne gube. Po dodatnem dvigu progesterona sluznica postane močno nagubana. Močna oz. najintenzivnejša nagubanost sluznice in bledo rožnat izcedek sta značilna za fertilizacijsko

obdobje, ki se prične približno dva dni po ovulaciji in traja do tri dni. Nato sledi upadanje nagubanosti in prehod v neaktivno fazo, ki je značilna za anestrus.

2.2.3 Hormonska diagnostika pojatvenega ciklusa pri psici

Fazo ciklusa in čas ovulacije lahko določamo predvsem z merjenjem ravni progesterona (P4) in do določene mere tudi luteinizirajočega hormona (LH). Z vidika ugotavljanja samega poteka pojatvenega ciklusa je zanimivo tudi spremljanje ravni estrogenov. Za razliko od P4 in LH z estrogeni ne moremo natančno določiti časa ovulacije.

Glede na to, da se LH izloča pulzirajoče in kratkotrajno ter da povzroči luteinizacijo foliklov, ki jo lahko sorazmerno hitro zaznamo z merjenjem ravni P4 v krvnem serumu, se v praksi zelo redko odločamo za opravljanje meritev LH. Zaradi pulzirajočega izločanja LH lahko zelo hitro spregledamo njegov vrh. Če ne ugotovimo samega vrha in če meritve opravljamo v razmaku 24 ur, ne moremo vedeti, ali smo kri odvzeli pred vrhom LH ali po njem, saj so lahko vrednosti LH obakrat enake. Pri P4 pa po LH vrhu vrednosti le še naraščajo, zato lahko, čeprav posredno, z večjo gotovostjo zaznamo sam LH vrh in predvidimo čas ovulacije.

Kliniki se moramo zavedati, da je bolj kot absolutna vrednost progesterona pomemben relativni dvig njegove ravni. Rezultati so lahko podani v ng/ml (µg/l) ali nmol/l. Faktor pretvorbe znaša 3,18. To pomeni, da moramo rezultat, ki je podan v nmol/L, deliti s 3,18, če ga želimo pretvoriti v ng/ml. Poleg tega absolutne vrednosti variirajo tudi med različnimi aparaturami, npr. rezultat, ki ga dobimo z aparaturo Idexx (Maine, ZDA), je v povprečju za 1,86-krat nižji v primerjavi z rezultatom, ki ga pridobimo z aparaturo miniVIDAS (BioMérieux SA, Francija). Osnova omenjenih analiz je encimski imunski test, vendar vsak proizvajalec aparatur uporablja svojo umeritveno krivuljo. Zato je zelo pomembno, da imamo za vsako metodo opravljeno validacijo in podane referenčne vrednosti, ki so značilne za ovulacijo in fertilizacijsko obdobje.

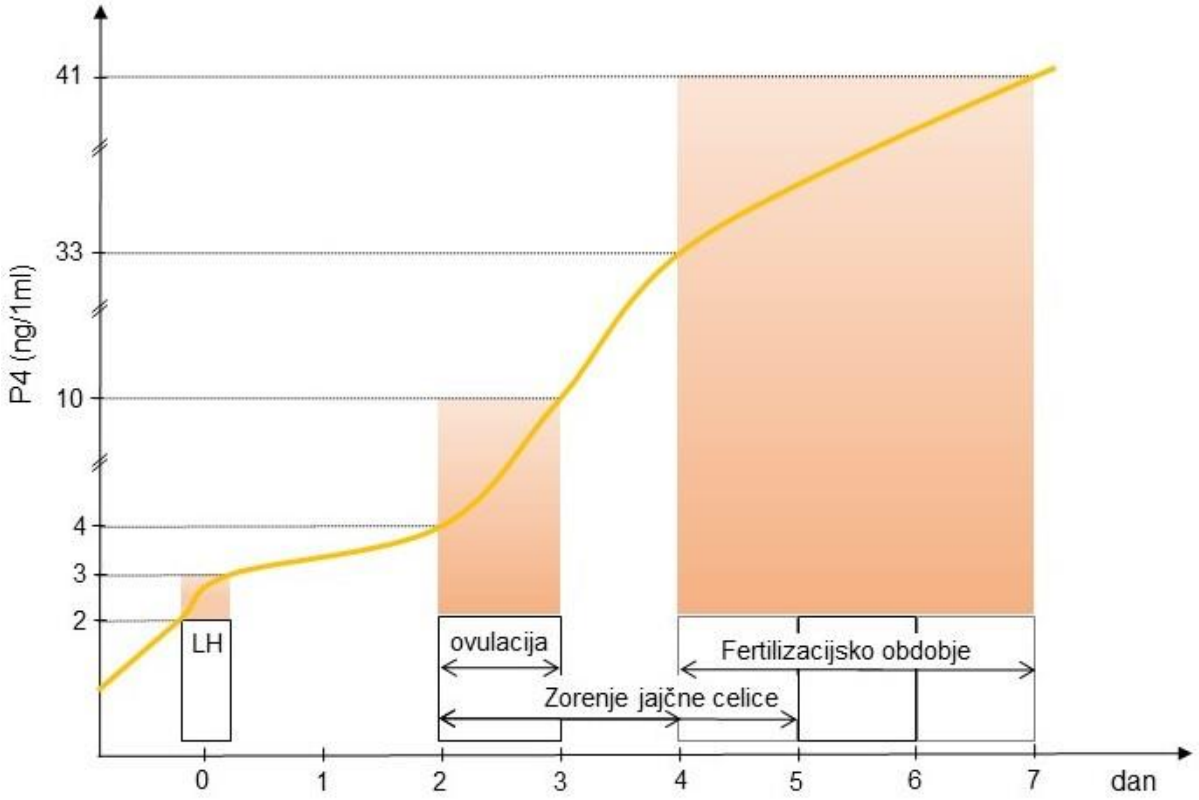
V tabeli 1 so prikazane vrednosti progesterona v posameznih fazah ciklusa za aparaturo miniVIDAS.

Bazalne vrednosti:	do 1,5 ng/ml
LH vrh:	1,9–4,1 ng/ml
Ovulacija:	8,2–10,4 ng/ml
Pripust:	15,3–20,8 ng/ml
Osemenitev z zamrznjenim semenom:	33,1–40,6 ng/ml

Tabela 1: Interpretacija rezultatov, pridobljenih z aparaturo miniVIDAS (povzeto po Blendivet Hundesamenbank, Nemčija, in International Canine Semen Bank, Kolorado, ZDA)

Pred LH vrhom se vrednosti progesterona v krvnem serumu gibljejo pod 1 ng/ml. V času LH vrha in luteinizacije foliklov vrednosti progesterona v krvi narastejo na 2–4 ng/ml. Približno dva dni po LH vrhu folikli ovulirajo in takrat se vrednosti P4 v krvi gibljejo med 4 in 10 ng/ml. Zelo značilno je, da po ovulaciji vrednosti P4 v krvi sorazmerno hitro naraščajo in se v 24 urah dvignejo za 3 do 10 ng/ml.

Pomembna prednost hormonske diagnostike fertilizacijskega obdobja pred ostalimi tehnikami je, da omogoča natančno določitev fertilizacijskega obdobja že več dni pred njegovim nastopom. Namreč jajčna celica ob ovulaciji še ni sposobna oploditve, oploditveno sposobnost doseže šele približno 48 ur po ovulaciji. Pri psici torej lahko le z določanjem ravni progesterona v krvi določimo čas ovulacije že približno 48 ur pred njenim nastopom (LH vrh) in fertilizacijsko obdobje kar 96 ur pred njegovim nastopom (čas od LH vrha do trenutka, ko jajčna celica pridobi sposobnost oploditve). Po pridobitvi oploditvene sposobnosti pa so jajčne celice sposobne oploditve še nadaljnjih 48 do 72 ur.



Slika 41: Prikaz odvisnosti LH vrha, ovulacije in fertilizacijskega obdobja od ravni progesterona. Vrednosti so podane za aparaturo miniVIDAS.

2.3 MOŽNOSTI SINHRONIZACIJE POJATVENEGA CIKLUSA PRI PSICAH

Poleg določanja fertilnega in fertilizacijskega obdobja želimo prehod v pojatveni ciklus pogosto bodisi zavreti bodisi pospešiti. Pojatveni ciklus želimo sprožiti pri primarni anestriji, ko imamo omejen čas paritve, ko želimo časovno načrtovati samo kotitev ali ko moramo paritev prilagoditi npr. načrtovani razstavi. Pri sprožitvi gonitve moramo biti pozorni, da je ne sprožimo prej kot 4 mesece po zadnji gonitvi. Pri prezgodnji sprožitvi gonitve rodila še niso pripravljena na ugnezdenje zarodkov, zato je plodnost močno zmanjšana. Anestrija je lahko tudi posledica predhodne odstranitve jajčnikov, njihove aplazije ali imunsko sproženega vnetja jajčnikov. Relativno redko se lahko pojavi tudi zaradi kromosomskih nepravilnosti, kot so X0, XXX, XXY. Pogosto pa je anestrija posledica sistemskega obolenja in hipotireoidizma. Pri hipotireoidizmu se lahko pojavi anestrus, podaljša se interval med pojatvami, lahko se podaljša proestrus in skrajša estrus, poveča se število abortusov, mumifikacij, nevitalnih in prelahkih

plodov. Nenazadnje pa lahko anestrijo sprožimo tudi z določenimi zdravili z androgenim ali progestagenim delovanjem ter uporabo agonistov GnRH (46).

Za sprožitev pojatve so se v preteklosti uporabljala različna zdravila z različno stopnjo uspešnosti. Med najpogosteje uporabljene in klinično preizkušene učinkovine prištevamo eCG (Equine Chorionic Gonadotropin), agoniste dopamina oz. antagoniste prolaktina ter analoge GnRH (Gonadotropin Realising Hormone). V novejšem času pa se uporablja predvsem deslorelin kot depo analog GnRH-ja.

V preteklosti se je za sprožitev gonitve pogosto uporabljalo eCG. Zdravilo se aplicira bodisi v nizki količini več zaporednih dni ali pa v nekoliko višji dozi v enkratnem odmerku. Ugotovljeno je bilo, da lahko z aplikacijo 50IE/kg TM eCG sprožimo pojatev. Po 7 dneh se priporoča še aplikacija 500IE hCG (Human Chorionic Gonadotropin), s katerim sprožimo ovulacijo. Če je omenjeni postopek izveden vsaj 4 mesece po gonitvi, lahko po umetni osemenitvi s svežim semenom ali pripustu dosežemo tudi 80 % brejost brez zaznavnih negativnih stranskih učinkov (47).

Pri psicah je bilo ugotovljeno, da prolaktin, ki se v večjih količinah izloča predvsem v začetku anestrusa, zavira prehod v naslednjo pojatev. Po padcu koncentracije prolaktina ob koncu anestrusa pa se ustvarijo pogoji, ki omogočajo sprožitev spolne aktivnosti. Padec prolaktina lahko povzročimo tudi z aplikacijo agonistov dopamina, kot je npr. kabergolin (Galastop®, Ceva, Francija). Po aplikaciji 5 µg/kg TM kabergolina se je pri 10 od 12 psicah pričela pojatev v povprečju 24 dni po začetku aplikacije. Pri dveh psicah so aplikacijo pripravka prekinili po 30 dneh, saj niti v tem času nista kazali znakov pričetka pojatve. Psice, ki so pozitivno odreagirale na aplikacijo kabergolina, so parili in vse so tudi postale breje (48).

Nižja uspešnost je bila dosežena z aplikacijo buserelina kot analoga GnRH. Buserelin je psici potrebno aplicirati v podkožje 1,5 µg/kg TM trikrat dnevno 11 dni in nato 0,75 µg/kg TM nadaljnje tri dni. Po tej terapiji so le 3 od 10 psic prišle v pojatev. Dve psici so tudi uspešno parili (48).

Precej bolj uspešna kot pri kratko delujočih analogih GnRH pa se je izkazala uporaba dolgo delujočih depo analogov GnRH. Klinično se deslorelin uporablja predvsem za povzročitev spolne neaktivnosti pri psih in psicah. Zaradi specifičnega delovanja pa se lahko uporablja tudi za sprožitev fertilne pojatve pri psici v anestrusu. Če preparat apliciramo v metestrusu, bo povzročil nastop anestrije. Dolžina anestrije je odvisna od velikosti odmerka depo pripravka in znaša od 6 do 12 mesecev. Če pa deslorelin apliciramo v anestrusu, najprej povzroči aktivacijo spolne aktivnosti in nastop pojatve, nato pa spolno aktivnost zavre. To začetno aktivacijo spolne aktivnosti lahko izkoristimo za sprožitev fertilne pojatve. Po aplikaciji 4,7 mg deslorelin acetata (Suprelorin®, Virbac, Francija) psici v anestrusu povzročimo nastop pojatve in ovulacijo, ki se pojavi približno 14 dni po aplikaciji pripravka. Ker deslorelin po začetni aktivaciji hormonske aktivnosti le-to nato zavre, se priporoča, da se po ovulaciji implant z zdravilom odstrani, saj bi lahko povzročil insuficienco rumenih teles, kar bi vodilo v resorpcijo plodov ali abortus (49). Zato implant apliciramo v podkožje na mesto, kjer ga bomo po ovulaciji lahko našli in odstranili. Kot izredno primerno mesto se je izkazalo podkožje v bližini popka. Po tem postopku lahko pričakujemo 70 % brejost kot tudi rojstvo vitalnih plodov (50).

3 UKREPI OB NEZAŽELENEM ZASKOKU

Pri nezaželenem zaskoku in brejosti pri plemenskih psicah lastniki večinoma ne želijo rojstva nenačrtovanih potomcev. Kirurške odstranitve rodil ne moremo izvesti, saj lastniki pogosto želijo ohraniti nadaljnjo plodnost psice. V takšnih primerih lahko uporabljamo različne pripravke, s katerimi preprečimo bodisi nidacijo zarodkov ali pa povzročimo abortus. Ob sumu nezaželenega zaskoka moramo ugotoviti, ali je do zaskoka sploh prišlo. Pri tem je izredno pomemben natančen odvzem anamneze in pregled psice. Pridobiti moramo podatke o času, ko psica ni bila pod nadzorom in ali je lastnik opazil, da je do zaskoka dejansko prišlo. V preiskavo lahko vključimo vaginoskopijo, vaginalno citologijo in določimo raven progesterona v krvnem serumu. Z merjenjem ravni progesterona natančneje določimo, v kateri fazi ciklusa se nahaja psica oz. ali je v fazi, ko bi zaskok lahko vodil v neželeno brejost (fertilno obdobje).

Nato poskušamo ugotoviti, ali se v nožnici nahajajo semenčice. Za ta namen uporabimo tampon, ki ga namočimo v fiziološki raztopini ter ga za 1 minuto vstavimo v nožnico. Nato ga iz nožnice prestavimo v epruveto, napolnjeno s fiziološko raztopino, in pustimo stati približno 10 minut. Tampon odstranimo, tekočino v epruveti pa centrifugiramo 10 minut pri 800 g. Po centrifugiranju odstranimo supernatant in sediment preiščemo na prisotnost semenčic. Zanesljivost omenjene metode je skoraj stoodstotna znotraj 24 ur po zaskoku, nato pa zanesljivost pade na 75 % med 24 in 48 ur po zaskoku.

Po neželenem zaskoku ima lastnik psice več možnosti. Pri psici lahko opravimo ovariohisterektomijo in tako preprečimo možnost, da bi prišlo do brejosti in rojstva nezaželenih mladičev. Naslednja možnost je, da že v zelo zgodnjem obdobju poskušamo preprečiti nidacijo, lahko pa počakamo in po ultrazvočni potrditvi brejosti sprožimo abortus. Odločitev za preprečitev nidacije ali sprožitev abortusa je odvisna od dostopnosti ustreznih zdravil, njihove varnosti in tudi cene.

Nidacijo lahko preprečimo z estrogeni, prostaglandini in antagonisti progesterona. Izbira pripravka je odvisna predvsem od časa, ki je potekel od paritve. Medtem ko lahko estrogene uporabljamo zgolj za preprečitev nidacije, lahko prostaglandin F2 alfa in antagoniste progesterona uporabljamo tudi za sprožitev abortusa.

V preteklosti so se za preprečitev nidacije najpogosteje uporabljali estrogeni. Zaradi neželenih stranskih učinkov, med katerimi je tudi povzročitev piometre, se estrogeni uporabljajo zelo omejeno oz. se vsaj v Sloveniji praktično ne uporabljajo več. Estrogeni vplivajo na transport zigote v jajcevodu, spremenijo okolje v jajcevodih in maternici, preprečijo nidacijo, stimulirajo kontrakcije maternice in odpiranje cerviksa. Za ta namen se je uporabljal estradiol benzoat, in sicer v dozi 0,01 μg/kg TM 3., 5. in 7. dan po zaskoku. V tem primeru gre za relativno preprost in zanesljiv postopek preprečevanja neželene brejosti. Aplikacija estrogenov v tem izredno občutljivem obdobju pojatvenega ciklusa pa lahko sproži različne patološke spremembe, predvsem v maternici. Povzročitev patoloških sprememb v maternici, ki lahko vodijo v nastanek piometre, narašča z nastopom metestrusa, zaradi tega se estrogeni aplicirajo kmalu po zaskoku. Poleg tega lahko visoke doze estrogenov povzročijo depresijo kostnega mozga in posledično trombocitopenijo ter eritropenijo. Pojavi pa se lahko tudi podaljšano gonjenje in nastop ponovne gonitve.

Prostaglandin F2 alfa lahko uporabljamo za preprečitev nidacije in/ali sprožitev abortusa ter tudi kot podporno terapijo pri konservativnem zdravljenju piometre. Za razliko od številnih drugih vrst domačih živali pri psici z enkratno aplikacijo prostaglandinov ne moremo doseči luteolize. Za popolno luteolizo je potrebna večkratna aplikacija sorazmerno nizkih količin zdravila. Luteolizo lahko sprožimo šele 13 dni po LH vrhu, zato je preprečitev nidacije mogoča le ob natančni določitvi faze ciklusa. Uspešnost delovanja prostaglandinov lahko določimo z merjenjem ravni progesterona v krvnem serumu. Vrednosti progesterona pod 2 ng/ml so značilne za razgrajeno rumeno telo. Vrsta in količina apliciranih prostaglandinov se močno razlikuje. Pri visokih količinah moramo aplikacije ponoviti manjkrat v daljših časovnih intervalih, vendar pa so bolj izraženi negativni stranski učinki. Za preprečitev nidacije se uporablja sorazmerno visoke količine naravnih prostaglandinov. Te apliciramo v količini 250 µg/kg TM dvakrat dnevno v podkožje 4 zaporedne dni. Z aplikacijami lahko pričnemo šele po 5. dnevu citološko določenega diestrusa (51). Po 30. dnevu brejosti lahko za sprožitev abortusa uporabljamo relativno nizke količine naravnih prostaglandinov. Brejim psicam apliciramo 20–30 µg/kg TM dva- do trikrat dnevno *i.m.* do pričetka abortusov, ki jih lahko pričakujemo med 4. in 11. dnem po začetku aplikacije (52). Poleg naravnih prostaglandinov lahko uporabljamo tudi sintetične analoge prostaglandina F2 alfa, npr. Cloprostenol (Estrumate). Cloprostenol lahko apliciramo v dozi 2,5 µg/kg TM vsakih 48 ur največ trikrat. Pri tem so zelo izraženi stranski učinki, zato je priporočljiva premedikacija. Prostaglandini sicer nimajo negativnega vpliva na nadaljnjo plodnost psice, lahko pa se po terapiji skrajša interval med gonitvami na 1 do 4 mesece. Po aplikaciji prostaglandinov se pogosto pojavijo bolj ali manj izraženi prehodni stranski učinki, kot so povečano slinjenje, bruhanje, sopenje in diareja. Poleg tega se lahko pojavi prehodna hipotermija, ki traja 2 do 3 ure. Stranske učinke lahko zmanjšamo z ustrezno premedikacijo, ki jo opravimo 15 minut pred načrtovano aplikacijo prostaglandinov. Za premedikacijo se najpogosteje uporablja atropin sulfat (0,025 mg/kg TM), nadalje spazmolitik, npr. trospijev klorid (0,004 mg/kg TM) ter antiemetik metoklopramid (0,1 do 0,2 mg/kg TM).

Za sprožitev abortusa lahko uporabljamo tudi antagoniste prolaktina (agonisti dopamina). Prolaktin ima v drugi polovici brejosti zelo pomembno luteotropno aktivnost. Za ta namen se lahko uporabljata kabergolin in bromcryptin. Zaradi manj izraženih stranskih učinkov se priporoča uporaba kabergolina. Tega lahko apliciramo peroralno v dozi 5 µg/kg TM 5 do 10 zaporednih dni. Pozitivne strani uporabe omenjenega preparata so, da je sprožitev abortusa zelo zanesljiva, da povzroča manj stranskih učinkov kot prostaglandini in da nima negativnega vpliva na nadaljnjo plodnost. Slabosti pa so, da je sprožitev abortusa mogoča šele 42 dni po LH vrhu ter da se lahko pojavi bruhanje. Pri uporabi kabergolina je potrebna ultrazvočna kontrola, apliciramo pa ga še dva dni potem, ko pri zarodkih ne ugotovimo srčnega utripa. Če kabergolin kombiniramo z nizkimi dozami prostaglandinov, npr. 1 µg/kg TM Cloprostenola (Veyx, Kanada), lahko sam postopek pričnemo že 25 dni po LH vrhu. V tem primeru so manj izraženi stranski učinki prostaglandinov, ne vpliva na nadaljnjo plodnost, potrebna pa je večkratna aplikacija in ultrazvočna kontrola učinkovitosti (srčni utrip zarodkov) (53).

Relativno zgodaj lahko odmrtje zarodkov povzročimo tudi z aplikacijo nehormonske učinkovine lotrifen (Privaprol®, Fatro, Španija). Pripravek apliciramo intramuskularno do 15. dne po neželeni paritvi. Značilno je, da se doseže najvišje ravni učinkovine v krvni plazmi šele po 3–6 dneh in da je biološka razpolovna doba približno en mesec. Način delovanja pripravka

še ni povsem pojasnjen, domneva pa se, da v zarodku moti presnovo kisika. Njegovo delovanje je omejeno na zgodnje poimplantacijsko obdobje. Povzroča degeneracijo in resorpcijo zarodka in redkeje abortus. Stranski učinki so blagi in večinoma omejeni na gastrointestinalni trakt. Pojavi se lahko zmanjšana ješčnost, anoreksija, zmanjšanje telesne teže, bruhanje, zaprtje in intestinalne krvavitve (54).

V zadnjem času se za preprečitev nezaželene brejosti najpogosteje uporablja kompetitivni antagonist progesterona aglepriston (Alizine®, Virbac, Francija). Učinkovina deluje neposredno na maternico in povzroči blokado progesteronskih receptorjev, luteolizo funkcionalnega rumenega telesa ter padec progesterona pod 2 ng/ml. S preparatom lahko preprečimo nidacijo ali pa sprožimo abortus. Preparat apliciramo subkutano v količini 10 mg/kg TM dvakrat v razmaku 24 ur. Po 7 dneh opravimo ultrazvočni pregled, terapijo pa ponovimo, če še ugotovimo vitalne plodove. Pozorni moramo biti tudi na morebitni delni zaostanek plodov ali plodovih ovojnic, ki zahtevajo dodatno terapijo (55). Terapija velja za eno najvarnejših in ne vpliva na nadaljnjo plodnost. Povzroči lahko predvsem manjše reakcije na mestu aplikacije (56).

4 UMETNO OSEMENJEVANJE PRI PSICAH

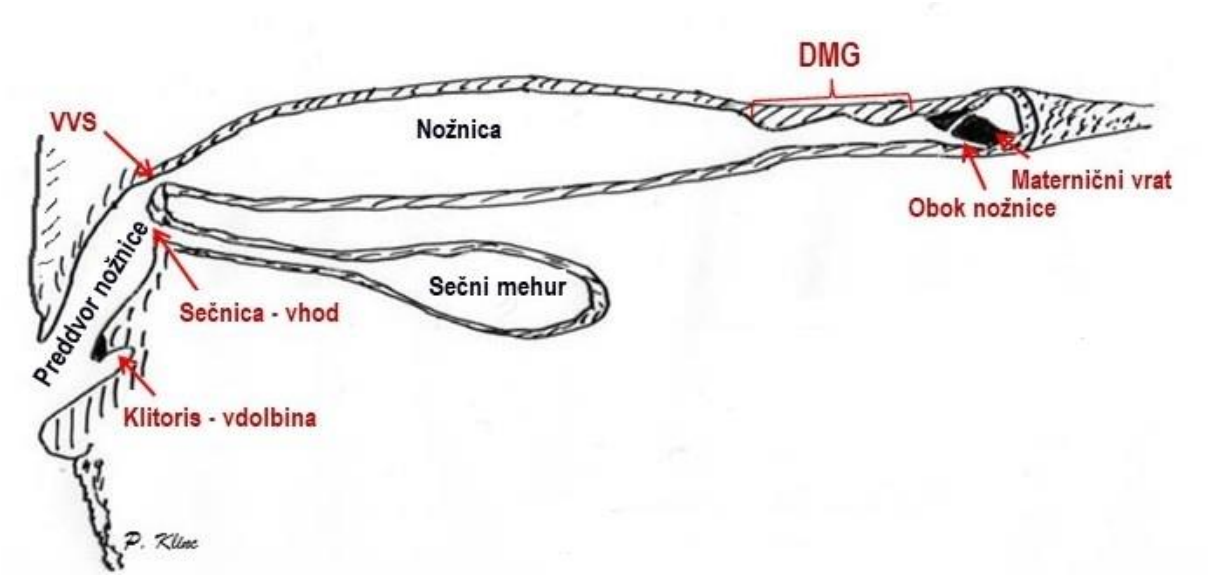
Umetno osemenjevanje predstavljajo različni postopki, s katerimi seme apliciramo v rodila samice. Poleg samega načina aplikacije je izredno pomembno, da čim bolj natančno določimo kvaliteto in število semenčic, ki jih lahko uporabimo, optimalni čas aplikacije in se odločimo, kako oz. kam bomo seme aplicirali. Mesto aplikacije semena je odvisno od kvalitete in števila semenčic. Če bomo uporabili celotni ejakulat svežega semena, je večinoma povsem ustrezno, da seme apliciramo v nožnico oz. v bližino materničnega vratu. Če imamo za osemenitev na razpolago manjše število, lahko tudi semenčic slabše kvalitete, kot je npr. ohlajeno ali zamrznjeno seme, pa se priporoča, da seme apliciramo globlje v rodila oz. v samo maternico. Pri semenu slabše kvalitete (npr. zamrznjeno seme) je poleg mesta aplikacije zelo pomembna tudi določitev pravilnega časa aplikacije. Takšno seme moramo aplicirati v fertilizacijski fazi, ki nastopi dva do tri dni po ovulaciji in traja približno dva dni. Uporaba specifičnih postopkov umetne osemenitve se razlikuje glede na opremo, ki jo imamo na voljo, ter usposobljenost operaterja.

4.2 INTRAVAGINALNO OSEMENJEVANJE

Kljub temu da je intravaginalno osemenjevanje relativno enostavno, je tudi pri tem načinu izredno pomembno dobro poznavanje fiziologije ciklusa in anatomske zgradbe rodil. Z nezadostnim znanjem lahko seme apliciramo na napačno mesto, povzročimo poškodbo ali infekcijo rodil.

Kavdalni del nožnice se prične s preddvorom. Na ventralni strani se takoj za vstopom v preddvor oblikuje vdolbina, v kateri leži ščegetavček ali klitoris. Preddvor nožnice se nadaljuje v dorzalni smeri tik pod kožo in se zaključi s t. i. vestibulo-vaginalnim stikom. Tik pred stikom se izteka izvodilo sečnice, ob njeni strani pa se oblikujeta dve gubi. Izvodilo sečnice in gubi sta pomembni, saj lahko ob nepravilnem položaju osemenjevalni kateter vstavimo v sečnico ali pa se napredovanje zaustavi zaradi vstavitve v eno izmed gub. V kranialni smeri se genitalni trakt nadaljuje v razširjeni del nožnice, nato pa se pred materničnim vratom oblikuje t. i. zgornja

medialna guba, kjer se lumen nožnice močno zmanjša. Posebej pri manjših psicah je lahko zožitev tako velika, da moti pasažo osemenjevalnega katetra in psicam povzroča nelagodje. Z ustrezno manipulacijo pa lahko kateter uvedemo tudi preko tega dela nožnice. Nožnica se v bližini materničnega vratu ponovno nekoliko razširi. Najbolj kranialni del nožnice, ki leži kranioventralno od materničnega vratu, se imenuje obok ali forniks. Maternični vrat oblikuje izrazito vaginalno izboklino. Kanal materničnega vratu poteka v kraniodorzalni smeri in se zaključi v sorazmerno kratkem telesu maternice. Dolžina preddvora nožnice in nožnice je v največji meri odvisna od velikosti psice. Dolžina preddvora nožnice znaša od 2 do 6 centimetrov, nožnice pa od 10 do 30 centimetrov (57) .



Slika 42: Shematski prikaz kavdalnega dela rodil pri psici; VVS – vestibulo-vaginalni stik, DMG – dorzalna medialna (sredinska) guba

Za umetno osemenjevanje lahko uporabimo enostavni ali posebni kateter. Enostavni je sestavljen iz cevke debeline približno 0,5 cm, ki je na konici zaobljena, kar zmanjšuje možnost poškodbe ali celo perforacijo stene nožnice. Enostavni katetri so različnih dolžin. Dolžino uporabljenega katetra prilagodimo velikosti psice oz. pričakovani dolžini nožnice. Za manjše psice uporabljamo kateter dolžine 22 cm, pri večjih pa 44 cm. Pri posebnem katetru se ob konici nahaja zračni balon. Ta ima podobno vlogo kot bulbusa glandisa, ki preprečujeta izgubo semena med ejakulacijo. Po vstavitvi katetra balon najprej napolnimo z zrakom, nato pa apliciramo seme. Kateter, ki z napolnjenim balonom preprečuje izgubo semena, pustimo v nožnici še 10–15 minut po aplikaciji semena.

Pred izvedbo osemenitve okolico sramničnih ustnic najprej dobro očistimo. Za čiščenje uporabljamo vlažen papir ali tampon. Pri tem se izogibamo uporabe razkužil, ki lahko poškodujejo semenčice in s tem zmanjšajo možnost uspešne oploditve. Prav tako pazimo, da pred vstavitvijo katetra okolico sramničnih ustnic osušimo, saj s tem preprečimo spermicidno delovanje vode. Ob vstavitvi katetra sramnični ustnici razpremo, kateter pa potisnemo skozi preddvor nožnice povsem dorzalno v smeri proti rektumu. Ko kateter potisnemo do višine rektuma, ga pričnemo potiskati v kranialni smeri. Potiskamo ga, odvisno od velikosti psice, 10–

30 centimetrov globoko oz. do globine, ko začutimo večji odpor. Pri vstavljanju smo pozorni na odpor, ki lahko nastane tudi pred popolno vstavitvijo katetra. V tem primeru kateter rahlo izvlečemo in ga ponovno poskušamo vstaviti do globine materničnega vratu.



Slika 43: Postopek vstavitve katetra pri klasični intravaginalni osemenitvi

Po popolni vstavitvi katetra privzdignemo zadnji del psice, nato pa seme počasi apliciramo. Po aplikaciji semena, pri uporabi klasičnega katetra, držimo zadnji del psice dvignjen še približno 15 do 20 minut, s čimer preprečimo nenadzorovano izgubo semena.

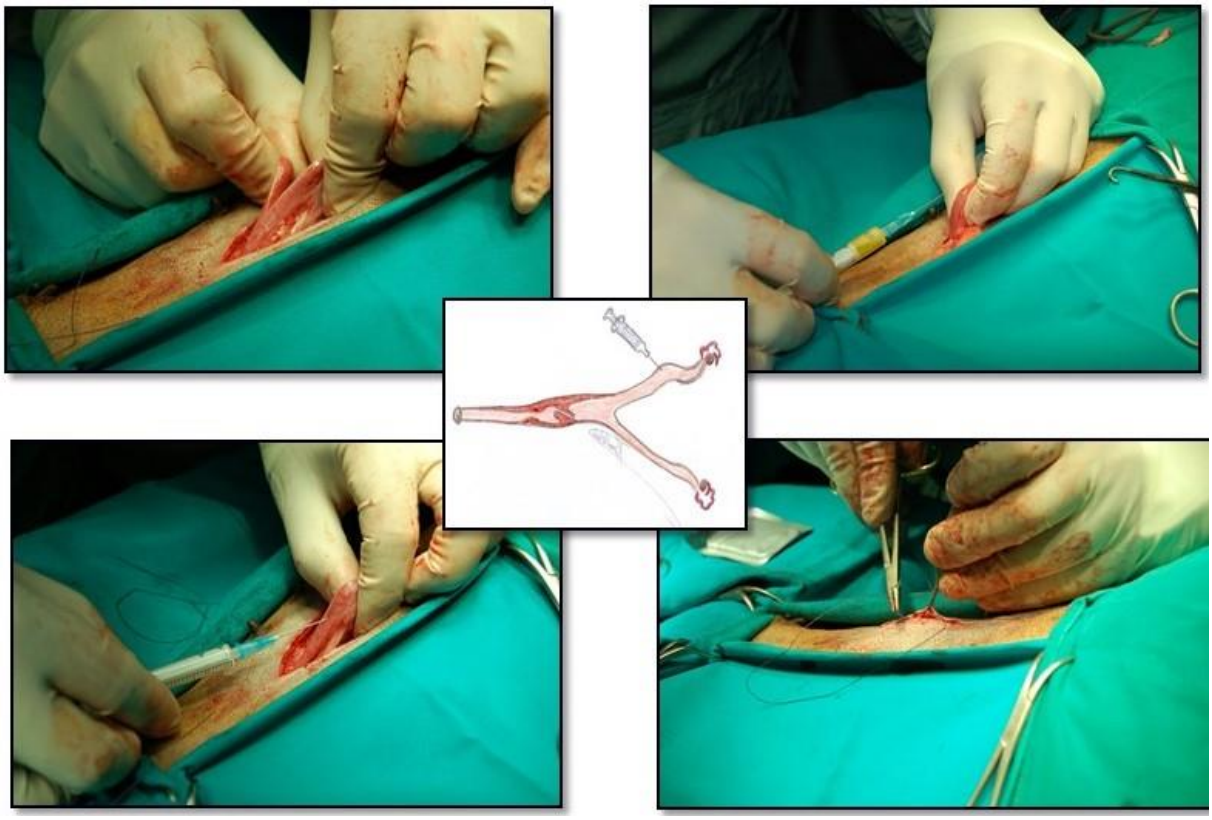
4.3 INTRAUTERINO OSEMENJEVANJE

Na podlagi rezultatov številnih raziskav se je podobno kot pri ostalih vrstah domačih živali tudi pri psicah izkazalo, da ima globina aplikacije semena nižje kvalitete (predvsem zamrznjeno, tudi tekoče konzervirano seme) velik vpliv na uspešnost oploditve oz. stopnjo koncepcije (58). Pri intrauterinem osemenjevanju seme apliciramo neposredno v telo ali rogova maternice. Dostop do mesta aplikacije semena je lahko neinvaziven, po naravni poti, kjer cevko za osemenjevanje potisnemo skozi kanal materničnega vratu. Pri invazivnem dostopu pa seme apliciramo neposredno preko stene maternice s tanjšo iglo ali pa skozi rezno rano, ki jo naredimo v steni maternice. V preteklosti se je večino intrauterinih osemenitev psic opravilo z invazivnim kirurškim posegom. Z razvojem sodobne endoskopije, ki omogoča odlično vizualizacijo materničnega vratu, pa se lahko velika večina intrauterinih osemenitev opravi z neinvazivno tehniko transcervikalne intrauterine vstavitve tankega osemenjevalnega katetra.

4.3.1 Invazivno intauterino osemenjevanje

Invazivno intrauterino osemenjevanje lahko opravimo s klasičnim kirurškim postopkom ali laparoskopsko (59). Pri klasičnem kirurškem postopku opravimo celiotomijo in v rezno rano izvlečemo maternični rog. Vanj nato z iglo velikosti 18G apliciramo seme. To lahko apliciramo tudi preko tanke cevke ali kanile, ki jo skozi rezno rano v steni maternice vstavimo v njen lumen. Med aplikacijo stisnemo maternični rog kavdalno od mesta aplikacije in s tem preprečimo izgubo semena skozi maternični vrat. Nato pa z masažo v smeri jajcevodov seme še dodatno potisnemo proti konici materničnih rogov. Če smo seme aplicirali s kanilo, moramo ustrezno zapreti tudi rano v steni maternice. Maternični rog nato vrnemo v trebušno votlino in zapremo odprtino v trebušni steni s klasičnim postopkom šivanja v treh etažah. Poleg same tehnike osemenitve, ki mora biti izvedena brezhibno, na uspešnost oploditve vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot je npr. število progresivno gibljivih semenčic v osemenjevalni dozi. Pri 238 osemenitvah so po kirurškem postopku dosegli v povprečju 73,1 % brejost. Najboljši

rezultati so bili doseženi, ko so aplicirali >200 × 10^6 progresivno gibljivih semenčic, nekoliko slabši pa pri aplikaciji 100–200 × 10^6 progresivno gibljivih semenčic in najslabši pri uporabi 75–125 × 10^6 progresivno gibljivih semenčic (60).



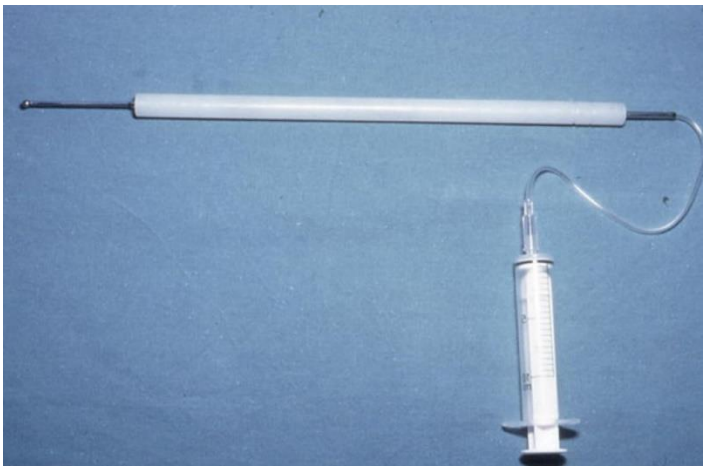
Slika 44: Prikaz invazivnega intrauterinega osemenjevanja z uporabo injekcijske igle

4.3.2 Neinvazinvno intrauterino osemenjevanje

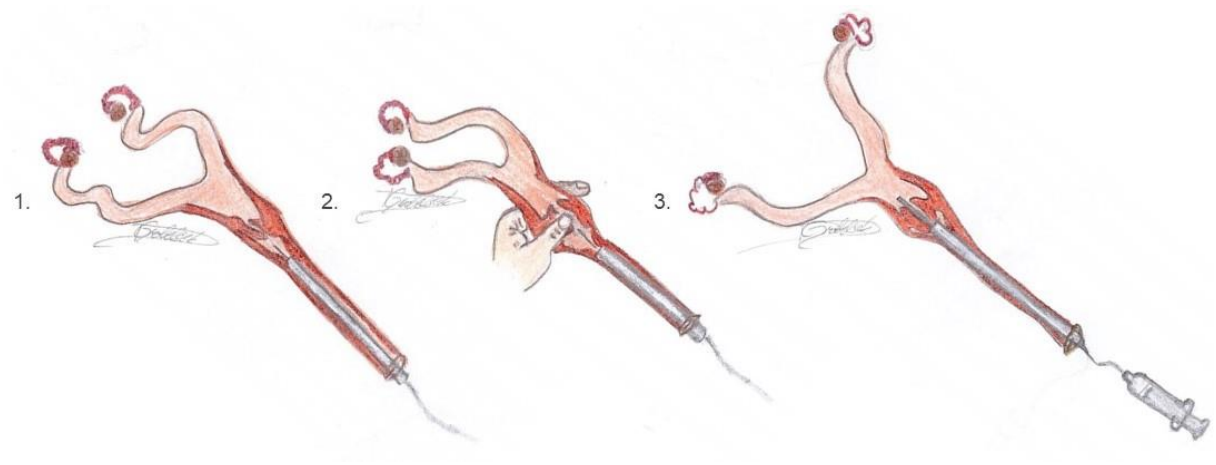
Neinvazivno intratauterino osemenjevanje predstavljajo različne tehnike, ki omogočajo, da po prehodu katetra skozi nožnico in kanal materničnega vratu seme apliciramo neposredno v telo ali celo rog maternice. Vstavitev katetra v maternico lahko dosežemo s palpacijo (skandinavski kateter), vizualizacijo (endoskop) ali kombinacijo palpacije in vizualizacije (endoskop). Izredno pomembno je, da vse te tehnike večinoma ne zahtevajo splošne anestezije ali sedacije živali in jih opravljamo na stoječi psici. Vstavitev katetra v maternico lahko moti poln mehur ali črevo. Zato se priporoča, da se pred posegom pri psici izprazni črevo in mehur. Izpraznitev omenjenih organov poskušamo doseči po naravni poti (hoja ali tek lahko pospeši izločanje iztrebkov). Klistiranje, ki se lahko uporablja za odstranitev blata iz debelega črevesja, se v tem primeru ne priporoča, saj se med postopkom onesnaži tudi okolica nožnice, s čimer se poveča možnost okužbe maternice. Če pa je zaradi strahu ali agresivnosti psice potrebna sedacija, potem se priporoča uporaba agonistov alfa dva adrenergičnih receptorjev, kot sta ksilazin in medetomidin. Omenjena pripravka poleg sedacije povzročita tudi relaksacijo trebušne mišičnine in s tem lažjo manipulacijo rodil ob vstavitvi katetra.

4.3.2.1 Norveška oz. skandinavska tehnika

Pri norveški ali skandinavski tehniki se uporablja poseben kateter, ki ima tršo zunanjo najlonsko cevko in notranji rigidni kateter iz nerjavečega jekla. Obstajajo cevke različnih dimenzij, ki so primerne za različne velikosti psic. Notranji rigidni kateter je debel približno 1 mm z odebeljeno konico, ki zmanjša možnost perforacije stene rodil. Kateter najprej vstavimo v nožnico in ga potisnemo do materničnega vratu. Nato preko trebušne stene poiščemo maternični vrat in ga potisnemo v horizontalni položaj vzporedno z osemenjevalnim katetrom. Zunanja cevka se potisne do vhoda v maternični vrat. Preko zunanje cevke nato v maternico potisnemo rigidni kateter iz nerjavečega jekla. Tehnika ne zahteva uporabe dragih pripomočkov, vendar je za njeno izvedbo potrebno relativno dolgotrajno učenje. Z njeno uporabo lahko dosežemo tudi preko 80 % uspešnost (61). Tehniko lahko uporabljamo pri večini pasem psic. Vstavitev katetra je težavna oz. nemogoča pri psicah s prekomerno telesno težo.



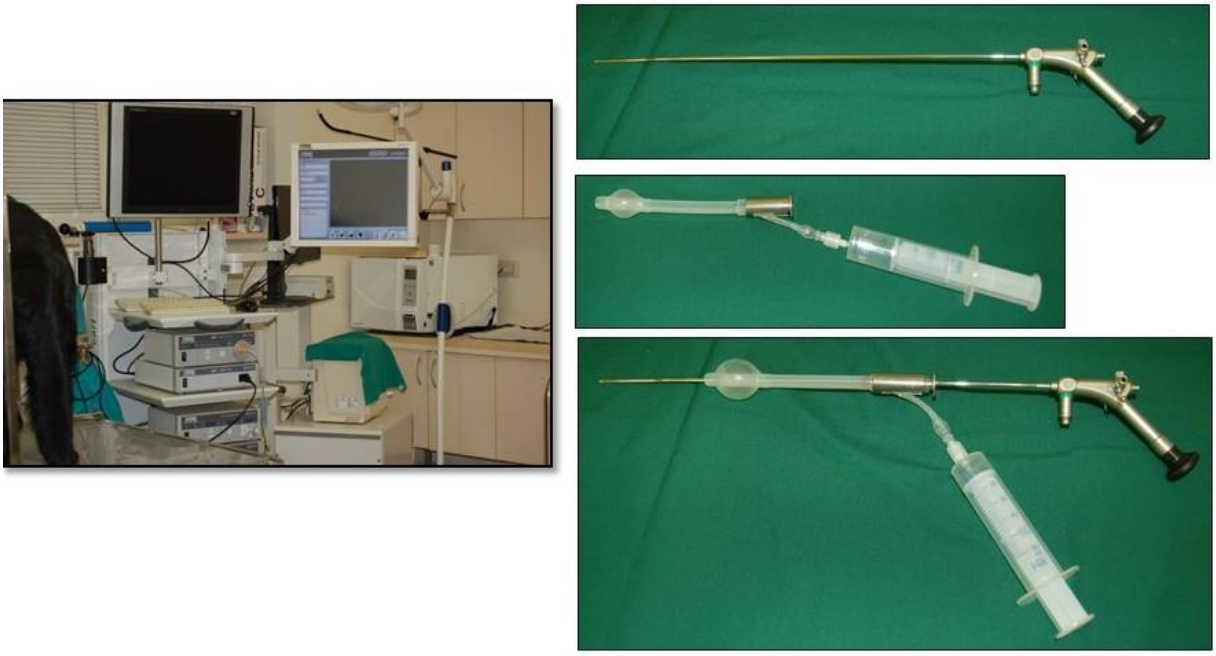
Slika 45: Norveški kateter za umetno osemenjevanje psic (62)



Slika 46: Prikaz vstavitve norveškega katetra: 1. kateter približamo materničnemu vatu, 2. notranji kateter potisnemo skozi maternični vrat, 3. seme potisnemo v maternico.

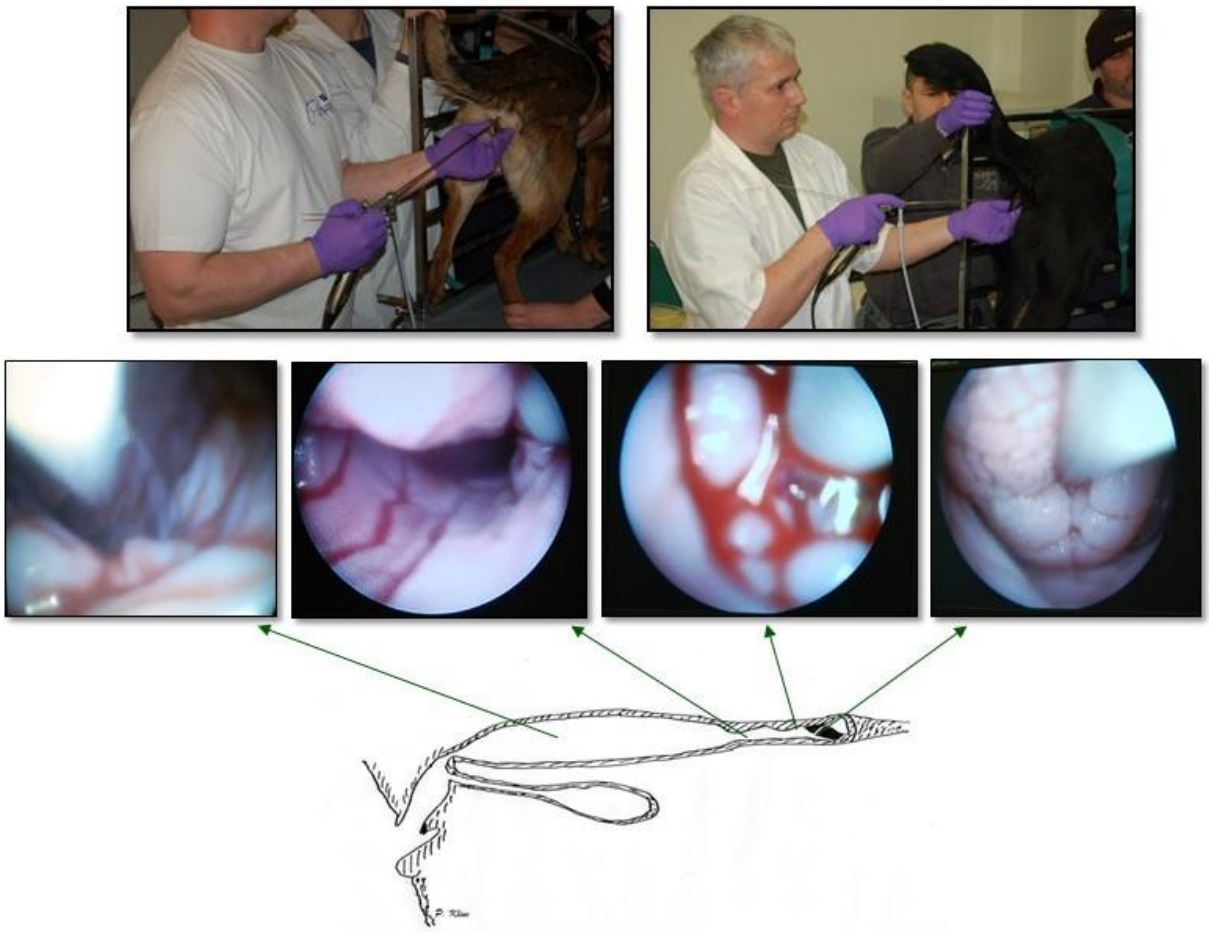
4.3.2.2 Endoskopska tehnika

Za kateterizacijo materničnega vratu uporabljamo poseben rigidni endoskop (uteroskop), ki je dovolj tanek in dolg, da omogoča izvedbo posega tako pri majhnih kot velikih pasmah psic. Uteroskop je debeline CH 9.5 in dolg 43 cm. V njegovi notranjosti se nahaja delovni kanal, ki omogoča vstavitev katetra velikosti CH 5. Kateter je dolg 70 cm, kar dovoljuje, da ga lahko vstavimo dovolj globoko v maternico.



Slika 47: Endoskop z intravaginalnim vodilom za intrauterino osemenjevanje psic

Uteroskop vstavimo v nožnico in ga potisnemo vse do materničnega vratu oz. forniksa nožnice. Maternični vrat poteka v kraniodorzalni smeri in ga spoznamo po specifični obliki, njegova površina je nagubana podobno kot površina maline. Skozi delovni kanal potisnemo kateter. Z njim poiščemo vhod v maternični vrat in ga nato potiskamo v notranjost maternice. Pri potiskanju katetra skozi kanal materničnega vratu in maternice si pomagamo s krožnimi gibi. Zlasti pri zahtevnejših primerih, ko je maternični vrat bolj mobilen in kanal potuje skoraj povsem v dorzalni smeri, si lahko pomagamo tako, da konico katetra uvijemo rahlo v dorzalni smeri. V tem primeru nato kateter lažje potiskamo skozi kanal materničnega vratu. V določenih primerih si lahko pomagamo tudi s sterilnim zrakom. Filtrirani zrak dovajamo skozi delovni kanal do področja, kjer se nahaja maternični vrat. Z zrakom dosežemo, da se notranji del nožnice in forniks razširita, maternični vrat oz. njegov nožnični del pa se kot kupola izboči iz stene nožnice. S tem je večinoma močno olajšana vstavitev katetra za osemenjevanje. Pomagamo si lahko tudi s transkutano fiksacijo materničnega vratu. V tem primeru maternični vrat primemo in ga potisnemo tako, da njegov kanal poteka v horizontalni smeri. Na ta način vstavimo kateter podobno kot pri uporabi skandinavskega katetra, dodatno pa si pomagamo z endoskopom, s katerim lahko vizualno lociramo vhod v maternični vrat.



Slika 48: Endoskopski prikaz različnih delov rodil pri psici in vstavitev osemenjevalnega katetra skozi maternični vrat

Pred izvedbo globokega intrauterinega osemenjevanja moramo upoštevati več dejavnikov, ki imajo velik vpliv na uspešnost osemenitve. Glede na to, da seme apliciramo globoko v maternico, mora biti prosto patogenih mikroorganizmov, imeti mora majhen volumen in vsebovati določeno minimalno število gibljivih in morfološko normalnih semenčic (57). Za tovrstne osemenitve se najpogosteje uporablja zamrznjeno seme. V določenih primerih se postopek uporablja tudi za tekoče konzervirano ali celo nativno seme. Pri tekoče konzerviranem ali nativnem ejakulatu predstavlja največji problem sorazmerno velik volumen, ki pa ga lahko zmanjšamo s centrifugiranjem in odstranitvijo supernatanta. Majhen volumen maternice in njene kontrakcije ne dovoljujejo aplikacije večje količine semena. Odvisno od velikosti in starosti psice se priporoča, da apliciramo od 1 do 3 mililitre semena. Pri večjih količinah bolj razredčenega semena se to ob aplikaciji izgublja v nožnico, s tem pa se zmanjša pozitivni vpliv, ki ga ima globoka intrauterina aplikacija. Če imamo večji volumen semena, se priporoča, da se seme centrifugira in odstrani določen del supernatanta oz. toliko, da končni volumen ne presega treh mililitrov.

Naslednji pomemben dejavnik, ki vpliva na uspešnost globoke intrauterine osemenitve, je število oploditveno sposobnih semenčic v osemenjevalni dozi. Za dosego optimalnih rezultatov se priporoča, da je v osemenjevalni dozi minimalno 150 x 10^6 gibljivih semenčic. Mason (2017) je v retrospektivni študiji ugotovil povprečno brejost 68 % (238 brejosti od 352 osemenitev) po

uporabi zamrznjenega semena. Pri podrobni analizi rezultatov je ugotovil, da ima število progresivno gibljivih semenčic v osemenjevalni dozi velik vpliv na uspešnost oploditve. Če je bilo v osemenjevalni dozi pod 100 x 10^6 progresivno gibljivih semenčic (PGS), so dosegli zgolj 52 % brejost, pri 100 do 150 x 10^6 PGS 68 % brejost in pri dozi nad 150 x 10^6 PGS 75 % brejost (63). Pri psicah pasme labrador so po endoskopski globoki intrauterini osemenitvi s svežim semenom dosegli celo 90 % brejost in 5 ± 2,6 mladičev na psico (64).

LITERATURA:

1. Wei YF, Chen FL, Tang SS, in sod. Birth of puppies of predetermined sex after artificial insemination with a low number of sex-sorted, frozen-thawed spermatozoa in field conditions. Anim Sci J 2017; 88: 1232–8.
2. Gouletsou PG, Galatos AD, Leontides LS, in sod. Impact of fine- or large-needle aspiration on canine testes: clinical, in vivo ultrasonographic and seminological assessment. Reprod Domest Anim 2011; 46: 712–9.
3. Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, in sod. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. J Small Anim Pract 2012; 53: 419–22.
4. Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC. Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). Theriogenology 2006; 66: 1573–8.
5. Johnson C, Olivier NB, Nachreiner R, in sod. Effect of 131I-induced hypothyroidism on indices of reproductive function in adult male dogs. J Vet Intern Med 1999; 13: 104–10.
6. de Souza MB, England GC, Mota Filho AC, in sod. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. Theriogenology 2015; 84: 805–10.
7. Bigliardi E, Denti L, De Cesaris V, in sod. Colour Doppler ultrasound imaging of blood flows variations in neoplastic and non-neoplastic testicular lesions in dogs. Reprod Domest Anim 2018.
8. England G, Bright L, Pritchard B, in sod. Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. Reprod Domest Anim 2017; 52 Suppl 2: 202–7.
9. Eilts BE, Williams DB, Moser EB. Ultrasonic measurement of canine testes. Theriogenology 1993; 40: 819–28.
10. Gouletsou PG, Galatos AD, Leontides LS. Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. Anim Reprod Sci 2008; 108: 1–12.
11. Woodall PF, Johnstone IP. Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. J. small Anim. Pract. 1988; 29: 543–.
12. Root Kustritz MV. Disorders of the canine penis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2001; 31: 247–58.
13. Wasik SM, Wallace AM. Combined preputial advancement and phallopexy as a revision technique for treating paraphimosis in a dog. Aust Vet J 2014; 92: 433–6.
14. Olsen D, Salwei R. Surgical correction of a congenital preputial and penile deformity in a dog. J Am Anim Hosp Assoc 2001; 37: 187–92.

15. Lavely JA. Priapism in dogs. Top Companion Anim Med 2009; 24: 49–54.
16. Burrow RD, Gregory SP, Giejda AA, in sod. Penile amputation and scrotal urethrostomy in 18 dogs. Vet Rec 2011; 169: 657.
17. Yamashiro H, Narita K, Sugimura S, in sod. Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV). Anim Reprod Sci 2007; 102: 165–71.
18. Kutzler MA. Semen collection in the dog. Theriogenology 2005; 64: 747–54.
19. Foote RH. The Influence of Frequency of Semen Collection, Fractionation of the Ejaculate, and Dilution Rate on the Survival of Stored Dog Sperm. Cornell Vet 1964; 54: 89–97.
20. Christensen BW, Asa CS, Wang C, in sod. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (Canis lupus) and domestic dogs (C. l. familiaris). Theriogenology 2011; 76: 975–80.
21. Johnston SD, Ward D, Lemon J, in sod. Studies of male reproduction in captive African wild dogs (Lycaon pictus). Anim Reprod Sci 2007; 100: 338–55.
22. Santos IP, Ramos CL, Ramos JL, in sod. Efficient association between PGF2alpha and methyl 4-hydroxybenzoate sex pheromone prior to electroejaculation in dogs. Reprod Domest Anim 2013; 48: 160–4.
23. Klinc P, Majdic G, Sterbenc N, in sod. Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hyperplasia. Reprod Domest Anim 2005; 40: 559–61.
24. Hori T, Masuda T, Kobayashi M, in sod. Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm. Reprod Domest Anim 2017; 52: 655–60.
25. Batista M, Vilar J, Rosario I, in sod. Influence of different anaesthetic protocols over the sperm quality on the fresh, chilled (4 degrees C) and frozen-thawed epididymal sperm samples in domestic dogs. Reprod Domest Anim 2016; 51: 758–65.
26. Yu I, Leibo SP. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 degrees C. Theriogenology 2002; 57: 1179–90.
27. Hori T, Atago T, Kobayashi M, in sod. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. J Vet Med Sci 2015; 77: 625–30.
28. Beaufays F, Onclin K, Verstegen J. Retrograde ejaculation occurs in the dog, but can be prevented by pre-treatment with phenylpropanolamine: a urodynamic study. Theriogenology 2008; 70: 1057–64.
29. Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. Veterinary reproduction and obstetrics. Sounders Elsevier 2009.
30. Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, in sod. The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). Theriogenology 2008; 70: 77–82.
31. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, in sod. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology 2003; 60: 1553–68.
32. Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G, in sod. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. Reprod Domest Anim 2007; 42: 143–8.

33. Daskalova D, Tsvetkov T, Lazov K, in sod. Canine seminal plasma – functions and interaction with capacitation. J. BioSci. Biotechnol. 2017; 5.
34. Daub L, Geyer A, Reese S, in sod. Sperm membrane integrity in fresh and frozen-thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the NucleoCounter SP-100. Theriogenology 2016; 86: 651–6.
35. Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, in sod. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. Theriogenology 2016; 85: 1507–27.
36. Bjorndahl L. Methods for sperm concentration determination. Methods Mol Biol 2013; 927: 3–12.
37. Hancock JL. The morphology of boar spermatozoa. J R Microsc Soc 1957; 76: 84–97.
38. Barratt CL, Osborn J, Harrison PE, in sod. Hypoosmotic sperm swelling test as a sperm function test. Fertil Steril 1989; 51: 365–6.
39. Rodenas C, Parrilla I, Roca J, in sod. Quality of chilled and cold-stored (5 degrees C) canine spermatozoa submitted to different rapid cooling rates. Theriogenology 2014; 82: 621–6.
40. Hori T, Yoshikuni R, Kobayashi M, in sod. Effects of storage temperature and semen extender on stored canine semen. J Vet Med Sci 2014; 76: 259–63.
41. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, in sod. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 degrees C. Theriogenology 1997; 47: 1093–101.
42. Dalmazzo A, de Souza Ramos Angrimani D, Losano JDA, in sod. Insights into soy lecithin and egg yolk-based extenders for chilling canine spermatozoa. Zygote 2019; 27: 17–24.
43. Hidalgo M, Portero JM, Demyda-Peyras S, in sod. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. Vet Rec 2014; 175: 20.
44. Rijsselaere T, England G, Freeman S, in sod. Current knowledge on the transport and fate of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. Reprod Domest Anim 2014; 49 Suppl 2: 2–7.
45. Karre I, Meyer-Lindenberg A, Urhausen C, in sod. Distribution and viability of spermatozoa in the canine female genital tract during post-ovulatory oocyte maturation. Acta Vet Scand 2012; 54: 49.
46. Panciera DL, Purswell BJ, Kolster KA. Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. Theriogenology 2007; 68: 316–21.
47. Stornelli MC, Garcia Mitacek MC, Gimenez F, in sod. Pharmacokinetics of eCG and induction of fertile estrus in bitches using eCG followed by hCG. Theriogenology 2012; 78: 1056–64.
48. Rota A, Mollo A, Marinelli L, in sod. Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. Reprod Domest Anim 2003; 38: 440–3.
49. Kutzler M, Lamb SV, Volkmann D. Comparison between vestibular and subcutaneous insertion of deslorelin implants for oestrus induction in bitches. Reprod Domest Anim 2009; 44 Suppl 2: 83–6.
50. von Heimendahl A, Miller C. Clinical evaluation of deslorelin to induce oestrus, ovulation and pregnancy in the bitch. Reprod Domest Anim 2012; 47 Suppl 6: 398–9.

51. Romagnoli SE, Cela M, Camillo F. Use of prostaglandin F2 alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1991; 21: 487–99.
52. Hubler M, Arnold S, Casal M, in sod. [Use of a low dose prostaglandin F2 alpha in bitches]. Schweiz Arch Tierheilkd 1991; 133: 323–9.
53. Onclin K, Verstegen JP. Comparisons of different combinations of analogues of PGF2 alpha and dopamine agonists for the termination of pregnancy in dogs. Vet Rec 1999; 144: 416–9.
54. Lerner LJ. Development of novel embryotoxic compounds for interceptive fertility control in the dog. J Reprod Fertil Suppl 1989; 39: 251–65.
55. Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Garcia F, in sod. Partial foetal retention following aglepristone treatment in a bitch. Reprod Domest Anim 2011; 46: 738–41.
56. Gogny A, Fieni F. Aglepristone: A review on its clinical use in animals. Theriogenology 2016; 85: 555–66.
57. Romagnoli S, Lopate C. Transcervical artificial insemination in dogs and cats: review of the technique and practical aspects. Reprod Domest Anim 2014; 49 Suppl 4: 56–63.
58. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. J Reprod Fertil Suppl 1993; 47: 325–7.
59. Silva LD, Onclin K, Snaps F, in sod. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. Theriogenology 1995; 43: 615–23.
60. Burgess DM, Mitchell KE, Thomas PG. Coeliotomy-assisted intrauterine insemination in dogs: a study of 238 inseminations. Aust Vet J 2012; 90: 283–90.
61. Linde-Forsberg C, Strom Holst B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology 1999; 52: 11–23.
62. Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1991; 21: 467–85.
63. Mason SJ. A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen. Reprod Domest Anim 2017; 52 Suppl 2: 275–80.
64. Macedo SP, Malm C, Henry MR, in sod. Endoscopic transcervical intrauterine artificial insemination in Labrador Retriever bitches. Res Vet Sci 2012; 92: 494–500.