

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Vaginální cytologie u feny

Bakalářská práce

Autor práce: Bc. Iva Rybová

Obor studia: Kynologie

Vedoucí práce: MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Vaginální cytologie u ženy“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023



Ryhova

Poděkování

Mé poděkování patří MVDr. Romaně Krejčířové, Ph.D. nejen za vedení mé bakalářské práce, ale také za ochotu a cenné rady při zpracování. Dále bych chtěla velmi poděkovat své rodině, která mi byla oporou při studiu.

Vaginální cytologie u feny

Souhrn

Vaginální cytologie je gynekologické vyšetření, které vyhodnocuje aktuální složení a morfologii epitelárních buněk na poševní sliznici feny, díky kterému je možné určit vhodnou dobu krytí. Pro vaginální cytologii je nejdůležitějším úsekem epitel pochvy, který se mění v závislosti na jednotlivých fázích říjového cyklu. Tyto změny jsou zapříčiněny působením pohlavních hormonů: folikulostimulačního hormonu, luteinizačního hormonu, estrogenů a progesteronu. Funkce pohlavní soustavy je řízena pomocí neurohumorálních mechanismů nadřazenými složkami hypotalamo-hypofyzárního systému. Činnost pohlavních orgánů tvoří spolu s nadřazenými složkami funkční okruh s autoregulačními principy, je tak zajištěna vzájemná rovnováha rozložená na principu zpětné vazby. Reprodukční období feny zahrnuje čtyři opakující se fáze: proestrus, estrus, metestrus a anestrus. Proestrus je charakteristický zvýšenou adenohipofyzární produkcí folikuly stimulujícího hormonu (FSH), který podporuje růst a dozrávání folikulů na vaječnicích a tím i sekreci estrogenů. Dochází k proliferaci sliznice vývodných pohlavních cest, z vulvy vytéká krvavý výtok. Fena ještě není svolná k páření a ke psům se chová odmítavě. V estru praskají Graafovy folikuly a dochází k ovulaci vajíček. V krvi je vysoká hladina estrogenů, která má za následek svolnost feny k páření. V období metestru se z prasklých Graafových folikulů vyvíjejí žlutá tělíska a s tím související produkce progesteronu. Období anestru je fáze sexuálního klidu, kdy se orgány regenerují a připravují na zahájení nového říjového cyklu. Během těchto fází pohlavního cyklu dochází k charakteristickým změnám na sliznicích jednotlivých úseků reprodukční soustavy. Metoda vaginální cytologie využívá možnosti posouzení epitelárních buněk, jejich tvar, velikost, barvitelnost, buněčné jádro a rovněž pozadí stěru. Cytologické vyšetření zahrnuje odběr vzorku stěrem z poševní sliznice, jeho přenesení na podložní sklo, barvení a následné vyhodnocení pod mikroskopem. V současné době se cytologické vyšetření kombinuje se stanovením hormonu progesteronu v krevním vzorku feny. Metoda vaginální cytologie je využitelná také v diagnostice některých onemocnění.

Klíčová slova: poševní vyšetření, estrální cyklus, pohlavní hormony, říje, termín krytí

Vaginal cytology in a female dog

Summary

Vaginal cytology is a gynecological examination that evaluates the current composition and morphology of the epithelial cells on the vaginal mucosa of the bitch, thanks to which it is possible to determine the appropriate time for mating. For vaginal cytology, the most important section is the vaginal epithelium, which changes depending on the individual phases of the estrous cycle. These changes are caused by the action of sex hormones: follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estrogens and progesterone. The function of the reproductive system is controlled using neurohumoral mechanisms by superior components of the hypothalamic-pituitary system. The activity of the genitals, together with the superior components, forms a functional circuit with self-regulating principles, thus a mutual balance distributed on the principle of feedback is ensured. The female reproductive period includes four recurring phases: proestrus, estrus, metestrus, and anestrus. Proestrus is characterized by an increased adenohypophyseal production of follicle-stimulating hormone (FSH), which promotes the growth and maturation of ovarian follicles and thus the secretion of estrogens. There is proliferation of the mucous membrane of the genital tract, bloody discharge flows from the vulva. The female is not ready to mate yet and she is dismissive of dogs. In estrus, the Graafian follicles burst and the eggs are ovulated. There is a high level of estrogen in the blood, which results in the female's willingness to mate. During the period of metestrus, corpora lutea evolve from ruptured Graafian follicles and the related production of progesterone. The period of anestrus is a phase of sexual rest when the organs are regenerating and preparing for the start of a new estrous cycle. During these phases of the sexual cycle, characteristic changes occur on the mucous membranes of individual sections of the reproductive system. The method of vaginal cytology uses the possibility of assessing epithelial cells, their shape, size, staining, cell nucleus and also the background of the smear. A cytological examination involves taking a swab sample from the vaginal mucosa, transferring it to a glass slide, staining it and then evaluating it under a microscope. Currently, the cytological examination is combined with the determination of the hormone progesterone in the female's blood sample. The method of vaginal cytology can also be used in the diagnosis of certain diseases.

Keywords: vaginal examination, estrous cycle, sex hormones, estrus, mating date

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše.....	3
3.1	Anatomie reprodukčního traktu feny	3
3.1.1	Vaječník (ovarium)	3
3.1.2	Vejcovod (tuba uterina seu salpinx)	5
3.1.3	Děloha (metra seu hystera seu uterus)	6
3.1.4	Pochva (vagina)	6
3.1.5	Poševní předsíň (vestibulum vaginae)	8
3.1.6	Vateň (vulva, pudendum femininum).....	8
3.2	Neurohumorální řízení reprodukčních funkcí u feny.....	10
3.2.1	Řízení pohlavní činnosti	10
3.2.1.1	Hormony podílející se na řízení reprodukčních funkcí	11
3.3	Fáze říjového cyklu feny	13
3.3.1	Proestrus.....	13
3.3.2	Estrus	14
3.3.3	Metestrus (Diestrus).....	15
3.3.4	Anestrus	16
3.4	Poševní cytologie.....	17
3.4.1	Buňky poševní cytologie	17
3.4.1.1	Vrstva bazálních buněk (stratum cylindricum seu basale).....	17
3.4.1.2	Vrstva parabazálních buněk (stratum spinosum profundum).....	18
3.4.1.3	Vrstva intermediálních buněk (stratum spinosum superficiale).....	18
3.4.1.4	Vrstva superficiálních buněk (stratum corneum)	19
3.4.1.5	Skvamózní buňky.....	19
3.4.1.6	Další typy buněk ve stěrech poševní cytologie	20
3.4.2	Průběh cytologického vyšetření za účelem stanovení fáze říjového cyklu.....	22
3.4.2.1	Odebrání vzorku.....	22
3.4.2.2	Barvení vzorku	23
3.4.2.3	Vyhodnocení vzorku	24
3.4.3	Spolehlivost cytologického vyšetření pro určení vhodné doby krytí	30
3.4.3.1	Další metody určení vhodné doby krytí	30
4	Závěr	32
5	Seznam literatury.....	33

1 Úvod

Feny jsou zařazeny k diestrickým druhům zvířat, to znamená, že v průběhu roku u nich proběhnou dva pohlavní cykly. U přibližně 30% fen však říje nastává jednou nebo i třikrát ročně. Pro úspěšné nakrytí feny je tedy velmi důležité určit co nejpřesněji termín krytí a tím i úspěšné zabřeznutí (Svoboda et al. 2001). Tento požadavek je velmi důležitý zejména u chovných fen, které jsou ke krycímu psovi dopravovány na velké vzdálenosti nebo do zahraničí (Vitásek et al. 2001). Pro plánování co nejpřesnější doby krytí feny je nezbytným předpokladem znalost týkající se reprodukčního cyklu feny v souvislosti s hormonálními změnami a jejich projevu na tkáních reprodukční soustavy (Antonov 2017). Metoda vaginální cytologie patří mezi již standardní postupy ve veterinární medicíně (Moxon 2010). Vaginální cytologie je založena na sledování cyklických změn na epitelu poševní sliznice v důsledku působení pohlavních hormonů (Wright & Perry 1989). Jedná se o doplňkové jednoduché vyšetření pro monitorování stádia pohlavního cyklu (Romagnoli 2017).

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo na základě studia aktuální vědecké literatury zpracovat literární rešerši na téma vaginální cytologie u feny a poskytnout podrobné informace o anatomii reprodukční soustavy feny, o jednotlivých stádiích reprodukčního cyklu a souvisejících změnách na epitelu pochvy.

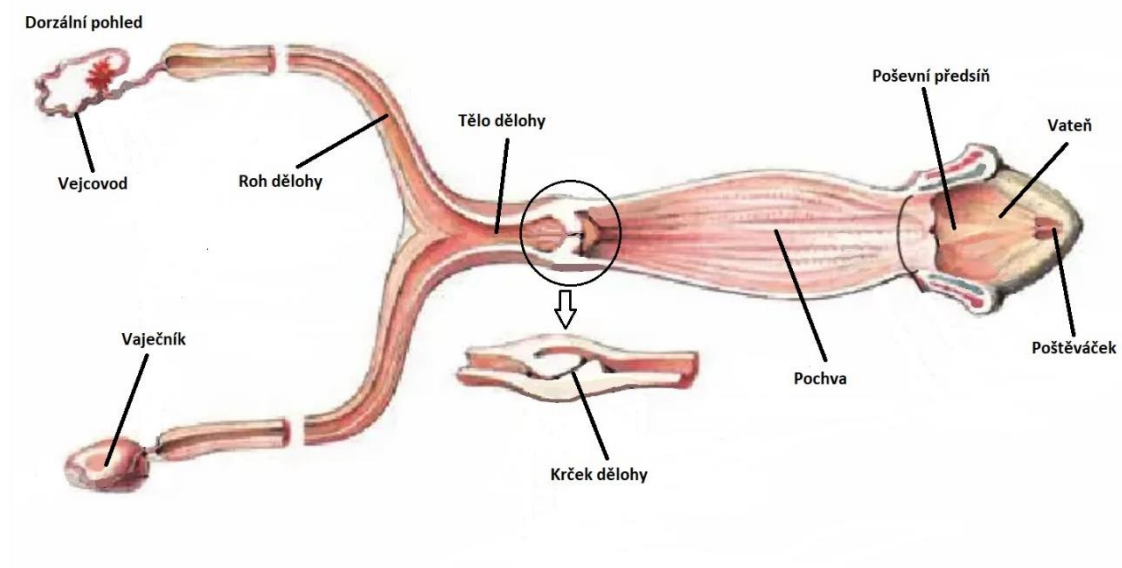
3 Literární rešerše

3.1 Anatomie reprodukčního traktu feny

Reprodukční samičí pohlavní orgány (organa genitalia feminina) mají funkci pro tvorbu samičích pohlavních buněk, vytvoření prostředí pro vývoj oplozených zárodečných buněk a vypuzení buněk vývodnými pohlavními cestami v době porodu (Hermanson et al. 2020; König & Liebich 2002).

Pohlavní orgány se rozdělují na vnitřní (genitalia interna) a vnější (genitalia externa). Mezi vnitřní orgány patří vaječníky, vejcovody, děloha a pochva. Mezi vnější pohlavní orgány patří poševní předsíň, vateň a poštváček (viz Obr. 1) (Budras et al. 2007).

V kranální části pohlavní soustavy feny jsou uloženy párové samičí pohlavní žlázy vaječníky. Ty produkují samičí pohlavní buňky a fungují také jako žláza s vnitřní sekrecí (König & Liebich 2002). Kaudálním směrem pokračují párové vejcovody, ve kterých dochází k oplodnění ovulovaných vajíček a přesunu rýhováním vzniklých zygot do dělohy. Děloha poskytuje vhodné prostředí pro vývoje plodů. Kaudálně navazujícím úsekem reprodukční soustavy je pochva a poševní předsíň, do které na dně ústí močová trubice. Nejkaudálnějším orgánem je vateň, která je laterálně ohraničena stydkými pysky a zahrnuje ventrálně uložený poštváček (Najbrt 1982; König & Liebich 2002; Budras et al. 2007).



Obr. 1: Anatomie reprodukčního traktu feny
Upraveno dle Anatomy of the dog (Budras et al. 2007)

3.1.1 Vaječník (ovarium)

Párové vaječníky jsou pohlavními orgány produkujícími samičí pohlavní buňky vajíčka a současně také endokrinními žlázami (Sturtz & Asprea 2012; England 2013).

Vaječníky se nacházejí vysoko dorzálně v bederní oblasti na úrovni 3. – 4. bederního obratle, kaudálně za ledvinami. Jsou zavěšeny na vaječnickovém závěsu (mesovariu), který je kranální součástí širokého děložního vazů a odstupuje od stropu dutiny břišní. Na fixaci každého vaječníku se podílí také krátký vlastní vaječnickový vaz (ligamentum ovarii proprium),

který spojuje vaječník s hrotem příslušného děložního rohu. U feny je navíc přítomný přídatný vaječnickový vaz (ligamentum suspensorium ovarii), který se upíná v úrovni posledního žebra (Budras et al. 2007; Sturtz & Asprea 2012).

Vaječník je zcela ukryt ve vaječnickovém okruží složený z jednovrstevnaté kubické epitelové vrstvy, pod kterou je bělavý tukový obal složený z kolagenního vaziva (Stone et al. 2003; Hermanson et al. 2020).

Vaječnice feny mají vejčitý tvar a jsou oboustranně zploštělé. Jejich velikost závisí na velikosti plemene a také fázi pohlavního cyklu. Jsou dlouhé asi 1-2 cm a v průměru mají okolo 1 cm (König & Liebich 2002). U většiny fen je levý vaječník větší a obsahuje více preovulačních folikulů. Velikost folikulů v době říje může být až 6 mm (Budras et al. 2007; England 2013).

Vaječník se skládá z povrchově uložené kůry (cortex ovarii) a centrální dřeně (medulla ovarii) (Hermanson et al. 2020). Kůra je tvořena řídkým kolagením vazivem, obsahuje fibroblasty, hladké svalové buňky, retikulární a kolagenní vlákna. Pouze v této vrstvě se nacházejí folikuly s vaječnými buňkami. V závislosti na pohlavním cyklu jsou na vaječniku přítomná i žlutá tělíska, která se vyvíjejí po ovulaci vajíčka z prasklého folikulu. Dřeň tvoří husté kolagenní vazivo, nervy, krevní a lymfatické cévy a také autonomní nervy (König & Liebich 2002; Budras et al. 2007; Sturtz & Asprea 2012).

Každý vaječnickový folikul obsahuje jeden nebo více oocytů. Folikuly se rozdělují dle stupně svého vývoje na primordiální, primární, sekundární, terciální a Graafovy folikuly (Stone et al. 2003; Hermanson et al. 2020).

Primordiální folikul

Primordiální folikul je nejmenší a tvoří nejpočetnější skupinu folikulů ve vaječnicích. Vzniká již při embryonálním vývoji v počtu několika desítek tisíc, některé zdroje uvádějí i počet sto tisíc těchto folikulů. Každý folikul obsahuje jeden oocyt I. řádu, který obklopuje jedna vrstva plochých folikulárních buněk. Jen velice malá část primordiálních folikulů se dále vyvíjí až do stupně vývoje připraveného ovulovat (Liebich 2019; Hermanson et al. 2020).

Primární folikul

V primárním folikulu dochází k růstu oocytu, kolem kterého se vytváří blána (zona pellucida) tvořená proteiny. Oocyt obklopuje stejně jako v případě primordiálního folikulu jedna vrstva folikulárních buněk, jejich tvar je však kubický (Liebich 2019; Hermanson et al. 2020).

Sekundární folikul

Sekundární folikul je charakteristický růstem oocytu, který dosahuje velikosti asi 80 μm . Zona pellucida zesiluje a folikulární buňky se množí do 5-10 vrstev. V sekundárním folikulu se začíná vytvářet folikulární tekutina (liquor folliculi) (König & Liebich 2002; Budras et al. 2007; Sturtz & Asprea 2012; Hermanson et al. 2020).

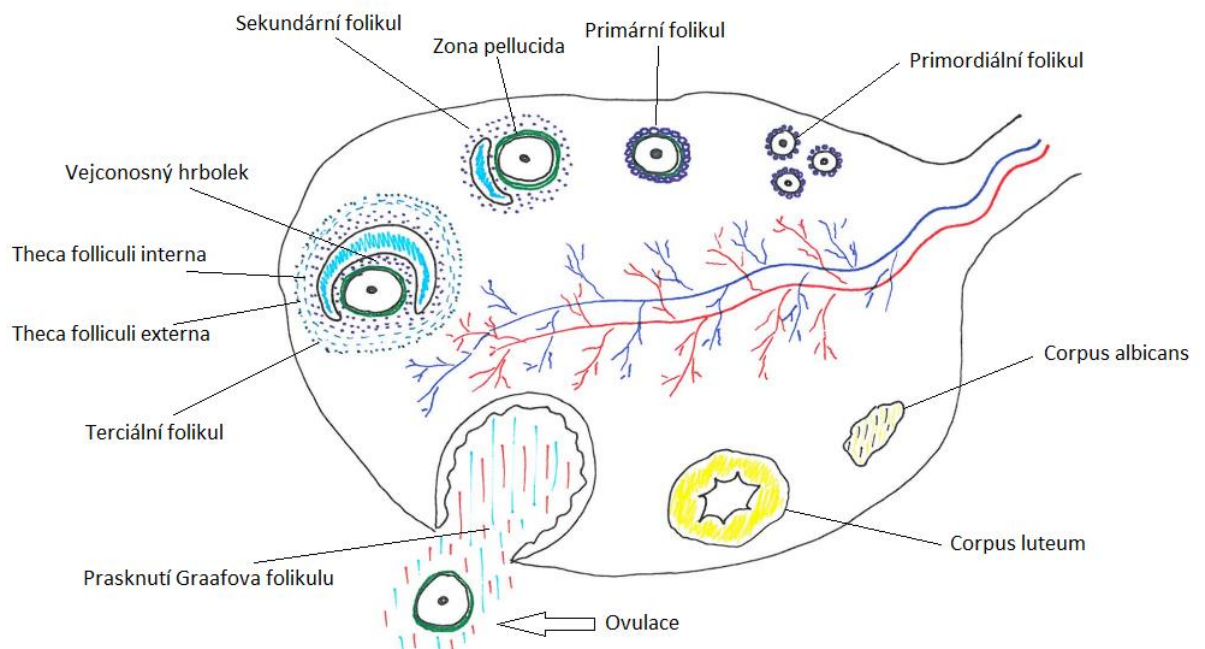
Terciální folikul

Po dalším zmnožení folikulárních buněk a folikulární tekutiny, která je obsažena ve vytvořené antrální dutině vzniká terciální folikul. Zastavuje se růst oocytu, který dosahuje

velikosti 130-300 μm a folikul se stává zralým. V této fázi se formuje vnitřní obal váčku (theca folliculi interna), který má receptory pro luteinizační hormon a vnější obal váčku (theca folliculi externa), který má receptory pro folikuloestimulační hormon. V této fázi je folikul připravený k ovulaci. K vnitřnímu obalu folikulu přiléhá zrnitá vrstva (stratum granulosum) zahrnující vejcosný hrbolek (cumulus oophorus), v němž je obsažen oocyt (Budras et al. 2007; Hermanson et al. 2020).

Graafův folikul

Zralý terciální folikul v závěrečném stádiu vývoje se nazývá Graafův folikul. Pod vlivem luteinizačního hormonu a estrogenu dochází k prasknutí folikulu a uvolnění oocytu - ovulaci. V místě ovulovaného folikulu se ze stěny folikulu vytvoří žluté tělísko (corpus luteum) (Stone et al. 2003; Budras et al. 2007).



Obr. 2: Typy folikulů na vaječniku feny

Upraveno dle Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds (Liebich 2019)

3.1.2 Vejcovod (tuba uterina seu salpinx)

Vejcovod je párová zvlněná hladkosvalová trubice, vystlaná sliznicí (König & Liebich 2002). Je zavěšen na závěsu vaječniku (mesosalpinx), který odstupuje ventrolaterálně z širokého děložního vazů. Vejcovod má délku 5-10 cm a průměr 1-2 mm v závislosti na plemeni (König & Liebich 2002; Hermanson et al. 2020). Kraniální konec vejcovodu má tvar nálevky, která obsahuje slizniční řasy vybíhající v třásně (fimbrie) na jejich okrajích. Třásně nálevky jsou převážně volné, některé z nich jsou však připojeny k ovariální burze obdávající vaječnik, fixují ho tak do blízkosti nálevky. Tím je zvýšena pravděpodobnost směřování ovulovaných vajíček do vejcovodu (Budras et al 2007; England 2013).

Za nálevkou se nachází rozšířený úsek vejcovodu zvaný ampule vejcovodu (ampulla tubae uterinae), kde dochází k oplození vajíček. Směrem k ústí děložnímu rohu je zúžená část vejcovodu (isthmus tubae uterinae), která kaudálně vyústí uje úzkým otvorem (ostium uterinum tubae) na hrotu děložního rohu (König & Liebich 2002).

Stěna vejcovodu je tvořena vnitřní vrstvou sliznice, na ni navazující vrstvou hladké svaloviny a na povrchu pobřišnice. Povrch sliznice je pokryt víceřadým jednovrstevným cylindrickým epitelem s řasinkami, které napomáhají transportu vajíčka směrem k děloze (Najbrt et al. 1982; England 2013).

3.1.3 Děloha (metra seu hystera seu uterus)

Děloha je svalový orgán, který slouží k příjmu a výživě embrya. Fena má dvourohou dělohu připomínající písmeno „Y“. Velikost a hmotnost dělohy je ovlivněna věkem, říjovým cyklem a fyziologickými a patologickými změnami (England 2013; Hermanson et al. 2020). Děloha je složena z párových kraniálně směřujících děložních rohů (cornua uteri), kaudálně navazujícího krátkého děložního těla (corpus uteri) a děložního krčku (cervix uteri) (England 2013). U pohlavně dospělé, nebřezí, středně velké feny, jsou děložní rohy asi 12 cm dlouhé. Tělo dělohy u feny je pouze 2–3 cm dlouhé (Budras et al 2007; England 2013). Krček dělohy je dlouhý asi 1,5-2 cm. Děloha je zavěšená na párových širokých děložních vazech (ligamenta lata uteri) odstupujících dorzolaterálně na stěnách pánevní dutiny a na stropu břišní dutiny v oblasti bederních svalů. Děložní stěna je tvořena třemi vrstvami. Zevním perimetriem s obsahem řídkého kolagenního vaziva, cév a nervů. Střední je hladkosvalová vrstva (myometrium), která má receptory pro oxytocin a progesteron. Myometrium má dvě části, silnější vnitřní kruhovou vrstvu a vnější slabší podélnou vrstvu. Vnitřní vrstvou je děložní sliznice (endometrium) obsahující tubulózní žlázy, které produkují děložní mléko pro výživu blastocysty v období uhnízdění v děložní sliznici před vytvořením placenty (Sturtz & Asprea 2012; England 2013; Hermanson et al. 2020). Děložní krček má tvar a konzistenci tuhého válce. Na jeho stavbě se podílí hladká svalovina a vyšší podíl vazivové tkáně. Jeho středem vede kanálek vystlaný sliznicí poskládanou v podélné řasy. Počátek tohoto kanálku navazujícího na děložní dutinu se nazývá vnitřní ústí, jeho vyústění do pochvy vnější ústí. Děložní kanálek je mimo říjí utěsněn hlenovou zátkou, která chrání děložní prostor před infekcí (Stone et al. 2003; Sturtz & Asprea 2012; England 2013).

3.1.4 Pochva (vagina)

Pochva je pružná hladkosvalová trubice, navazující na zevní ústí kanálku děložního krčku, kaudálně přecházející v poševní předsíň. Pochva je uložena v pánevní dutině v úrovni

4. – 5. bederního obratle, ventrálně od konečníku, dorzálně od močového měchýře a močové trubice (Sturtz & Asprea 2012).

Délka pochvy feny je asi 6-20 cm, v závislosti na plemeni. Rozšiřuje se kraniálním směrem asi do poloviny své délky a poté se zužuje v důsledku přítomnosti dorzálního středního podélného záhybu sliznice směrem k děložnímu krčku (Budras et al 2007; Sturtz & Asprea 2012; England 2013).

U některých fen se může vyskytovat výrazněji vyvinutá kruhová slizniční řasa (hymen, panenská blána), která odděluje pochvu od poševní předsíně. Postupně dochází k její obliteraci

v přístěnné vazivové pruhy. Tento útvar může zcela bránit páření, popřípadě ho činí pro fenu bolestivým. U většiny fen je však hymen vyvinutý jen mírně (England 2013).

Stěna pochvy je zevně tvořena vazivovou adventicií, vnitřní vrstva je hladkosvalová a uvnitř je pochva vystlána bezžláznatou sliznicí vytvářející podélně a příčně orientované záhyby (König & Liebich 2002). Na povrchu sliznice je vrstevnatý dlaždicový epitel (Hermanson et al. 2020). Sliznice pochvy se mění ve vztahu k endokrinnímu prostředí z hlediska barvy, tloušťky slizničních záhybů a vlhkosti v průběhu říje. Každá vrstva je tvořena morfologicky charakteristickým typem buněk (viz. Obr. 3) (Wehrend 2010; England 2013).

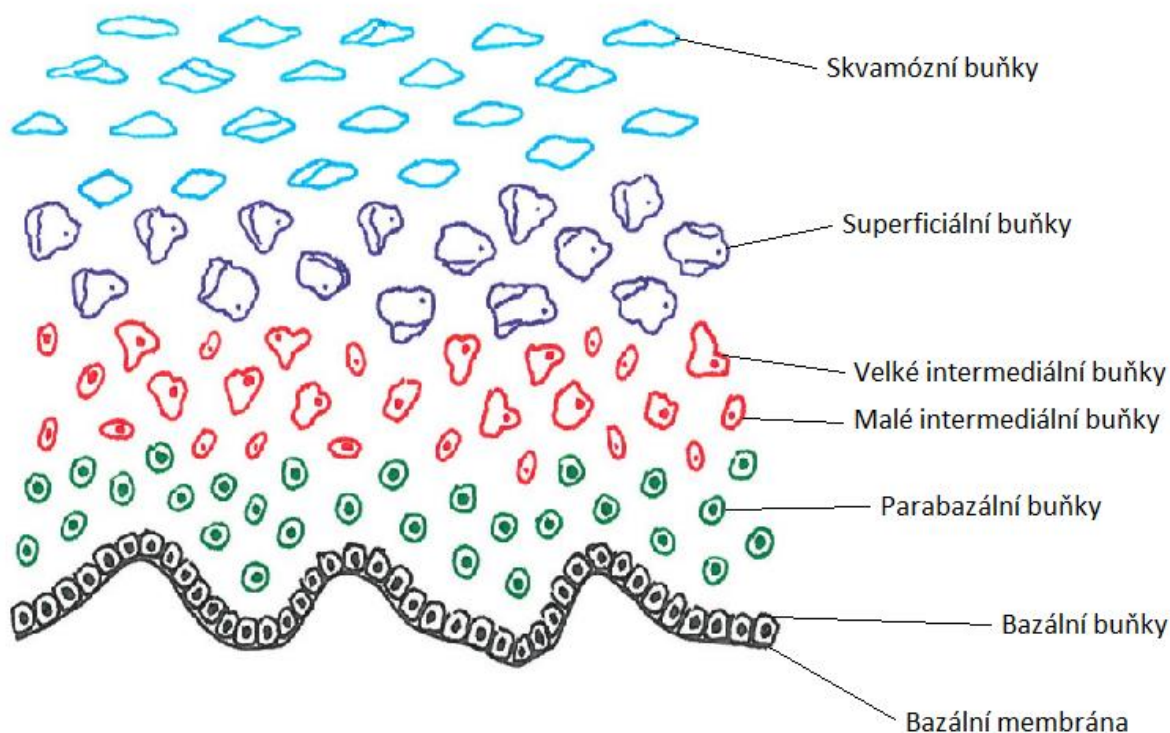
Vrstvu epiteliárních buněk nejbliže bazální membráně tvoří bazální buňky. Jedná se o jednu řadu kubických až cylindrických buněk, zakotvují se prstencovitě do bazální membrány. Tato řada odděluje buňky od cévnatého vaziva. Bazální buňky vznikají vysokou mitotickou aktivitou a vytvářejí regenerační vrstvu poševní sliznice. Cytoplasma buněk je pravidelného tvaru a jádro je malé lokalizované uprostřed buňky. Z bazální buněk vznikají další typy buněk (Budras et al 2007; England 2013).

Nad bazálními buňkami jsou uloženy parabazální buňky. Parabazální buňky tvoří několik řad kubických buněk. Je pro ně typický mírně nepravidelný až elipsovitý tvar cytoplasmy a velké jádro v centru buňky (Wehrend 2010; England 2013).

Další vrstvu tvoří intermediální buňky, dělí se na malé a velké. Vrstva intermediálních buněk je nejsilnější vrstvou z poševního epitelu a tvoří několik řad tvarově a velikostně variabilních buněk (Budras et al 2007; Wehrend 2010).

Povrchovou vrstvu sliznice tvoří superficiální buňky. Tyto buňky jsou oproti buňkám spodnějším vrstev větší, jsou ploché a mají polyendrický tvar. Jejich jádro je menší. Superficiální buňky postupně odumírají, jejich jádro je zprvu malé pyknotické a postupně zaniká. Odumřelé buňky se spontánně odlučují od sliznice (Budras et al 2007; Wehrend 2010; England 2013).

Zbytky odumřelých buněk jsou označovány jako skvamózní buňky. Tyto buňky již nemají jádro a vyznačují se nepravidelným zbytkem cytoplasmy (Budras et al 2007).



Obr. č. 3: Řez epitelem poševní sliznice

Upraveno dle Veterinary reproduction and obstetrics (Noakes et al. 2018)

3.1.5 Poševní předsíň (vestibulum vaginae)

Úsek pohlavních cest spojující pochvu a vulvu se nazývá poševní předsíň. Jedná se o krátkou, mírně ventrálním směrem směřující trubici, která je umístěná kaudálně od sedacího oblouku. Poševní předsíň u středně velké feny dosahuje délky 3-5 cm. Stěna tohoto úseku je tvořena hladkou svalovinou (Hermanson et al. 2020). Ve stěně poševní předsíně je uloženo topořivé tělísko (bulbus vestibuli) (König & Liebich 2002).

Sliznice poševní předsíně je hladká bez výběžků, pokrytá vrstevnatým dlaždicovým epitelem, má růžovo-červenou barvu (Najbrt et al. 1982; England 2013). Sliznice poševní předsíně obsahuje předsíňové žlázy vylučující viskózní tekutinu, která zvlhčuje sliznici a snižuje tření při kopulaci a zároveň sexuálně stimuluje samce (König & Liebich 2002). Žlázy jsou umístěny oboustranně v podélných řadách, kaudolaterálně vůči zevnímu ústí močové trubice (Budras et al 2007).

Močová trubice ústí z ventrální strany, na dno kraniální části poševní předsíně, na rozhraní pochvy a poševní předsíně. Močová trubice feny měří jen několik centimetrů a je podstatně kratší než močová trubice psa (Budras et al 2007; England 2013).

3.1.6 Vateň (vulva, pudendum femininum)

Vateň je zevní vstupní orgán do pohlavního traktu feny. Navazuje kaudálně na poševní předsíň, leží ventrálně od konečníku. Velikost vulvy závisí na plemeni a stádiu říjového cyklu. Oblast vulvy se dělí na stydkou krajinu (pudendum femininum) a stydkou štěrbinu (rima

pudendi). Vulva je ohraničena párovými stydkými pysky (labia vulvae), které se sbíhají v ostrou spojku na ventrální straně vulvy (commissura labiorum ventralis) a zaoblenou spojku na dorzální (commissura labiorum dorsalis) (König & Liebich 2002; Budras et al. 2007).

Stydké pysky jsou párovými kožními řasami, které chrání stydkou štěrbinu. Jsou tvořeny hladkosvalovými snopci a v hloubce uloženým hladkým svalem (musculus retractor clitoridis) a příčně pruhovaným svalem (musculus constrictor vulvae). Stydké pysky obsahují bohaté podkožní vazivo a velké množství tukové a elastické tkáně. Na zevní straně jsou kryty kůží s četnými potními a mazovými žlázkami. Kůže je řídko ochlupená a obsahuje chlupové váčky a jemné chloupky (Budras et al. 2007; Hermanson et al. 2020).

V oblasti ventrální pyskové spojky se nachází poštváček (clitoris), jedná se o zakrnělý zbytek po základu samičího pyje. Poštváček se skládá ze dvou kořenů (crura clitoridis), těla (corpus clitoridis) a žaludu (glans clitoridis). Je tvořen topořivým tělesem (corpus cavernosum clitoridis), tukovou tkání, nachází se zde velké množství nervových zakončení a bohaté krevní zásobení (Najbrt 1982; Svoboda et al, 2001; König & Liebich 2002; Hermanson et al. 2020).

3.2 Neurohumorální řízení reprodukčních funkcí u feny

3.2.1 Řízení pohlavní činnosti

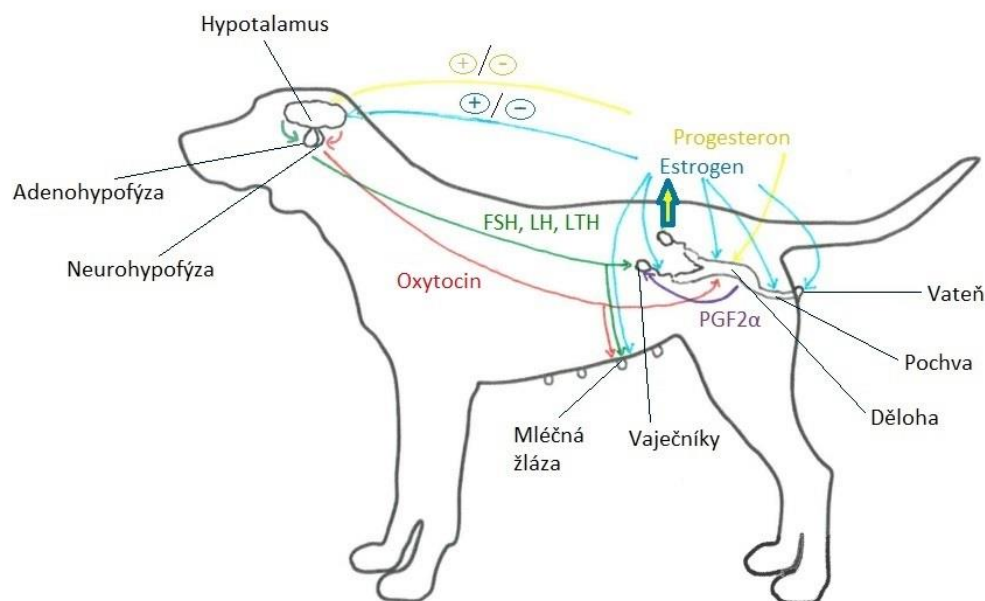
Limbický systém zahrnující kůru mozkovou a podkorová centra je místem příjmu podnětů z vnějšího prostředí i vlastního vnitřního prostředí organismu. Odtud se informace dostávají do hypotalamu (Budras et al. 2007).

Hypotalamus je centrální řídicí orgán reprodukčních funkcí, stimuluje nebo naopak inhibuje činnost podřízených orgánů. Tvoří ho dvě oblasti seskupení neurosekrečních buněk, a to přední a zadní sexuální centrum (England 2013). Do předního sexuálního centra přicházejí stimuly, které jsou ve formě nervových impulzů směřovány do sexuálního centra zadního. Neurosekreční buňky předního centra produkují oxytocin, který se ve formě granul podél nervových vláken dostává do neurohypofýzy. Buňky zadního sexuálního centra vytvářejí neurohormony liberiny, které stimuluji uvolňování hypofyzárních hormonů, a statiny s opačnou funkcí. Tyto sekrety se dostávají krevní cestou k adenohipofýze (England 2013; Hermanson et al. 2020). Z hlediska reprodukce má velký význam neurohormon GnRH (gonadotropin releasing hormone) (Hermanson et al. 2020; Ohtaki et al. 2020).

Dalším hypotalamem řízeným orgánem je hypofýza. Nachází se v lebeční dutině v prohlubni klínové kosti. Dělí se na adenohipofýzu (přední, žlázo­vý lalok) a neurohypofýzu (zadní, nervový lalok) (König & Liebich 2002). Adenohipofýza je místem sekrece hormonů stimujících gonádu (gonadotropinů), mezi které patří hormon FSH (folikuly stimující hormon), LH (luteinizační hormon) a LTH (luteotropní hormon, prolaktin). Neurohypofýza neurální cestou přicházející oxytocin zadržuje a podle potřeby organismu uvolňuje do krevního řečiště (Jelínek & Koudela 2003; Ohtaki et al. 2020).

Posledním úsekem v tzv. hypotalamo – hypofyzárně – gonadální ose jsou samičí gonády, ovária. Zde produkované hormony ovlivňují strukturu i funkci tkání a orgánů. Hormony zde vznikající pocházejí z činnosti dočasných žláz s vnitřní sekrecí, ovariálních folikulů a žlutých tělísek. Jedná se o hormony estrogenu jako produkty folikulů a progesteron sekretovaný žlutými tělísky. Žlutá tělíska také produkují hormon relaxin (Kooistra & Okkens 2000; Jelínek & Koudela 2003).

Řízení pohlavního cyklu feny je založeno na principu složité zpětné vazby, kdy nízké koncentrace hormonů stimuluji aktivitu nadřazeného centra a vysoké naopak inhibují (viz Obr. 4). Na začátku cyklu uvolňující liberiny z hypotalamu podní­jí produkci FSH z adenohipofýzy. Krevním řečištěm se FSH dostane do vaječ­ní­ků, které začnou produkovat 17 β -estradiol, který zpětnou vazbou podní­jí pokles produkce FSH a zvýšení tvorby LH z adenohipofýzy. Po dosažení vrcholu hormonu LH (LH peak), nastává ovulace a následně vzniká žluté tělísko. Žluté tělísko začne produkovat progesteron, který zpětnou vazbou podní­jí inhibici sekrece LH. V případě nezabřeznutí endometrium dělohy začne produkovat hormon PgF2 α , který podní­jí zánik žlutého tělíska a tím snížení sekrece progesteronu. Zpětná vazba do hypotalamu podní­jí obnovení pohlavního cyklu a tvorby FSH (Concannon 2011; Hermanson et al. 2020; Ohtaki & al. 2020).



Obr. 4: Řízení a působení hormonů
Upraveno dle Fyziologie hospodářských zvířat (Jelínek & Koudela 2003)

3.2.1.1 Hormony podílející se na řízení reprodukčních funkcí

Oxytocin

Hormon oxytocin prostřednictvím navázání se ve svalovině dělohy vyvolává její stahy. Uvolňuje se při páření a napomáhá vyvoláváním stahů děložní svaloviny transportu spermií reprodukčním traktem. Významnou úlohu má v době porodu, kdy jeho účinkem vznikají děložní stahy. Působí také na myoepiteliální buňky mléčných alveolů, čímž ovlivňuje spouštění mléka (England 2013).

GnRH (gonadotropin releasing hormone) je hormon patřící do skupiny liberinů, svým účinkem podporuje uvolňování hypofyzárních hormonů FSH a LH (Budras et al 2007).

Folikulostimulační hormon (FSH)

Folikulostimulační hormon stimuluje vývoj, růst a částečně zrání folikulů na vaječnicích. Podporuje množení granulóznic buněk, které vytvářejí vrstvy obalu folikulu. Folikulostimulační hormon má tímto způsobem vliv na produkci estrogenů (Jelínek & Koudela 2003; England 2013; Ohtaki et al. 2020).

Luteinizační hormon (LH)

Luteinizační hormon stimuluje ovulaci folikulu, následný vznik žlutého tělíska a ovlivňuje produkci estrogenu a progesteronu (Kooistra & Okkens 2000).

Luteinizační hormon je nutný pro vytvoření zralého Graafova folikulu. Nárůst hladiny estrogenů a luteinizačního hormonu v krvi vyvolá prasknutí Graafova folikulu a dochází

k ovulaci. Luteinizační hormon způsobí přeměnu ovulovaného folikulu na žluté tělísko. LH se uvolňuje v krátkých pulzech, zvýšená pulzová frekvence se objevuje mnoho týdnů před začátkem proestru (England 2013). Maximální hodnoty luteinizačního hormonu jsou typické pro začátek estru, těsně před ovulací (Budras et al 2007, England 2013).

Luteotropní hormon (LTH, prolaktin)

Prolaktin stimuluje další vývoj žlutého tělíska a sekreci progesteronu. Je sekretován během estrálního cyklu a v období laktace. Je aktivován působením estrogenů a progesteronu, má vliv na mléčnou žlázu, je důležitý pro spouštění a udržení laktace (Ohtaki et al. 2020). Koncentrace v krvi obvykle stoupá, když koncentrace progesteronu klesá (England 2013).

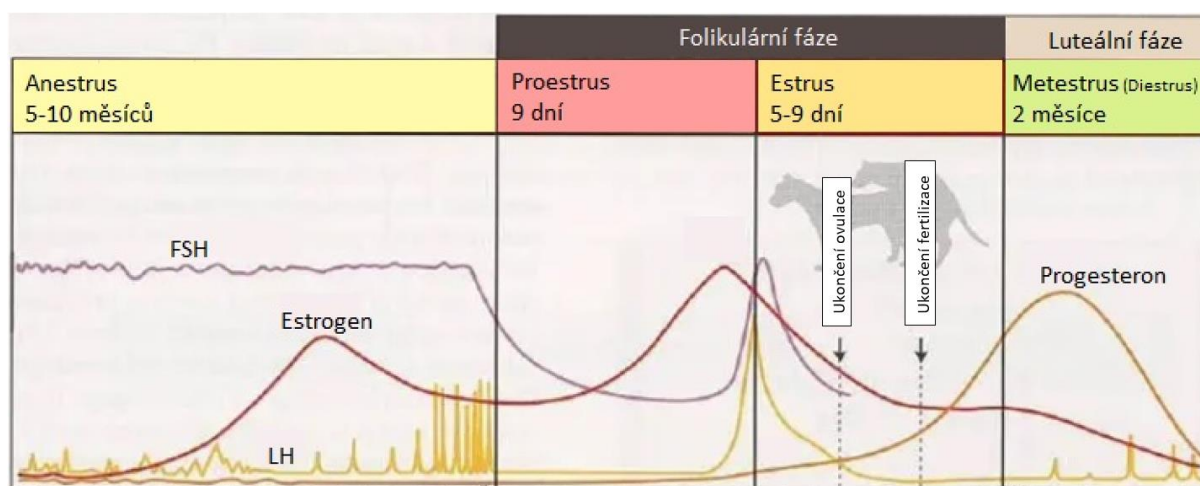
Prolaktin způsobuje změny chování typické pro pozdní březost a laktaci. U kojících fen jsou koncentrace prolaktinu v krvi velmi vysoké po určitou dobu po porodu (Budras et al 2007).

Estrogeny

Hormony estrogeny patří mezi steroidní hormony. Působí na růst a vývoj přídavných pohlavních orgánů, rozvoj sekundárních pohlavních znaků a rozvoj sexuálního chování u dospělých samic. Estrogeny vyvolávají všechny příznaky říje a zajišťují svolnost samice k páření. Stimulují také zpětnou vazbou produkci FSH a LH z adenohipofýzy (Hermanson et al. 2020). Dále působí na růst mléčné žlázy, především jejich vývodů (Jelínek & Koudela 2003).

Progesteron

Progesteron je steroidní hormon, produkovaný zralými folikuly těsně před ovulací a zejména pak žlutými tělisky po ovulaci, až do jejich regrese. Působení progesteronu spočívá v zajištění optimálních podmínek pro zahánění a vývoj embrya. Tlumí projevy říje, které jsou již nežádoucí. Zároveň brání spontánním stahům děložní svaloviny v období březosti a podporuje produkci sekrece děložních žlázek (Jelínek & Koudela 2003; Ohtaki et al. 2020).



Obr. 5: Koncentrace hormonů v krvi feny během říjového cyklu

Upraveno dle Canine and Feline Theriogenology (Johnston et al. 2001)

3.3 Fáze říjového cyklu feny

Pohlavní aktivita u feny se v průběhu života dělí na prereprodukční, reprodukční a postreprodukční období. Prereprodukční období je charakteristické růstem vývodných pohlavních cest a folikulů na vaječnicích, vrcholí pubertou. V pubertě se utvářejí sekundární pohlavní znaky, dokončuje se vývoj pohlavních orgánů a nastupuje pohlavní chování (Budras et al. 2007). Reprodukční období je charakteristické opakováním reprodukčních cyklů, které zahrnují čtyři fáze: proestrus, estrus, metestrus a anestrus (Svoboda et al. 2001). Reprodukční neboli říjový cyklus je opakující se řízený sled fyziologických změn na pohlavních orgánech a v chování feny. První říjový cyklus nastává mezi 6. – 24. měsícem, tato doba je závislá na plemeni a individualitě každé feny. U fen malých plemen psů nastává první říje průměrně dříve než u fen velkých plemen (Beaver 1994; Hermanson et al. 2020). V reprodukčním období je již fena schopna zabřeznout, optimální doba pro první reprodukci feny je však až při dosažení tělesné dospělosti okolo 2. – 3. roku života. Období proestru a estru je označováno jako folikulární fáze, je charakterizovaná typickými zevními projevy a u většiny fen trvá 14-21 dní s maximálním fyziologickým rozpětím 7-30 dní. Období metestru je také označováno jako luteální fáze a období anestru jako klidová fáze cyklu. Fena se řadí mezi diestrická zvířata, frekvence říje se objevuje 1-3x ročně (Beaver 1994; Rijnberk 1996; Svoboda et al. 2001). Postreprodukční období je charakteristické postupným útlumem reprodukčních funkcí a neschopností zabřeznutí, u feny nastupuje kolem 10. – 14. roku života (Svoboda et al. 2001; Budras et al. 2007).

3.3.1 Proestrus

Období proestru u feny trvá v průměru 7-9 dní, ale jeho fyziologické rozpětí se může pohybovat mezi 2-27 dny (Feldman et al. 2004; Vitásek et al. 2001). Na začátku proestru se zvedá hladina FSH v krvi, čímž dochází k růstu a dozrávání tericálních folikulů na vaječnicích, které produkují zvýšené množství estrogenů (Hošek 2014). Hladina estrogenů se v období proestru zvyšuje až na hodnoty 45-120 pg/ml (Kooistra & Okkens 2000; Svodota et al. 2001; Feldman et al. 2004). Tyto změny způsobují překrvení a zduření vývodných cest, charakteristický edém vulválních pysků a krvavý řídký vaginální výtok (Hermanson et al. 2020). Délka krvácení a množství vytékající krve je individuální u každé feny a nemá žádný klinický význam (Kustritz 2012).

Zvyšuje se dráždivost dělohy, epitelová vrstva endometria dělohy se zvyšuje a dochází k proliferaci děložních žlázek. Hymenální prstenec ochabuje, otevírá se děložní krček a cervikální hlen se stává řidším a vytéká do pochvy (Sturtz & Asprea 2012; England 2013).

Epitel vaginální sliznice se zvyšuje, vytváří mnohočetné buněčné vrstvy s vrstvou keratinizovaných buněk určených ke zmenšení nepohodlí feny během páření (Svoboda 2001). Poševní krvácení je způsobeno průchodem erytrocytů přes endometrium, kde praskají kapiláry a jejich typicky velké množství se směrem k ovulaci snižuje (Feldman et al. 2004; Davidson 2015). Epitel se na konci proestru postupně stává vrstevnatým dlaždicovým o tloušťce přibližně 16 buněk. Ovulace může nastat ke konci tohoto období, ale většinou nastává až během estru (England 2013).

Chování feny v proestru

Na začátku proestru se fena stává atraktivní pro psy, není ovšem svolná k páření a může se vůči psům chovat agresivně nebo vyhýbavě. Ocas má stažený na břicho a chrání si jím vulvu (Haupt 1997; Feldman et al. 2004).

Během středního proestru fena přestane zahánět psy a svým chováním vybízí ke hře, místo vrčení si lehá na zem (Feldman et al. 2004). Fena častěji močí z důvodu vylučování feromonů produkovaných vestibulární sliznicí, olizováním si čistí vulvu (England 2013).

V období vrcholného proestru je fena svolnější k páření, vyhledává psy a hraje si s nimi. Je pasivní a klidná při svázání (Láznička 1994).

3.3.2 Estrus

Období estru u feny trvá průměrně 5-9 dní, jeho fyziologické rozpětí však může být 3-21 dní. Vlastní říje je typická dozráváním Graafova folikulů a ovulací. Dokončuje se proliferace vývodných cest a dochází ke zbytnění poševní stěny. Během estru má poševní epitel asi 20-40 vrstev, buňky ve vnějších vrstvách odumírají z důvodu velké vzdálenosti od krevních cév a nedostatečné výživy (Svoboda et al. 2001).

Snižuje se množství vulválního výtoku, který ztrácí jasně červenou barvu, zesvětluje a mění se na slámově žlutý až narůžovělý. Vulva se stává měkkou, ochablou a elastickou (Feldman et al. 2004).

Děložní krček je otevřen v celé délce, dále se vylučuje hlen, který je čirý a viskózní. Pod vlivem oxytocinu dochází v děloze a vejcovodech ke kontrakcím, které napomáhají transportu spermií k vajíčku (Vitásek et al. 2001; Cowell et al. 2008). Průměr dělohy se zvětšuje, děložní žlázy se stávají početnějšími a klikatějšími (Sturtz & Asprea 2012; England 2013).

Hladina LH v krvi se zvedá po vrcholu hladiny estrogenů, trvá 12-36 hodin, označuje se jako LH peak a dosahuje hodnot 3-40 ng/ml. K ovulaci dochází za 48-72 hodin po ukončení vlny LH (Hošek 2014). V době ovulace se hodnoty progesteronu v krvi pohybují okolo 4-10 ng/ml (Cowell et al. 2008).

Ovulace

Ovulace se objevuje kolem druhého dne estru, může nastat na převážné většině povrchu vaječnicků. Vaječnicky feny uvolňují několik oocytů v každém cyklu, ovulace neprobíhají ve stejnou dobu a tento proces obvykle trvá přibližně 72 hodin. Na každém vaječnicku ovuluje přibližně 4-8 folikulů v závislosti na plemeni (Budras et al. 2007; England 2013). Folikul praská a vajíčko je s folikulární tekutinou obsahující malé množství krve vyplaveno. Po prasknutí folikulů se z jejich obalů formují žlutá tělíška (Hermanson et al. 2020). Žlutá tělíška produkují progesteron, který je důležitý pro udržení případné březosti (Goodman 2001; England 2013).

U feny jsou vajíčka k dispozici k oplodnění po relativně dlouhou dobu oproti jiným druhům zvířat. To může mít za následek smíšené vrhy, pokud je fena nakryta více psy (Budras et al. 2007; England 2013).

Chování feny v estru

Na začátku estru je fena nejvíce atraktivní pro psy, vyhledává jejich přítomnost a podbízí se psům. Fena je již svolná k páření, sama povzbuzuje psa ke kopulaci nastavením. Při tlaku

na kaudální partie v blízkosti ocasu odklání ocas na stranu a obnažuje vulvu. Napíná zadní končetiny, čímž je připravena akceptovat hmotnost psa (Feldman et al. 2004; England 2013).

Ke konci estru fena opět začíná psy odmítat a zahánět (Budras et al. 2007).

3.3.3 Metestrus (Diestrus)

Období metestru se nazývá luteální fáze a trvá u březích fen až do porodu, tedy 56-60 dní, u nebřezích fen 60-90 dní (Feldman et al. 2004). Po ukončení říje se snižuje otok zevních orgánů, až úplně vymizí. Metestrus se může vyznačovat mírným hlenovitým výtokem, který obsahuje vysoké množství neutrofilů (Kustritz 2012). Pojem metestrus se používá k popisu rané části luteální fáze (5 dnů po ovulaci), diestrus je zbývající nebřezí luteální fáze (10 dní po ovulaci), většina autorů ovšem označuje celou luteální fázi jako metestrus (England 2013).

Na vaječnicích se tvoří žlutá tělíska z prasklých Graafových folikulů, která produkují progesteron a jsou nezbytná k udržení potenciální gravidity. Děložní sliznice je připravena přijmout oplozená vajíčka, nastupuje sekreční aktivita děložních žlázek a utlumuje se překrvení a tonus dělohy. Děložní krček se uzavírá a znovu se vytváří hustá hlenová zátka, tonus hymenálního prstence se zvyšuje. Dojde-li k oplození a nidaci vajíčka, nastupuje gravidita, inhibuje se dozrávání nových vajíček, ovulací a říjí, dochází k sekreci děložního mléka. Nedojde-li k oplození vajíčka a zabřeznutí feny, dochází ke konci metestru k postupné regresi žlutého tělíska (König & Liebich 2002; England 2013). Zanikající žlutá tělíska se postupně mění v bělavě zabarvenou vazivovou tkáň. Tyto útvary se z toho důvodu označují často jako bílá tělíska (corpus albicans) (König & Liebich 2002; Budras et al. 2007). Nejvyšší koncentrace progesteronu v krvi je dosaženo přibližně 20 dní po skončení estrální fáze cyklu. Po dalších 40-30 dnech dochází k postupnému poklesu koncentrace progesteronu v krvi, u březích fen se hladina progesteronu může pohybovat ve vyšších koncentracích. Luteální fáze je celkově velmi podobná pro období gravidity i mimo ni (Budras et al. 2007; England 2013; Hermanson et al. 2020).

Chování feny v metestru

Chování feny v období metestru je většinou nevýrazné, fena bývá ještě atraktivní pro psy, většinou však již není svolná k páření a chová se odmítavě vůči psům. V metestru již nejsou pozorovatelné žádné vnější projevy hárání. Ve třetí třetině metestru se může vyskytnout edematizace mléčné žlázy a může nastat „falešná březost“ (Srinivas et al. 2004; Cowell et al. 2008; Kustritz 2012).

Pseudogravidita (falešná březost)

Stav falešné březosti může nastat u fen asi 6-8 týdnů po estru, kdy fena nezabřezla, vykazuje ovšem příznaky gravidity. Typickými příznaky jsou zvětšování břišní dutiny, edematózní mléčná žláza a s ní spojená laktace, neklid a mateřské chování. Příčinou je reakce na fyziologický nepoměr hormonů v krvi, kdy je zvýšená hladina prolaktinu a zároveň snížená hladina progesteronu (Nelson & Couto 2014).

3.3.4 Anestrus

Období anestru trvá přibližně 125-150 dní, u některých fen až 300 dní. Délka anestru může být ovlivněna ročním obdobím a vlivem melatoninu. Rozdíly v délce anestru určují frekvenci hárání feny (Davidson 2015). Anestrus je období sexuálního klidu a útlumu pohlavní aktivity, neprobíhají cyklické změny a pohlavní ústrojí je inaktivní. Pohlavní orgány jsou bez otoku a výtoku, vulva je malá a ochablá, vaječníky jsou inaktivní. Děloha má podobný tvar jako před nástupem puberty, její průměr je však větší. Dochází k regeneraci endometria dělohy, u nezabřeznutých fen asi o 20 dní dříve, než u fen gravidních (Sturtz & Asprea 2012; England 2013). Sliznice pochvy se v době anestru skládá z 2-3 vrstev nerohovatějícího epitelu (Svoboda et al. 2001).

Příchod nové fáze cyklu (proestru) může být u některých fen předvídan změnou srsti a přítomností červených krvinek ve stěru (England 2013).

3.4 Poševní cytologie

Vyšetření poševní cytologie patří mezi standardní gynekologické úkony. Hraje důležitou roli především v rámci určení vhodné doby krytí, odhalení gynekologických onemocnění, poruch reprodukčního cyklu feny a celkového zdravotního stavu pochvy (Antonov 2017; Reckers et al. 2022).

Princip vaginální cytologie spočívá ve vyhodnocení aktuálního složení epiteliálních buněk na poševní sliznici. Každá z fází cyklu se vyznačuje jiným složením poševních epiteliálních buněk a jejich charakterem. Morfologické změny buněk se pravidelně opakují v důsledku působení reprodukčních hormonů (Wright & Perry 1989).

Určení aktuální fáze cyklu je důležité pro načasování optimální doby ke krytí a zvýšení pravděpodobnosti na zabřeznutí (England 2013; Romagnoli 2017). Nepřesně načasovaná doba krytí je nejčastější příčinou nezabřeznutí u feny (Johnson 1991). Krytí feny v nevhodnou dobu a její nezabřeznutí vede zbytečně k podezření na reprodukční problémy (Grundy et al. 2002). Bez gynekologických vyšetření je pro chovatele obtížné určit vhodnou dobu ke krytí z důvodu nestandardních zevních příznaků a velké fyziologické variability délky jednotlivých fází pohlavního cyklu (Vitásek et al. 2001).

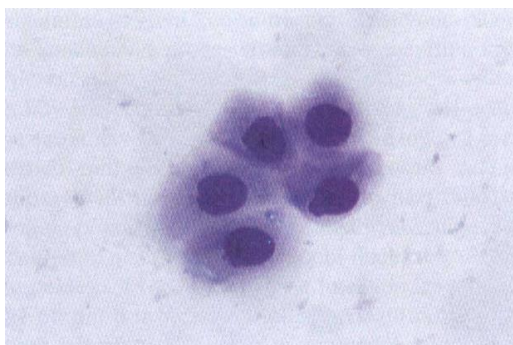
Odběr vzorku buněk je jednoduchý a neinvazivní zákrok. Celkové vyšetření je rychlé, levné a vyžaduje pouze základní vybavení veterinárního lékaře (Davidson 2015; Reckers et al. 2022).

3.4.1 Buňky poševní cytologie

Poševní sliznice obsahuje několik typů epiteliálních buněk (Ehlers 2000). Epiteliární buňky se dělí na bazální, parabazální, intermediální, superficiální a skvamózní buňky (Maneke 2002; Willard & Tvedten 2005; Johnston et al. 2001). Každý typ buňky má odlišné vlastnosti, liší se velikostí, vzhledem jádra a zrohovatěním (Reckers et al. 2022). Životní cyklus buňky začíná u bazální membrány, kde jsou lokalizované bazální buňky, ze kterých se dále vyvíjí další typy buněk. Mladá bazální buňka je pravidelného tvaru, má jasně ohraničenou cytoplasmu i jádro, které je velké a lokalizované uprostřed buňky. Postupně se buňka zvětšuje a mění se na nepravidelný tvar, jádro se zmenšuje, stává se pyknotickým a postupně degenruje. Poté se buňka stává bezjadernou a odumírá (Feldman et al. 2004).

3.4.1.1 Vrstva bazálních buněk (stratum cylindricum seu basale)

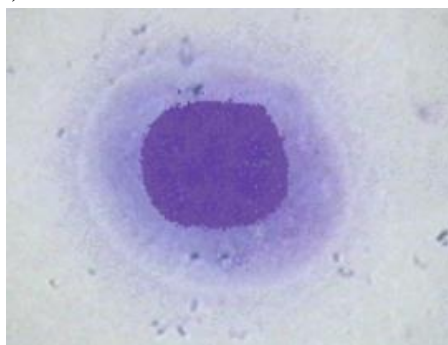
Bazální buňky jsou nejmenší buňky ve vaginální stěně, tvoří jednu řadu kubických až cylindrických buněk (Svoboda et al. 2001). Jejich velikost se pohybuje okolo 10-20 μm , velikost jádra okolo 6-10 μm (Wright & Parry 1989; Svoboda et al. 2001). Mají kulovitý až válcovitý tvar, jádro s výraznější strukturou chromatinu a homogenní jemně zrnitou cytoplasmu (viz Obr. 6) (Maneke, 2002). Ve stěrech z poševní sliznice nejsou běžně viditelné, jelikož se nacházejí na bazální membráně (Wright & Parry 1989). Z bazálních buněk vznikají další typy buněk vaginální sliznice (Cowell et al. 2008).



Obr. 6: Bazální buňky (Svoboda et al. 2001)

3.4.1.2 Vrstva parabazálních buněk (stratum spinosum profundum)

Parabazální buňky tvoří několik řad kubických buněk. Jedná se o menší buňky kulovitého či vejčitého tvaru o velikosti 15-25 μm , s průměrem jádra okolo 9-13 μm (Wright & Parry 1989; Svoboda et al. 2001). Mají větší, kulovité jádro lokalizované uprostřed buňky a menší množství cytoplasmy s jemně zrnitou strukturou. Struktura chromatinu je jasná, buňky jsou celistvé ve velikosti a tvaru (Maneke, 2002; Cowell et al. 2008). Parabazální buňky mohou obsahovat cytoplazmatické vakuoly nebo neutrofilie v cytoplasmě, které mohou naznačovat zánět (Olson et al. 1984; Wright & Parry 1989).

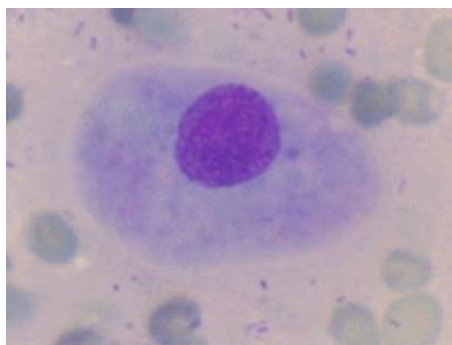


Obr. 7: Parabazální buňka. [cit. 2022-08-05]

Dostupné z: http://therio.vetmed.lsu.edu/k-9_vaginal_cytology.htm

3.4.1.3 Vrstva intermediálních buněk (stratum spinosum superficiale)

Intermediální buňky tvoří několik řad variabilních buněk lišící se tvarem a velikostí (Svoboda et al. 2001). Mají nepravidelný, oválný tvar s menším, výrazným jádrem. Množství cytoplasmy je větší než u parabazálních buněk (Christie et al. 1972; Feldman et al. 2004). Cytoplazma je nepravidelná, skládaná, hranatá, podobná cytoplasmě superficiální buňky (Cowell et al. 2008). Buňky jsou děleny na malé a velké intermediální buňky (Feldman et al. 2004). Malé intermediální buňky jsou kulaté až elipsovité, velikostí se pohybují okolo 20 μm . Velké intermediální buňky mají nepravidelný a hranatý tvar s velikostí okolo 30 μm (Christie et al. 1972; Maneke 2002). Jejich jádro je lokalizované na periferii (Cowell et al. 2008). Intermediální buňky jsou někdy zaměňovány za superficiální buňky z důvodu podobného vzhledu a velikosti (Johnston et al. 2001).

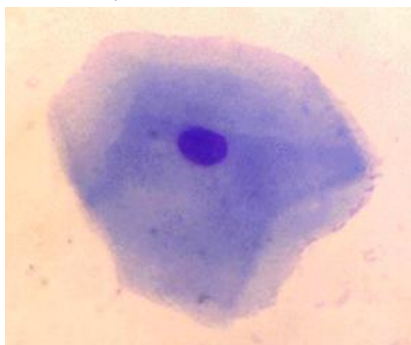


Obr. 8: Intermediální buňka. [cit. 2022-08-05]

Dostupné z: http://therio.vetmed.lsu.edu/k-9_vaginal_cytology.htm

3.4.1.4 Vrstva superficiálních buněk (stratum corneum)

Superficiální buňky tvoří několik řad plochých buněk, jedná se o největší buňky ve vaginální cytologii (Svoboda et al. 2001). Mohou dosahovat velikosti až 75 μm , průměr jádra se pohybuje okolo 3-6 μm (Christie 1972; Svoboda et al. 2001; Johnston et al. 2001). Mají malé, tmavé, pyktonické jádro (Bostedt 2016). Hranice cytoplazmy jsou nepravidelné s hranatými okraji (Johnston et al. 2001).

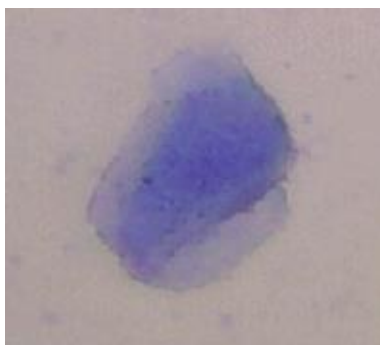


Obr. 9: Superficiální buňka. [cit. 2022-08-05]

Dostupné z: http://therio.vetmed.lsu.edu/k-9_vaginal_cytology.htm

3.4.1.5 Skvamózní buňky

Skvamózní buňky jsou velké, zrohovatělé ploché buňky s nepravidelným tvarem, které jsou již v procesu degradace a neobsahují jádro (Simmons 1970; Johnston et al. 2001; Antonov 2017).



Obr. 10: Skvamózní buňka. [cit. 2022-08-05]

Dostupné z: http://therio.vetmed.lsu.edu/k-9_vaginal_cytology.htm

3.4.1.6 Další typy buněk ve stěrech poševní cytologie

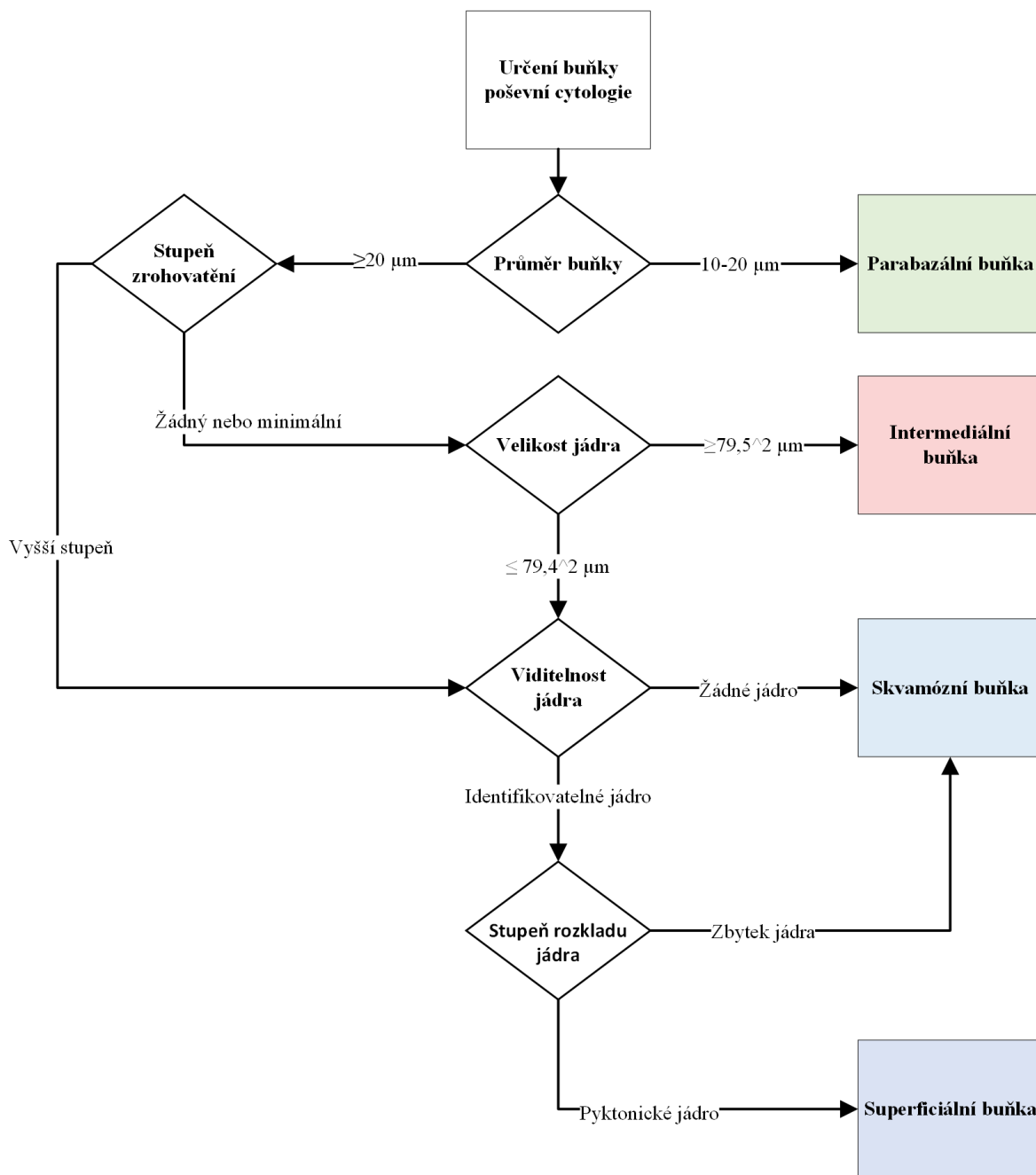
Ve stěrech poševní cytologie mohou být pozorovatelné další typy buněk: erytrocyty, leukocyty, nádorové buňky, trofoblastové buňky, bakterie, epiteliární buňky klitorisové jamky a spermie (Maneke 2002).

Erytrocyty jsou červené krvinky, které se běžně vyskytují ve stěrech v období proestru a estru. Vyjimečně se mohou objevit i v období metestru. Výskyt erytrocytů je způsoben prasknutím kapilár v endometriu dělohy a jejich diapedézou (Feldman et al. 2004).

Leukocyty jsou bílé krvinky, které se nejčastěji vyskytují ve formě neutrofilních granulocytů v období metestru a v nízkém množství také na začátku proestru. Vysoké množství v období estru naznačuje zánětlivé onemocnění pochvy (Maneke 2002).

Nádorové buňky se vyznačují výskytem atypických znaků (cytologické znaky malignity). Typickými znaky nádorových buněk jsou změny ve velikosti buněk, velikosti jader, vyšší počet jader nebo mitózy (Maneke 2002; Tavasoli & Solati 2011).

Trofoblastové buňky jsou specializované placentární buňky, které hrají důležitou roli v implantaci embrya a v interakci s decidualizovanou dělohou matky (Feldman et al. 2004).



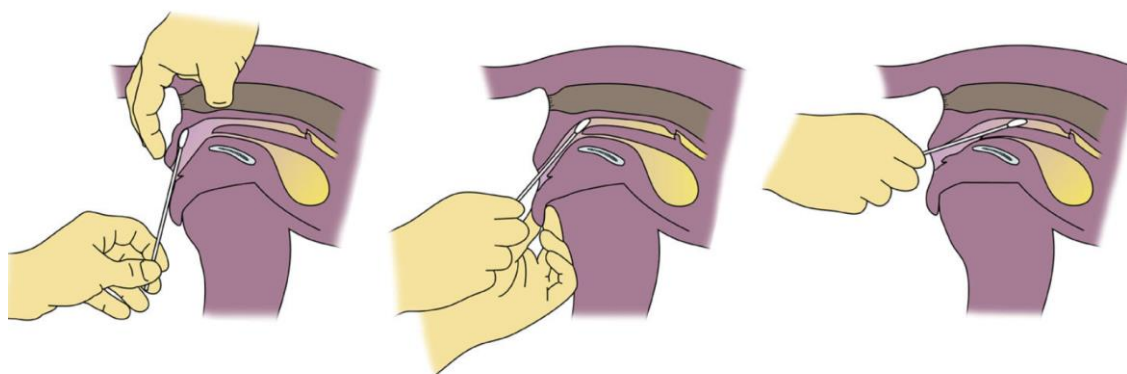
Obr. 11: Vývojový diagram: Určení buňky vaginální cytologie
 Upraveno dle Canine Vaginal Cytology (Reckers et al. 2022)

3.4.2 Průběh cytologického vyšetření za účelem stanovení fáze říjového cyklu

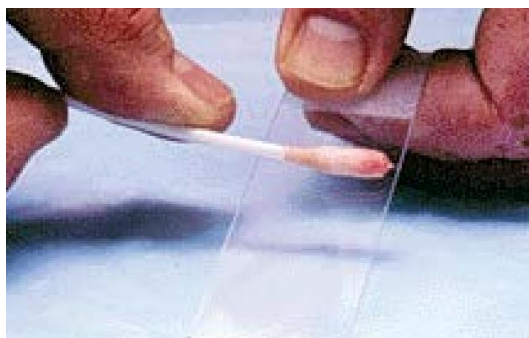
Vyšetření poševní cytologie zahrnuje odběr vzorku stěrem z poševní sliznice, který se následně nabarví namáčením v roztocích k tomu určených a vyhodnotí pod mikroskopem. První stěr by měl být odebrán přibližně pět dní po prvních pozorovaných příznacích proestru, protože některé feny mohou být v této době blízko ovulace. V závislosti na buněčném obsahu by se stěry měly opakovat každé 2-3 dny, ne ovšem dříve než za 12 hodin (Svoboda et al. 2001; Budras et al. 2007). Důležité je dbát na zásady sterilního prostředí a úkony při odběru vzorku (Svoboda et al. 2001).

3.4.2.1 Odebrání vzorku

Odběr buněk se provádí cytologickým stěrem na stojící feně, sterilní tyčinka zakončená vatovým tamponem, navlhčená fyziologickým roztokem se zavede do kaudální části pochvy za stydký oblouk. Při odběru buněk je doporučeno použít vaginální zrcátko (speculum) nebo vaginální dilatátor, díky čemuž se zabrání kontaminaci tamponku s buňkami klitorisální kapsy nebo poševní předsíně (Günzel-Apel 1993; Svoboda et al. 2001; Antonov 2017). Odebrání vzorku mimo pochvu by mohlo být pro ženu bolestivé a vyhodnocení cytologického stěru nepřesné. Úhel zavedení vatové tyčinky se pohybuje okolo 45 stupňů a směřuje dorzálně. Proti poševní sliznici se tyčinkou 1-3krát otočí, čímž se absorbují vzorky buněk (Aydin et al. 2011). Poté se vatová tyčinka opatrně vytáhne a odebraný vzorek se roluje po podložním mikroskopickém sklíčku do tenké rovnoměrné vrstvy, díky čemuž se na sklíčko přenesou odebrané buňky. Sklíčko se nechá vysušit na vzduchu nebo se zafixuje fixačním sprejem z důvodu udržení buněk na sklíčku a jejich neodplavení při barvení (Feldman et al. 2004; Svoboda et al. 2001; Budras et al. 2007). Buňky pro vaginální cytologii se mohou odebírat i dalšími způsoby, aspirací nebo stěrem skleněnou tyčinkou, tyto metody však nejsou příliš časté (Svoboda et al. 2001; Kustritz 2006).



Obr. 12: Odebrání vzorku (Davidson 2015)



Obr. 13: Rolování vzorku po podložním sklíčku (Davidson 2015)

3.4.2.2 Barvení vzorku

Po zaschnutí vzorku se stěr nabarví. Při volbě barvicí metody je důležité zvolit typ barvení, které rozlišuje rohovatější superficiální buňky od ostatních buněk a zobrazuje jasné vybarvení jader. Tento typ barvení umožňují polychromatické barvicí sady, které barví zrohovatělé buňky acidofilně a ostatní bazofilně (Svoboda et al. 2001). Nejpoužívanějším typem barvení je barvení podle Romanowského, uživatel si může vybrat z několika souprav: Diff-Quik, Hemacolor, DipStat a dalších. Nejprve se nátěr zafixuje pomocí fixačního roztoku, který obsahuje triarylmethanové barvivo a methanol. Poté se sklíčko ponoří 5-10x do červeného barviva – eosinofolního roztoku, který obsahuje xanthenové barvivo, pH pufr a azid sodný. Dále se sklíčko 5-10x ponoří do modrého barviva – bazofilní roztok, který obsahuje thiazinové barvivo a pH pufr. Sklíčko se opláchne pod kohoutkem s vodou, osuší a překryje krycím sklíčkem.

Výhody:

- rychlé vyhotovení
- konzistentní výsledky
- jasné zobrazení jader

Nevýhody:

- horší odlišení keratinizovaných buněk
- rychlé odpaření fixátoru
- trvanlivost roztoků

(Johnston et al. 2001; Svoboda et al. 2001; Chatdarong et al. 2002; Feldman et al. 2004; Budras et al. 2007).



Obr. 14: Barvení vzorku sadou Diff-Quik [cit. 2022-10-07]

Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/files/pohlavni-cyklus-feny-2015.pdf>

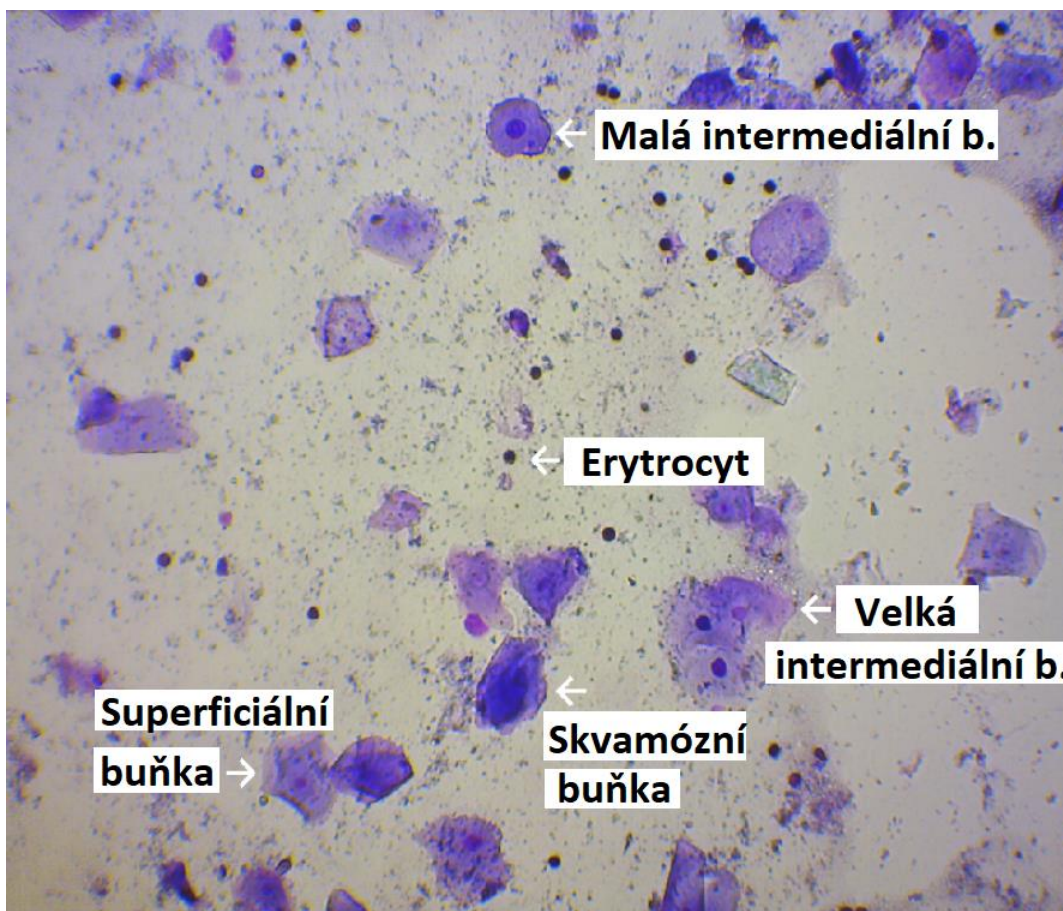
Dalšími typy barvení jsou barvení metylenovou modří a barvení podle Papanicolaoua (Svoboda et al. 2001).

3.4.2.3 Vyhodnocení vzorku

Hodnocení výsledků poševních stěrů zahrnuje správné určení typů buněk. Relativní zastoupení různých typů epiteliálních buněk odráží aktuální hormonální aktivitu a říjovou fázi cyklu (Svoboda 2001; England 2013). Poševní vzorky jsou hodnoceny ve světelném mikroskopu při zvětšení 100krát – 400krát (Theise 2002; Davidson 2015; Reckers et al. 2022).

Poševní stěr v období proestru

Cytologický stěr v časném proestru se vyznačuje směsí parabazálních buněk, intermediálních buněk a superficiálních buněk. Charakteristické pro toto období je velké množství erytrocytů, příležitostně se mohou vyskytovat ještě polymorfní neutrofily a bakterie (Johnston et al. 2001; Davidson 2015). Ve středním proestru jsou viditelné malé i velké intermediální buňky, superficiální buňky a skvamózní buňky. Stále je pozorovatelné velké množství erytrocytů (viz Obr. 15). Uprostřed proestru polymorfní neutrofily mizí (Feldman et al. 2004; England 2013). V pozdním proestru jsou na vzestupu superficiální buňky, které začínají keratinizovat a postupně se snižuje množství erytrocytů (Leigh et al. 2013). Polymorfní neutrofily na konci proestru již obvykle chybí. Superficiální buňky dosahují svého maxima v době vrcholu estrogenu, který se během proestru několikanásobně zvýší (Willard & Tvedten 2005). Ke konci proestru se zvyšuje počet bakterií (Feldman et al. 2004; Budras et al. 2007).

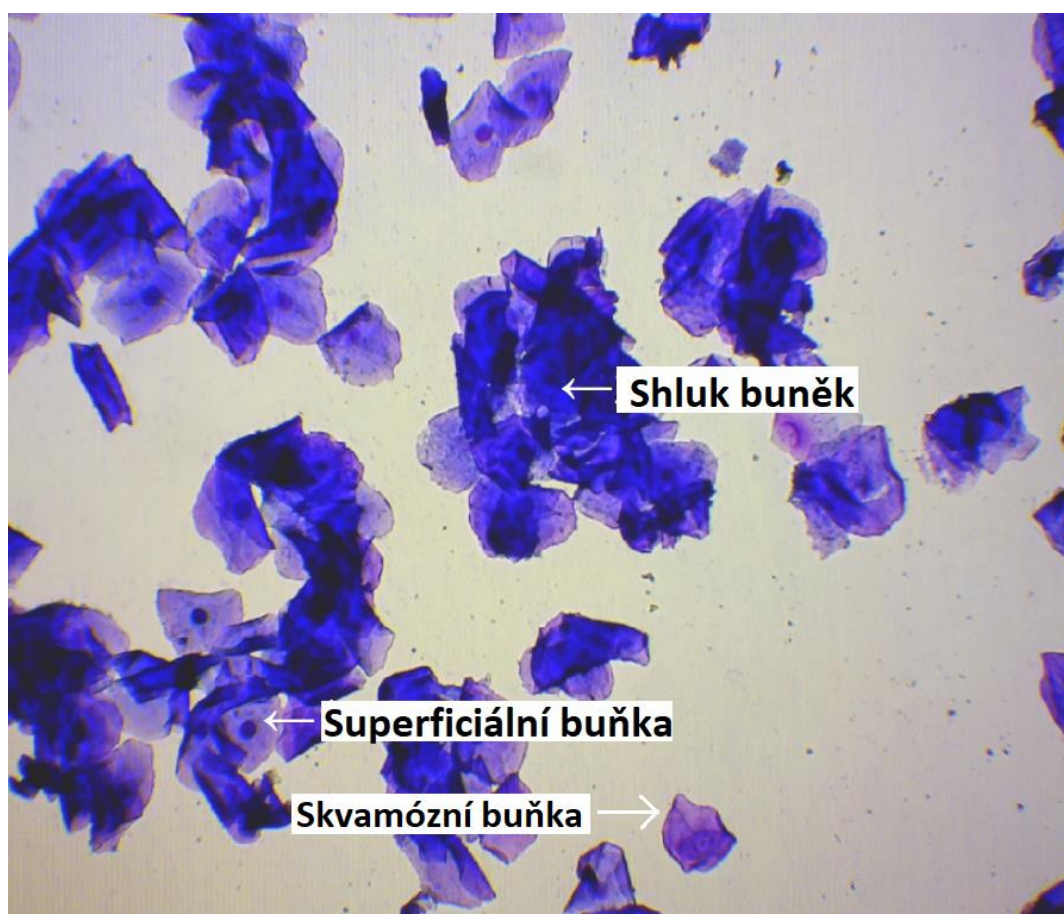


Obr. 15: Vaginální stěr v proestru (barveno Hemacolor®, zvětšení ×100)

Upraveno dle Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction (Antonov 2017)

Poševní stěr v období estru

Cytologický stěr v pozdním proestru a raném estru je těžko rozeznatelný kvůli podobně vypadajícím stěrům. Ve středním estru je již však 60-90 % superficiálních buněk, které jsou již v procesu keratinizace. V jejich jádře se nahustí chromatin a poté dochází k jejich degradaci a přechází ve skvamózní buňky. Kolem superficiálních buněk se mohou nacházet bakterie, polymorfní neutrofilů se u zdravé feny v estru nenacházejí (Cowell et al. 2008; England 2013). Erytrocyty se mohou výjimečně nacházet v menším množství. Ke konci estru mají buňky tendenci se shlukovat (viz Obr. 16) (Feldman et al. 2004; Budras et al. 2007).



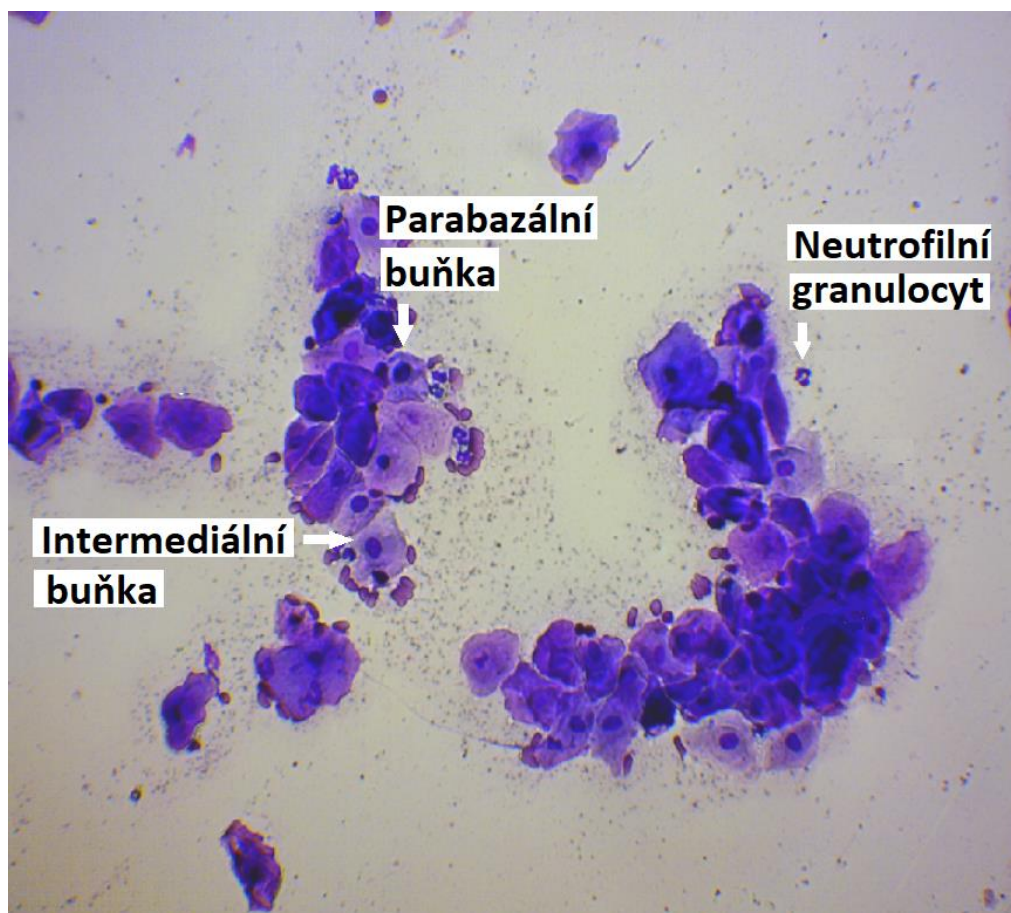
Obr. 16: Vaginální stěr v estru (barveno Hemacolor®, zvětšení ×100)

Upraveno dle Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction (Antonov 2017)

Poševní stěr v období metestru (diestru)

V přechodu mezi estrem a metestrem se v cytologickém stěru znovu objevují ve velkém počtu intermediální buňky a parabazální buňky (Feldman et al. 2004; Budras et al. 2007). Na začátku metestru dochází k přílivu polymorfních neutrofilů a absenci bakterií (viz Obr. 17). U některých fen se nemusí neutrofilů vyskytovat nebo jsou přítomny jen v menším množství.

Erythrocyty obvykle chybí, ale mohou být pozorovány v menším množství v časném metestru (Srinivas et al. 2004; Cowell et al. 2008). Ke konci metestru počet buněk postupně klesá a stěr je podobný jako v anestru (Sturtz & Asprea 2012; England 2013).



Obr. 17: Vaginální stěr v metestru (barveno Hemacolor®, zvětšení $\times 100$)

Upraveno dle Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction (Antonov 2017)

Poševní stěr v období anestru

Typickým nálezem na stěrech z vaginální sliznice v tomto období je celkově nízké množství buněk. Z poševních buněk se vyskytují parabazální buňky a malé intermediální buňky. Polymorfní neutrofilie mohou být přítomny v malém počtu. Erythrocyty a bakterie se ve stěru nevyskytují (Feldman et al. 2004; Budras et al. 2007; Cowell et al. 2008; Davidson 2015).

Cytologická diagnostika vhodné doby krytí

Ideální doba ke krytí nastává v období estru, kdy ve stěru převažují superficiální buňky a skvamózní buňky. V minimálním procentuálním zastoupení těchto buněk se autoři mírně rozcházejí. Podle Hoška (2014) by mělo být ve stěru alespoň 60 % keratinizovaných buněk, podle Davidsona (2015) alespoň 70 % a podle Srinivase et al. (2004) a Svobody et al. (2001) alespoň 80 %. Všichni autoři se ovšem shodují na tom, že ve stěru nesmí být přítomny polymorfní neutrofilie.

Na základě zjištěných buněk z poševních stěrů se počítají cytologické indexy, mezi ně patří eozinofilní index, karyopyknotický index a keratinizační index.

$$\text{Eozinofilní index} = \frac{\text{zrohovatělé buňky} \times 100}{\text{celkový počet epitelárních buněk}}$$

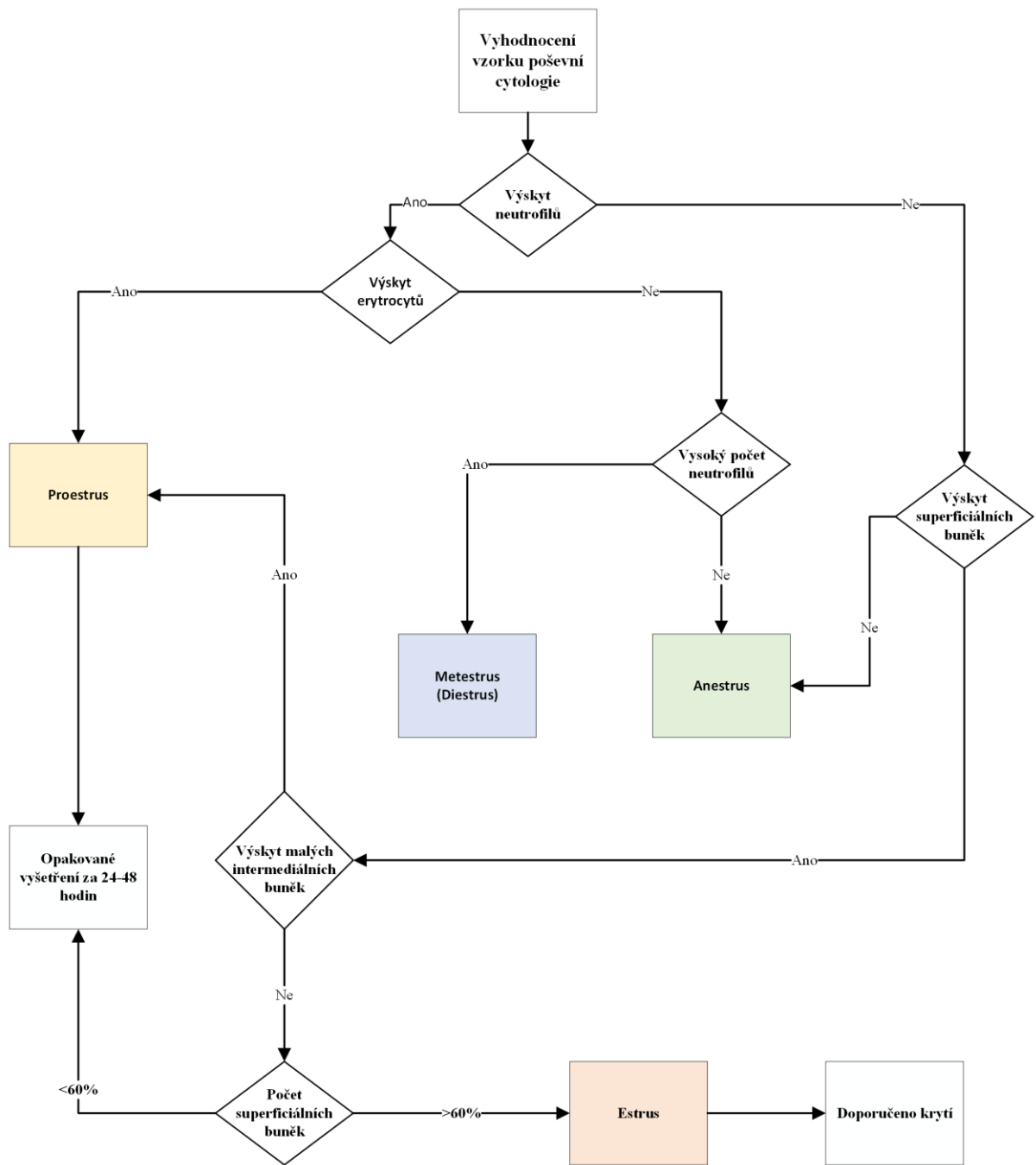
Vhodná doba ke krytí nastává, když eozinofilní index dosahuje hodnot 60-100 %.

$$\text{Karyopyknotický index} = \frac{(\text{buňky s pyknotickým jádrem} + \text{bezjaderné b.}) \times 100}{\text{intermediální buňky}}$$

Vhodná doba ke krytí nastává, když karyopyknotický index dosahuje hodnot 90-100 %.

$$\text{Keratinizační index} = \frac{(\text{superficiální buňky} + \text{skvamózní buňky}) \times 100}{\text{celkový počet epitelárních buněk}}$$

Vhodná doba ke krytí nastává, když keratinizační index dosahuje hodnot nad 80 %.
(Goodman 2001; Johnston et al. 2001; Svoboda et al. 2001).



Obr. 18: Vývojový diagram: Vyhodnocení vzorku poševní cytologie
 Upraveno dle Canine Vaginal Cytology (Reckers et al. 2022)

Cytologická diagnostika gravidity

Stěry vaginální cytologie nejsou schopny diagnostiky gravidity feny. Stěry v období metestru, anestru a březostí feny jsou velmi podobné (England 2013; Leigh et al. 2013).

Cytologická diagnostika patogenních stavů

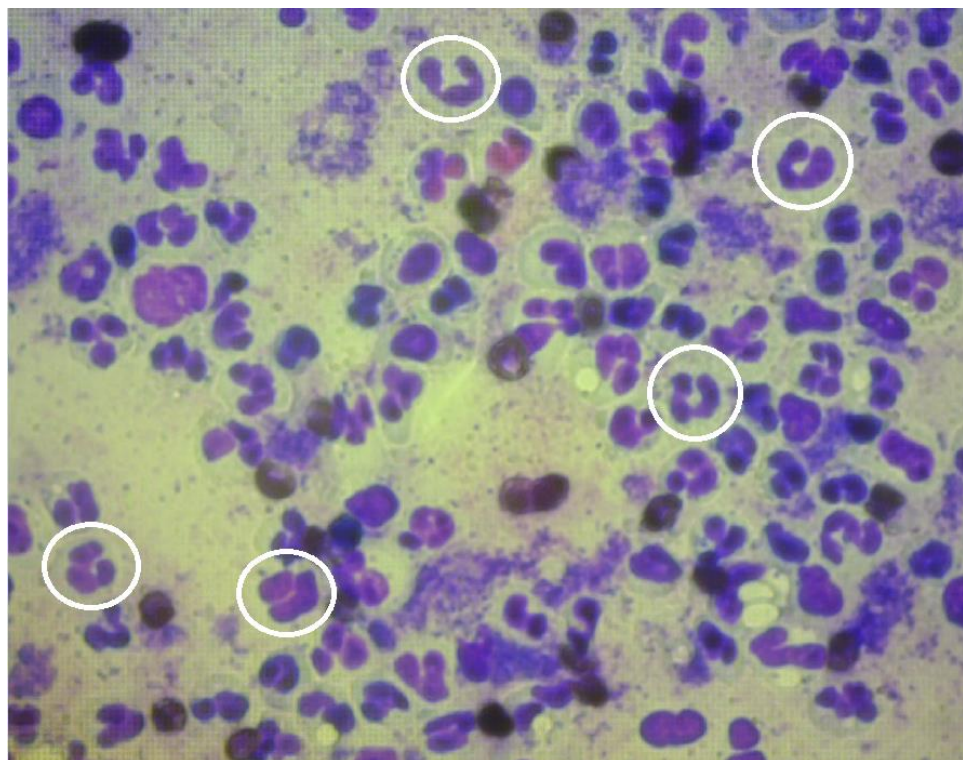
Dle cytologických stěrů je možné pozorovat některá onemocnění, vnějším příznakem onemocnění může být nadměrný vaginální výtok (Svoboda et al. 2001; England 2013).

Zánět pochvy (vaginitis) se vyznačuje přítomností velkého množství polymorfních leukocytů s jádrem (viz Obr. 19), tkáňových detritů, možný je také výskyt bakterií (Johnston et al. 2001; Svoboda et al. 2001).

Zánět dělohy (pyometra) je charakteristický vysokým počtem polymorfních leukocytů, erytrocytů, endometriálních buněk a hlenu s tkáňovým detritem (Svoboda et al. 2001; Vitásek 2011; England 2013).

Nadprodukce estrogenů (hyperestrogenismus, prodloužený estrus) je onemocnění způsobené vysokou produkcí estrogenů. Cytologický obraz je stejný jako v estru s rozdílem vysokého množství erytrocytů (Johnston et al. 2001; Svoboda et al. 2001).

Cystická glandulární hyperplazie endometria se vyznačuje přítomností buněk děložní sliznice a erytrocytů (Vitásek 2011).



Obr. 19: Vysoký počet polymorfních neutrofilů v cytologickém stěru (barveno Hemacolor®, zvětšení $\times 400$) (Antonov 2017)

3.4.3 Spolehlivost cytologického vyšetření pro určení vhodné doby krytí

Poševní cytologie dokáže velmi dobře určit začátek říje a odhalit případné patogenní stavy rozmnožovacího ústrojí feny (Hošek 2014). V dnešní době ale není známa žádná standardizovaná definice jednotlivých typů vaginálních buněk. Vlastnosti jednotlivých typů buněk jsou velmi variabilní, někdy se dají rozlišit pouze povrchové buňky od buněk hlubších vrstev epitelu a interpretace jsou popsány rozdílně jednotlivými autory (Reckers et al. 2022). Taktéž průběh jednotlivých fází cyklu je u každé feny individuální (Makene 2002). U některých fen je dosaženo keratinizačního indexu pouze 60 % při vrcholu říje (England 2013). Cytologický obraz bývá často podobný od vrcholného proestru až do konce estru, takže pokud se nepodaří zachytit období zlomu proestru a estru, těžko lze z jednotlivých vyšetření uprostřed proestru nebo estru odhadnout, kdy bude optimální doba ke krytí. Někteří autoři uvádějí, že vaginální cytologie umožňuje pouze načasování ovulace zpětně (Bergeron et al. 2014). Podle Vitáska et al. (2001) se vaginální cytologie více zaměřuje na množství estrogenu v pochvě, než na ovulaci a proto může být vyšetření nepřesné.

Odběr, barvení i vyhodnocení je subjektivní metoda a záleží na zkušenostech a schopnostech veterinárního lékaře. Harmonogram poševních stěrů je vhodné si dopředu naplánovat dle znalostí a počítat s nestandardními projevy každé feny. Vyšetření by měla být postupována v logických krocích. Důležité je respektovat informace o předchozím průběhu říje a současných příznacích (Vitásek et al. 2001).

Vaginální cytologie je tedy dobrý nástroj určení fáze cyklu, za předpokladu jasně definovaných pravidel určování typů buněk, správné interpretace, jednotného postupu oběru vzorků a jednotného postupu barvení (Wehrend 2010; Arlt 2018; Reckers et al. 2022). Pro přesnější určení vhodného dne krytí je ovšem doporučeno kombinovat vaginální cytologii s další metodou vyšetření jako je určení koncentrace progesteronu nebo LH v krvi feny (Moxon et al. 2010; Hošek 2014).

3.4.3.1 Další metody určení vhodné doby krytí

Existují další možné způsoby pro určení vhodné doby krytí. Určení na základě sledování charakteristiky výtoku, intervalu při změně barvy výtoku z červené na růžovou až bělavou, sledování chování feny a její svolnosti k páření nebo metoda krytí na základě délky hárání. Všechny tyto metody jsou ovšem limitované individualitou každé feny (Vitásek 2001).

Nejpřesnější metoda určení vhodné doby krytí je sestavení hormonálního profilu konkrétní feny. Využívá se také k diagnostice patologických a fyziologických stavů na pohlavním ústrojí feny (Vitásek et al. 2001). Nejčastěji využívanou metodou je stanovení progesteronu v krvi, méně častou také hladina estrogenu nebo LH v krvi (Svoboda et al. 2001; YeunHee et al. 2007).

Hladina progesteronu v krvi

Vyšetření spočívá v odběru krve a stanovení hladiny progesteronu v krevní plazmě nebo séru (Svoboda et al. 2001). Na základě množství je možné určit přesnou fázi pohlavního cyklu feny a také určit optimální dobu ke krytí (Vitásek et al. 2001). Toto vyšetření je vhodné pro určení doby krytí, pokud se mezi psem a fenou nachází velká vzdálenost, nebo se kvůli krytí jede do zahraničí. Vyšetření na progesteron se provádí každých 24-48 hodin. Stanovení

progesteronu v krvi je jedna z nejpřesnějších metod stanovení vhodného dne ke krytí (Vitásek et al. 2001). Úspěšnost této metody se pohybuje okolo 80-90 % (Svoboda et al. 2001; Hošek 2014).

Tab. 1: Hodnoty progesteronu v krvi (Svoboda et al. 2001; Vitásek et al. 2001)

Hladina progesteronu v krvi	Fáze cyklu	Doporučený termín krytí
< 2 ng/ml	Proestrus	Opakovaný odběr za 3-5 dní
2-3 ng/ml	LH peak	Opakovaný odběr za 2-4 dny
3,1-4,5 ng/ml	Konec LH peaku	Krytí za 1-3 dny
4,6-8 ng/ml	Ovulace	Krytí ihned nebo za 1 den
8,1-25 ng/ml	Konec fertilního období	Krytí ihned
> 25 ng/ml	Metestrus	Nízká šance zabřeznutí

Krytí se doporučuje, jakmile hodnota progesteronu v krvi dosáhne 5 ng/ml (viz Tab. 1) (Svoboda et al. 2001; YeunHee et al. 2007).

4 Závěr

Plánované krytí fen s úspěšným zabřeznutím je spojeno se splněním mnoha podmínek. Z hlediska chovatele feny i majitele krycího psa je důležité naplánování termínu setkání. Často se jedná o cestu feny za krycím psem na velké vzdálenosti, v mnoha případech i do zahraničí. V těchto případech je téměř vyloučena možnost setrvání u psa delší dobu, což je problematické často z finančních důvodů, ale i s ohledem na vytíženost psů a nemožnost opakovaného krytí. Stále častější je u fen rovněž méně typický průběh říje spojený s jejími nevýraznými vnějšími příznaky. Z tohoto důvodu je nutné poskytnout chovatelům stále více žádanou službu a určit co nejpřesněji vhodný termín krytí pomocí laboratorních vyšetření. Jednou z používaných metod je vaginální cytologie. Jedná se o neinvazivní, poměrně často používané doplňkové vyšetření, v současné době prováděné převážně v kombinaci se stanovením hladiny progesteronu v krvi feny.

Posuzování cytologických preparátů nemá jen význam pro stanovení vhodného termínu krytí, ale poskytuje i další informace, jako je přítomnost mikrobiální mikroflóry v souvislosti se zánětem pochvy či dělohy.

Kombinace metody vaginální cytologie a stanovení hladiny progesteronu v krvi feny umožní stanovení fáze pohlavního cyklu feny s vysokou přesností, přínosem vaginální cytologie je navíc získání některých dalších informací o stavu porodních cest.

5 Seznam literatury

- Antonov A. 2017. Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* **20**:193-203.
- Arlt S. 2018. Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals* **53**:53-62.
- Aydin I, Ozaydin D, Sur E. 2011. Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10**:1962-1967.
- Beaver B. 1994. *The Veterinarian's Encyclopedia of Animal Behavior*. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Bergeron L, Nykamp S, Madan P, Brisson B, Sears W, Gartley C. 2014. Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **245**:1360-1366.
- Bostedt H. 2016. Exfoliative Vaginalzytologie und Uteruszytologie. *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* **1**:20-27.
- Budras K, Fricke W, McCarthy P, Richter R. 2007. *Anatomy of the Dog*. Schlütersche, Hannover.
- Chatdarong K, Axner E, Forsberg C, Kampa N. 2002. Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats by fluoroscopy and scintigraphy. *Reproduction in Domestic Animals* **37**: 275-281.
- Christie D, Bailey J, Bell E. 1972. Classification of cell types in vaginal smears during the canine estrus cycle. *British Veterinary Journal* **128**:301-310.
- Concannon P. 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science* **124**:200-210.
- Cowell R, DeNicola D, Meinkoth J, Tyler R. 2008. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. *Veterinary Clinical Pathology* **3**:378-380.
- Davidson P. 2015. Determining Canine Estrus Stage via Vaginal Cytology. *Clinician's Brief* **13**:19-20.
- Ehlers J. 2000. Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Vaginalzytologie bei der Hundin und ihr Einsatz bei der Bestimmung des optimalen Belegungs-zeitraumers. *Diss Med Vet, München*.
- England G. 2013. *Dog breeding, Whelping and Puppy Care*. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Feldman E, Nelson R, Reusch C, Scott-Moncrieff C. 2014. *Canine and Feline Endocrinology*. Saunders, Missouri.
- Goodman M. 2001. Ovulation timing: Concepts and controversies. *Vet Clin North Am Small Anim Practise* **31**:219-235.
- Grundy S, Feldman E, Davidson A. 2002. Evaluation of infertility in the bitch. *Clinical Techniques in Small Animal Practise* **17**:108-115.
- Günzel-Apel A. 1993. *Fruchtbarkeitskont-rolle bei der Hundin*. *Vet Reihe, München*.

- Hermanson J, Lahunta A, Evans H. 2020. Miller and Evan's anatomy of the dog. Elsevier, St. Louis.
- Hošek L. 2014. Stanovení luteinizačního hormonu (LH) při časování říje u fen. Veterinářství **64**:501-506.
- Haupt K. 1997. Sexual behaviour problems in dogs and cats. Veterinary Clinics of North America **27**:601-616.
- Jelínek P, Koudela K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova univerzita, Brno.
- Johnson C. 1991. Diagnosis and treatment of chronic vaginitis in the bitch. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practise **21**:523-531.
- Johnston S, Kustritz RM, Olson P. 2001. Canine and Feline Theriogenology. Current Veterinary Theriogenology **9**:1231-1233.
- Kooistra H, Okkens A. 2000. The role of follicle-stimulating hormone in the initiation of ovarian folliculogenesis in the bitch. International Symposium on Canine and Feline Reproduction **4**:44-46.
- König H, Liebich H. 2002. Anatomie domácích savců 2. Ružinov, Slovensko.
- Kustritz RM. 2006. Collesction of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. Theriogeonology **66**:567-574.
- Kustritz RM. 2012. Managing the reproductive cycle in the bitch. Veterinary Clinics of North America. Small Animals Practise **42**:423-437.
- Láznička A. 1994. Monitorování pohlavního cyklu fen. Veterinářství **44**:3-4.
- Leigh O, Raji L, Diakodue E. 2013. Detection of standing heat in bitches: Application of vaginal cytology. World Journal of Life Science and Medical Research **3**:21-25.
- Liebich H. 2019. Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds: Textbook and Colour Atlas. 5m Publishing, Lings.
- Maneke N. 2002. Untersuchung zur Beschreibung von Vaginalzellen der Hündin als ein Beitrag zur objektiven Zyklusdiagnostik [Dis. Thesis]. Freien Universität Berlin, Berlin.
- Moxon R, Copley D, England GCW. 2010. Quality assurance of canine vaginal cytology: A preliminary study. Theriogenology **74**:479-485.
- Najbrt R. 1982. Veterinární anatomie 2. Státní zemědělské nakladatelství, Brno.
- Nelson R, Couto R. 2014. Small animal internal medicine Elsevier, St. Louis.
- Noakes D, Parkinson T, England G. 2018. Veterinary reproduction & Obstetrics. Elsevier, Edinburgh.
- Ohtaki T, Fujiwara H, Watanabe G, Ono M, Taya K, Tsumagari S. 2020. Changes in luteinizing hormone pulse frequency and prolactin levels in bitches in response to estrus induction by cabergoline-its cases where i tis delayed to induce estrus. Journal of Veterinary Medical Science **82**:1773-1780.

- Olson P, Thrall M, Wykes P. 1984. Vaginal cytology Part II. Diagnosing canine reproductive disorders. *Compendium of Continuous Education of the Practicing Veterinarian* **6**:385-390.
- Reckers F, Klopfleisch R, Belik V, Arlt S. 2022. Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells. *Frontiers in Veterinary Science* (**9**:834031) DOI: 10.3389/fvets.2022.834031.
- Rijnberk A. 1996. *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Dordrecht.
- Romagnoli S. 2017. Top 5 reproduction concerns in dogs. *Clinician's Brief* **15**:82-88.
- Simmons J. 1970. The vaginal smear and its practical application. *Small Animal Clinician* **65**:369-373.
- Srinivas M, Lakshmi Rani N, Suresh K, Sreenu M. 2004. Vaginal exfoliative cytology as a tool in diagnosing reproductive disorders in bitches. *Intas Polivet* **5**:354-356.
- Stone E, Cantrell C, Sharp N. 2003. Ovary and uterus. *Textbook of Small Animal Surgery* **2**:1293-1308.
- Sturtz R, Asprea L. 2012. *Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians and Nurses: A Clinical Approach*. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Svoboda M, Doubek J, Klimeš J. 2001. *Nemoci psa a kočky, II díl*. Noviko, Brno.
- Tavasoli A, Solati A. 2011. Granulosa cell tumor of the ovary in dog: Case Report from Teheran. *Journal of Cell and Animal Biology* **5**:66-68.
- Theise B. 2002. *Unterstützung zur Entwicklung eines computergestützten Lernprogramms zu den Grundlagen der Gynäkologie bei der Hundin [Dis. Thesis]*. Ludwig Maximilians Universität München, München.
- Vitásek R, Číhalová P, Zajíc J. 2001. Zkušenosti s určováním vhodné doby krytí fen na základě koncentrace progesteronu v periferní krvi. *Veterinářství* **51**:9-11.
- Vitásek R. 2011. *Komplex cystické glandulární hyperplazie endometria a pyometry fen: Případová studie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
- Wehrend A. 2010. *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund: diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Enke Verlag, Stuttgart.
- Willard M, Tvedten H. 2005. *Labordiagnostik in der Kleintierpraxis*. Urban & Fischer, München.
- Wright P, Parry B. 1989. Cytology of the canine reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practise* **19**:851-874.
- YeunHee K, Alexander T, Meyers-Wallen V. 2007. Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology* **68**:1177-1182.